



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 284**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/83** (2006.01)  
**C12N 15/84** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**A01H 4/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98960237 .0**  
96 Fecha de presentación : **16.11.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1034286**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2000**

54 Título: **Movilización de genomas víricos a partir de T-ADN utilizando sistemas de recombinación específicos de sitio.**

30 Prioridad: **18.11.1997 US 65627**  
**18.11.1997 US 65613**  
**08.09.1998 US 99461**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.05.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.05.2010**

73 Titular/es:  
**PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, Inc.**  
**800 Capital Square, 400 Locust Street**  
**Des Moines, Iowa 50309, US**

72 Inventor/es: **Baszczynski, Christopher, L.;**  
**Lyznik, Leszek, Alexander;**  
**Gordon-Kamm, William, J. y**  
**Guan, Xueni**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 338 284 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

Movilización de genomas víricos a partir de T-ADN utilizando sistemas de recombinación específicos de sitio.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con biología molecular de plantas. Más específicamente, la invención se relaciona con métodos y composiciones para incrementar la eficiencia de escisión de replicón vírico de T-ADN que se transfiere a una planta mediante agroinfección.

10 **Antecedente de la invención**

El *Agrobacterium* que cosecha un plásmido Ti o Ri puede transferir eficientemente una porción de estos plásmidos, del T-ADN, en células de planta en el sitio de una herida. La transferencia del T-ADN en la célula de planta se induce mediante compuestos de señal presentes en el sitio de una herida de una planta y requiere secuencias de límite de T-ADN en ambos extremos de T-ADN y los productos de gen de virulencia que actúan trans (*vir*) codificados por el plásmido Ti o Ri. El T-ADN transferido luego se objetiva en el núcleo y se integra en el genoma de la planta. Un tumor, agalla de corona, se forma en el sitio de inoculación en la mayoría de las plantas dicotiledóneas.

La formación de tumor resulta de la expresión de Oncogenes T-ADN que codifican los factores de crecimiento auxina y citoquinina que promueven la proliferación de células de planta. Con el fin de que se expresen estos oncogenes, el T-ADN primero se debe integrar en el genoma de la planta. La formación de tumor se limita a las plantas dicotiledóneas debido al TDNA, aunque se transfiere en las células de monocotiledóneas, ya sea que no se integre normalmente en el genoma de plantas monocotiledóneas o se integre y sea silencioso.

Al insertar un genoma vírico en el T-ADN, el *Agrobacterium* se puede utilizar para mediar la infección vírica de las plantas. Luego de la transferencia del T-ADN a las células de planta, se requiere la escisión del genoma vírico del T-ADN (movilización) para la infección vírica exitosa. Este método mediado por *Agrobacterium* para introducir un virus en un anfitrión de planta se conoce como agroinfección (para una revisión, ver Grimsley, "Agroinfection" pp. 325-342, in *Methods in Molecular Biology*, vol 44: *Agrobacterium Protocols*, ed. Gartland y Davey, Humana Press, Inc., Totowa, NJ; y Grimsley (1990) *Physiol. Plant.* 79:147-153). Luego de la entrada en el núcleo de la célula de planta, un genoma vírico circular de longitud unitaria que es capaz de iniciar infección sistémica se moviliza desde el T-ADN. No se requiere la integración del T-ADN en el genoma de la planta para este evento. Dos mecanismos no exclusivos, liberación replicativa y recombinación homóloga intramolecular, se han propuesto para esta liberación de genomas víricos circulares o intermedios de replicación de T-ADN. La liberación replicativa de genomas víricos mediante el mecanismo de replicación de círculo giratorio se ha demostrado para la movilización de genomas geminivirus de T-ADN (Stenger *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:8029-8033). También se ha demostrado la liberación de geminivirus por vía de recombinación homóloga entre genomas repetidos en forma de pares (Lazarowitz *et al.* (1989) *EMBO J.* 8:1023-1032).

La liberación mediante cualquiera de los mecanismos anteriores requieren la presencia de pares de copias del replicón vírico directamente repetidos en el T-ADN. Un replicón vírico circular se puede cortar del T-ADN mediante recombinación homóloga intramolecular entre los genomas repetidos. Para liberación replicativa, dos orígenes de secuencias de replicación pueden estar presentes para iniciar y completar el proceso de replicación. Ambos mecanismos de movilización son procesos bioquímicos complejos que se pueden atenuar mediante un número de factores que a su vez afectan la eficiencia de escisión vírica. Adicionalmente, los dímeros en pares del ADN vírico son frecuentemente difíciles de construir y son inestables en recombinación de células anfitrionas proeficientes.

Se ha reportado la agroinfección en un número de publicaciones como un método exitoso para inducir infecciones víricas sistémicas en células de planta, que incluyen plantas monocotiledóneas tal como maíz (Heath *et al.* (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:221-227, Grimsley *et al.* (1989) *Mol. Gen. Genet.* 217:309-316).

En muchos casos, particularmente cuando el ácido nucleico vírico desnudo no es infeccioso, la agroinfección es solo la forma de transformar una planta con ADN vírico clonado. Aún cuando el ácido nucleico vírico desnudo es infeccioso, la agroinfección se utiliza frecuentemente debido a que este es relativamente eficiente y no requiere la producción de grandes cantidades de plásmido o ADN vírico. La agroinfección se ha utilizado para estudiar la replicación vírica y recombinación, en la investigación de funciones de gen vírico, para la producción de vectores víricos que se replican autónomamente, para la expresión transitoria de genes insertados en el T-ADN, para la integración de ADN en un genoma de planta, para la producción de plantas resistentes a virus, para el estudio de elementos transponibles y para la determinación de susceptibilidad específica de tejido a la transferencia de T-ADN.

El desarrollo de vectores de gen de virus de plantas para la expresión de genes externos en las plantas proporciona un medio para proporcionar altos niveles de la expresión de gen dentro de un corto tiempo. Los beneficios de ARN transitorio basado en virus y replicones de ADN incluyen construcción por ingeniería conveniente y rápida acoplada con flexibilidad para la aplicación rápida en varias especies de planta. De esta forma, los virus de replicación autónoma ofrecen numerosas ventajas para uso como vehículos para la expresión transitoria de genes externos, que incluyen sus altos niveles de características de multiplicación y niveles concomitantes de expresión transitoria del gen. De acuerdo con lo anterior, sería benéfico proporcionar métodos que faciliten la construcción de vectores para agroinfección,

proporcionar flexibilidad en vectores víricos diseñados para transformación genética de células de planta e incrementar la eficiencia de movilización de replicones víricos a partir de T-ADN y el número de copia de una secuencia de ADN de interés asociada con el replicón vírico.

5 La presente invención cumple estos objetivos al proporcionar métodos y composiciones para la movilización de replicón vírico de T-ADN por vía de sistemas de recombinación específicos de sitio. La escisión mediada por recombinación específica de sitio de fragmentos de ADN de moléculas de ADN cromosómicas o extracromosómicas se ha descrito para un número de sistemas de recombinación específicos de sitio y especies de planta. Ver Russell *et al.* (1992) *Mol. Gen. Genet.* 234:49-59; Lyznik *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* 24: 3784-3789; y Dale *et al.* (1991) 10 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:10558-10562. Sin embargo, la movilización de vectores víricos a partir de T-ADN por vía de recombinación específica de sitio no se ha aplicado previamente para la transformación agromediada.

### Resumen de la invención

15 La invención se relaciona con métodos y composiciones para la movilización mediada por recombinasa específica de sitio de replicones víricos y los ADN asociados de interés de T-ADN. Los métodos de la invención comprenden transferencia mediada por *Agrobacterium* de T-ADN a una célula de planta, en donde el T-ADN contiene un replicón vírico flanqueado al repetir directamente sitios objetivo para una recombinasa específica de sitio y opcionalmente un ADN de interés ligado al replicón vírico. El ADN de interés también puede contener un sitio objetivo no idéntico para 20 la recombinasa. Un casete de expresión para la recombinasa específica de sitio está presente en el T-ADN o el genoma de planta, o se introduce transitoriamente en la célula de planta. La expresión de la recombinasa específica de sitio en las células de planta resulta en escisión del replicón vírico y el ADN asociado de interés. El replicón vírico y el ADN de interés luego se replican para el alto número de copias en la célula de planta anfitriona.

25 Los composiciones de la invención comprenden ácidos nucleicos, tal como T-ADN que contienen un ADN vírico flanqueado al repetir directamente sitios objetivo para una recombinasa específica de sitio. Los ácidos nucleicos de la invención pueden contener adicionalmente los casetes de expresión que codifican la recombinasa específica de sitio cognato para los sitios objetivo que flanquean el genoma vírico. Las composiciones de la invención comprenden adicionalmente *Agrobacterium* que contiene los ácidos nucleicos de la invención.

30 Las composiciones y métodos de la invención tienen uso en proporcionar altos números de copias de un ADN de interés para la expresión transitoria o para la integración en un cromosoma de planta, en simplificar la construcción y mantenimiento estable de vectores para la transformación agromediada de las plantas y en incrementar la eficiencia de agroinfección.

### Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 ilustra esquemáticamente un modelo de movilización de un replicón vírico de T-ADN mediante recombinación específica de sitio loxP/Cre.

40 La Figura 2 ilustra esquemáticamente escisión específica de sitio mediada por Cre de un ADN vírico y ADN de interés de un T-ADN.

45 La Figura 3 ilustra esquemáticamente la integración de ADN en un cromosoma mediante recombinación doble específica de sitio.

La Figura 4 muestra las secuencias 5' a 3' de los sitios loxP y FRT.

50 La Figura 5 ilustra esquemáticamente un protocolo PCR para la construcción de un ADN vírico flanqueado mediante sitios objetivo loxP y sitios de restricción XhoI.

### Descripción detallada de la invención

55 La invención se dirige a métodos y composiciones para la movilización de ADN vírico de T-ADN. En los métodos de la invención, un replicón vírico flanqueado al repetir directamente sitios objetivo para una recombinasa específica de sitio se inserta dentro de un T-ADN llevado por un replicón *Agrobacterium*. El T-ADN se transfiere en la célula de una planta mediante transferencia agromediada. La expresión de la recombinasa específica de sitio en la célula de planta infectada resultará en escisión de un replicón vírico circular del T-ADN transferido (Figura 1). La replicación de este replicón vírico resultará en un alto número de copias del replicón. La infección sistémica de la planta puede 60 tener lugar si el replicón codifica partículas víricas infecciosas. De acuerdo con lo anterior, los métodos de la invención tienen uso en la producción de ADN vírico y/o en promover la infección vírica sistémica de una planta.

Así, la invención se dirige al método para movilizar un replicón vírico de un T-ADN, que comprende:

65 a) proporcionar un replicón *Agrobacterium* que comprende un T-ADN, que contiene un replicón vírico flanqueado al repetir directamente sitios objetivo para una primera recombinasa específica de sitio; y

## ES 2 338 284 T3

- b) infectar una célula de una planta con un Agrobacterium que lleva dicho replicón Agrobacterium bajo condiciones que permiten la transferencia de dicho T-ADN y la expresión de dicha primera recombinasa en dicha célula;

5 en donde dicha célula, dicho T-ADN, o dicho replicón vírico comprende una secuencia de nucleótido que codifica dicha primera recombinasa o un fragmento activo o una variante activa de la misma, y dicha secuencia de nucleótido se liga operablemente a un promotor que controla la expresión en dicha célula.

10 La invención también proporciona un T-ADN que contiene un replicón vírico flanqueado al repetir directamente sitios objetivo para una primera recombinasa específica de sitio.

La invención también proporciona un replicón Agrobacterium que contiene dicho T-ADN.

15 La invención también proporciona un Agrobacterium que contiene dicho T-ADN.

La invención también proporciona una célula de planta que tiene una construcción de ADN que comprende en una orientación 5' a 3' o a 3' a 5' un primer sitio objetivo para una recombinasa específica de sitio, un replicón vírico, y un segundo sitio objetivo para dicha recombinasa específica de sitio, en donde dicho primer y dicho segundo sitio objetivo se repiten directamente y son idénticos con respecto uno del otro.

20 La invención también proporciona una planta que comprende tal una célula de planta.

La invención también proporciona una semilla transformada que comprende tal una célula de planta. Si un ADN de interés se ha insertado en el replicón vírico, o entre el replicón vírico y un sitio objetivo para una recombinasa específica de sitio, el ADN de interés también se replicará en alta copia. El alto número de copias del ADN de interés incrementa la eficiencia de integración de este ADN en el genoma, o el nivel de expresión transitoria de un gene codificado por el ADN de interés. Así, en otro aspecto, la invención proporciona un método para proporcionar a una célula de planta una pluralidad de copias de una secuencia de ADN de interés, que comprende:

30 a) proporcionar un replicón Agrobacterium que tiene un T-ADN, en donde dicho T-ADN contiene en una orientación 5' a 3' o 3' a 5', un primer sitio objetivo para una recombinasa específica de sitio, un replicón vírico, dicha secuencia de ADN de interés, y un segundo sitio objetivo para dicha recombinasa en repetición directa con dicho primer sitio objetivo, en donde dicho primer y segundo sitios objetivo son idénticos;

35 y

b) infectar una célula de una planta con un Agrobacterium que lleva dicho replicón Agrobacterium bajo condiciones que permiten la transferencia de dicho T-ADN y la expresión de dicha recombinasa en dicha célula;

40 en donde dicha célula, dicho T-ADN, o dicho replicón vírico contiene una secuencia de nucleótido que codifica dicha recombinasa o un fragmento activo o variante de la misma, y dicha secuencia de nucleótido se liga operablemente a un promotor que controla la expresión en dicha célula.

45 Los métodos de la invención son útiles para proporcionar un alto número de copias de un ADN de interés para la integración específica de sitio en un cromosoma de planta. En este caso, el cromosoma de planta contendrá uno o más sitios objetivo para una recombinasa específica de sitio. Dependiendo de los sustratos, el evento de recombinación puede consistir de un evento único o doble cruzado. En el caso más simple, el cromosoma de planta y el replicón vírico cortado cada uno contiene un único sitio objetivo. La recombinación específica de sitio entre estos dos sitios objetivo resulta en la inserción del replicón vírico y cualquiera asociado al ADN de interés en el cromosoma de planta.

50 La inclusión de un sitio objetivo no idéntico entre el replicón vírico y el ADN de interés permite la integración del ADN de interés en un genoma de planta que tiene un sitio objetivo correspondiente, sin inserción concomitante del replicón vírico. En este método, los extremos distales del replicón vírico y el ADN de interés se flanquean mediante sitios objetivo idénticos. La recombinación entre sitios objetivo idénticos resulta en escisión de un replicón vírico circular que contiene el ADN de interés flanqueado mediante sitios objetivo no idénticos para la recombinasa (Figura 2). Para la inserción objetivo del ADN de interés, los mismos dos sitios objetivo no idénticos están presentes en el genoma de organismos objetivo, estableciendo por lo tanto un sitio objetivo para la inserción del ADN de interés. Un evento cruzado doble resulta de la recombinación específica de sitio entre los sitios objetivo idénticos en el genoma anfitrión y el ADN de interés resulta en la inserción del ADN de interés en el cromosoma del organismo objetivo, libre del replicón vírico (Figura 3).

65 Así, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método para proporcionar a una célula de planta una pluralidad de copias de una secuencia de ADN de interés flanqueado mediante sitios objetivo no idénticos para una recombinasa específica de sitio, que comprende:

## ES 2 338 284 T3

- a) proporcionar un replicón *Agrobacterium* que tiene un T-ADN, en donde dicho T-ADN contiene en una orientación 5' a 3' o 3' a 5', un primer sitio objetivo para dicha recombinasa, un replicón vírico, un segundo sitio objetivo para dicha recombinasa, dicha secuencia de ADN de interés, y un tercer sitio objetivo para dicha recombinasa, en donde dicho primer y tercer sitios objetivo se repiten directamente y son idénticos con respecto uno del otro, y dicho segundo sitio objetivo no es idéntico en dicho primer y tercer sitios objetivo; y
- b) infectar una célula de una planta con un *Agrobacterium* que lleva dicho replicón *Agrobacterium* bajo condiciones que permiten la transferencia de dicho T-ADN y la expresión de dicha recombinasa en dicha célula; en donde dicha célula, dicho T-ADN, o dicho replicón vírico contiene una secuencia de nucleótido que codifica dicho o un fragmento activo o variante de la misma, y dicha secuencia de nucleótido se liga operablemente a un promotor que controla la expresión en dicha célula.

Las composiciones de la invención comprenden T-ADN que contiene un replicón vírico flanqueado al repetir directamente sitios objetivo para una recombinasa específica de sitio. En otro aspecto, las composiciones de la invención comprenden un T-ADN que contiene en una orientación 5' a 3' o 3' a 5', un primer sitio objetivo para dicha recombinasa, un replicón vírico, un segundo sitio objetivo para dicha recombinasa, dicha secuencia de ADN de interés, y un tercer sitio objetivo para dicha recombinasa, en donde dicho primer y tercer sitios objetivo se repiten directamente y son idénticos con respecto uno del otro, y dicho segundo sitio objetivo no es idéntico en dicho primer y tercer sitios objetivo. Los T-ADN de la invención pueden comprender adicionalmente la secuencia de nucleótido que codifica una recombinasa específica de sitio, en donde la secuencia de nucleótido se liga operablemente a un promotor que controla la expresión en una célula de planta. Las composiciones de la invención comprenden adicionalmente replicones que contienen estos T-ADN y *Agrobacterium* que contiene estos replicones.

“Movilización de un replicón vírico” significa escisión de un replicón vírico de una secuencia de T-ADN después que este se ha transformado en una célula de planta. En los métodos de la invención, se logra la movilización de ADN vírico mediante recombinación específica de sitio conservadora entre sitios objetivo directamente repetidos que flanquean el ADN vírico. En una realización, el producto resultante es un ADN vírico circularizado que contiene una copia del sitio objetivo (ver Figura 1).

“Replicón vírico” significa ADN bicatenario de un virus que tiene un genoma de ADN bicatenario o intermedio de replicación. El ADN vírico cortado es capaz de actuar como un replicón o intermedio de replicación, independientemente, o con factores suministrados en trans. El ADN vírico puede o no puede codificar partículas víricas infecciosas y adicionalmente puede contener inserciones, eliminaciones, sustituciones, redistribuciones u otras modificaciones. El ADN vírico puede contener ADN heterólogo. En este caso, el ADN heterólogo se refiere a cualquier ADN no vírico o ADN de un virus diferente. Por ejemplo, el ADN heterólogo puede comprender un casete de expresión para una proteína o ARN de interés.

Los replicones víricos adecuados para uso en los métodos y composiciones de la invención incluyen aquellos de virus que tienen un genoma de ADN circular o intermedio de replicación, tal como: virus mosaico Abutilon (AbMV), virus mosaico African cassava (ACMV), virus del rayado del banano (BSV), virus mosaico enano del fríjol (BDMV), virus mosaico dorado del fríjol (BGMV), virus de encrespamiento apical de la remolacha (BCTV), virus de amarillez occidental de la remolacha (BWYV) y otros luteovirus, virus latente cassava (CLV), virus de clavel grabado (CERV), virus mosaico del coliflor (CaMV), virus mosaico severo del caupi (CSMV), virus moteado amarillo de commelina (CoYMV), virus mosaico del pepino (CMV), virus mosaico dahlia (DaMV), virus de las estrías de digitaria (DSV), virus mosaico del pasto setaria (FMV), virus del herpes (HSV), virus del rayado del maíz (MSV), virus mosaico mirabilias (MMV), virus del rayado miscanasi (MiSV), virus de malformación del tubérculo de papa (PSTV), virus del enanismo del cacahuete (PSV), virus mosaico amarillo de la papa (PYMV), virus baciliforme del tungro del arroz (RTBV), virus de moteado clorótico de la soya (SoyCMV), virus jaspeado de la hoja de tabaco (SqLCV), virus del bandeado de hojas de la fresa (SVBV), virus del rayado de la caña de azúcar (SSV), cardo virus del moteado (ThMV), virus mosaico del tabaco (TMV), virus mosaico dorado del tomate (TMGV), virus moteado del tomate (TMoV), virus del mosaico anular del tabaco (TobRV), virus de enanismo amarillo del tabaco (TobYDV), virus de la hoja enroscada del tomate (TLCV), virus de la hoja enroscada amarilla del tomate (TYLCV), virus de la hoja enroscada amarilla del tomate Tailandés (TYLCV-t) y virus del trigo enano de la india (WDV) y derivados de los mismos. Preferiblemente el replicón vírico es de MSV, WDV, TGMV o TMV.

“T-ADN” significa el T-ADN de un plásmido Ti *Agrobacterium tumefaciens* o de un plásmido Ri *Agrobacterium rhizogenes*, o un derivado de los mismos. El T-ADN puede comprender un T-ADN completo, pero solo necesita comprender las secuencias mínimas requeridas in cis para transferencia (es decir, las secuencias límite izquierda y derecha de T-ADN). Los T-ADN de la invención se han insertado en ellos, donde sea entre las secuencias de límite derecho e izquierdo, un ADN vírico flanqueado por sitios objetivo para una recombinasa específica de sitio. El T-ADN puede contener eliminaciones, sustituciones y/o inserciones adicionales de ADN diferentes al genoma vírico y los sitios objetivo. Preferiblemente el T-ADN contiene un casete de expresión para la recombinasa cognato de los sitios objetivo que flanquea el ADN vírico. Las secuencias que codifican los factores requeridos in trans para la transferencia del T-ADN en una célula de planta, tal como genes *vir*, se pueden insertar en el T-ADN, o pueden estar presentes en el mismo replicón como el T-ADN, o en trans en un replicón compatible en el anfitrión *Agrobacterium*. Preferiblemente

los factores de acción trans requeridos para la transferencia de T-ADN están presentes en el mismo replicón como el T-ADN.

“Replicón Agrobacterium” significa cualquier replicón (por ejemplo, plásmido u otro vector) que es capaz de ser mantenido establemente en un anfitrión Agrobacterium. Tales replicones incluyen el cromosoma Agrobacterium, plásmidos Agrobacterium, cósmidos, fagémidos, etc., derivados de los mismos, y cualquier otro vector capaz de replicación estable en Agrobacterium. Por ejemplo, un vector binario adecuado para transferencia mediada por Agrobacterium y para manipulación fáciles recombinantes y replicación en otros organismos es útil en los métodos y composiciones de la invención. Preferiblemente el replicón es un plásmido Ti o Ri o un derivado del mismo.

En las composiciones y métodos de la invención, el replicón vírico es flanqueado al repetir directamente sitios objetivo para una recombinasa específica de sitio. “Flanqueado por” significa que los sitios objetivo pueden ser directamente contiguos con el ADN vírico o pueden ser una o más secuencias intervinientes presentes entre uno o ambos extremos del ADN vírico y los sitios objetivo. Las secuencias intervinientes de interés particular incluirían ligadores, adaptadores, marcadores seleccionables y/o otros sitios que ayudan en la construcción del vector o análisis y el casete de expresión para un gene de interés. Los sitios objetivo para recombinasas específicas de sitio se conocen por aquellos expertos en la técnica. Ejemplos de sitios objetivo incluyen, pero no se limitan a FRT, FRT1, FRT5, FRT6, FRT7, otros mutantes FRT, loxP, mutantes loxP, y similares. Los sitios loxP y FRT se muestran en la Figura 4.

“Directamente repetido” significa que los sitios objetivo que flanquean el ADN vírico se disponen en la misma orientación, ya que la recombinación entre estos sitios resulta en escisión, que en inversión, del ADN vírico.

“Recombinasa específica de sitio” significa cualquier enzima capaz de ser expresada funcionalmente en plantas, que cataliza la recombinación específica conservadora de sitio entre sus sitios objetivo correspondientes. Para revisiones de recombinasas específicas de sitio, ver Sauer (1994) Current Opinion in Biotechnology 5:521-527; Sadowski (1993) FASEB 7:760-767; cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia. Los métodos para utilizar sistemas de recombinación específicos de sitio para cortar fragmentos de ADN de ADN de planta cromosómica o extracromosómica se conocen por aquellos expertos en la técnica. El bacteriófago P1 loxP-Cre y el plásmido Saccharomyces 2P FRT/FLP de sistemas de recombinación específica de sitios se han estudiado extensivamente. Por ejemplo, Russell *et al.* (1992, Mol. Gen. Genet. 234:49-59) describe recombinasas, ver Sauer (1994) Current Opinion in Biotechnology 5: 521-527; y Sadowski (1993) FASEB 7:760-767. Los métodos para utilizar sistemas de recombinación específicos de sitio para cortar fragmentos de ADN de ADN de planta cromosómica o extracromosómica se conocen por aquellos expertos en la técnica. El bacteriófago P1 loxP-Cre y el plásmido Saccharomyces 2P FRT/FLP de sistemas de recombinación específica de sitios se han estudiado extensivamente. Por ejemplo, Russell *et al.* (1992, Mol. Gen. Genet. 234:49-59) describe la escisión de marcadores seleccionables de genomas de tabaco y Arabidopsis utilizando el sistema de recombinación específica de sitio loxP-Cre.

Se reconoce adicionalmente que la recombinasa, que se utiliza en la invención, dependerá de los sitios objetivo del organismo transformado y el casete objetivo. Que es, si se utilizan sitios FRT, se necesitará la recombinasa FLP. En la misma forma, donde se utilizan sitios lox, se requiere la recombinasa Cre. Si los sitios objetivo no idénticos comprenden un sitio FRT y un sitio lox, la recombinasa FLP y Cre o una recombinasa quimérica que tiene las funciones Cre y FLP se requerirá en las células de planta.

Los métodos de la invención comprenden la introducción de T-ADN a una célula de planta, en donde el T-ADN contiene un replicón vírico flanqueado al repetir directamente sitios objetivo para una recombinasa específica de sitio y opcionalmente un ADN de interés ligado al replicón vírico. El ADN de interés también puede contener un sitio objetivo no idéntico para la recombinasa. Un casete de expresión para la recombinasa específica de sitio está presente en el T-ADN o el genoma de planta, o se introduce transitoriamente en la célula de planta. La expresión de la recombinasa específica de sitio en las células de planta resulta en escisión del replicón vírico y el ADN asociado de interés. El replicón vírico y ADN de interés luego se replican para el alto número de copias en la célula de planta anfitriona.

Las composiciones de la invención comprenden ácidos nucleicos, tal como T-ADN que contienen un ADN vírico flanqueado al repetir directamente sitios objetivo para una recombinasa específica de sitio. La recombinasa específica de sitio puede ser una recombinasa de ocurrencia natural o un derivado de fragmento activo de la misma. Las recombinasas específicas de sitio útiles en los métodos y composiciones de la invención, incluyen recombinasas de las familias integrasa y resolvasa, derivados de las mismas, y cualquier otra enzima producida recombinantemente o de ocurrencia natural o derivado de la misma, que cataliza la recombinación específica conservadora de sitio entre los sitios de ADN específicos. La familia integrasa de recombinasas tiene cerca de treinta miembros e incluye FLP, Cre, Int y R. La familia resolvasa incluye resolvasa  $\gamma\delta$ . Las enzimas recombinantes que catalizan la recombinación conservadora específica de sitio incluyen moFLP.

Preferiblemente, la recombinasa es una que no requiere cofactores o un sustrato superenrollado. Tales recombinasas incluyen Cre, FLP y moFLP.

El moFLP se deriva de la recombinasa FLP de plásmido Saccharomyces 2P, pero se codifica por una secuencia de ácido nucleico utilizando codones que prefieren maíz. Aunque la secuencia de ácido nucleico moFLP incluye los codones preferidos para la expresión de aminoácidos en maíz, se entiende que una secuencia útil puede contener codones que ocurren en maíz con menos de las frecuencias de codón de maíz altamente reportadas.

Las recombinasas específicas de sitio y secuencias que los codifican que se utilizan en los métodos y composiciones de la invención pueden ser variantes de recombinasas de ocurrencia natural y los genes que las codifican. El término “variantes conservadoramente modificadas” aplica a secuencias de aminoácido y ácido nucleico. Con respecto a las secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas conservadoramente se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican variantes idénticas o conservadoramente modificadas de las secuencias de aminoácido. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican el aminoácido alanina. Así, en cualquier posición donde una alanina GCU codifica el aminoácido alanina. Así, en cualquier posición donde una alanina se especifica mediante un codón, el codón se puede alterar en cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas” y representan una especie de variación conservadoramente modificada. Una persona medianamente experta reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente solo el codón para metionina) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica.

Como para las secuencias de aminoácido, un experto reconocerá que las sustituciones individuales, eliminaciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o la secuencia de proteína que altera, agrega o elimina un aminoácido único o un porcentaje pequeño de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante conservadoramente modificada” donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Así, se puede alterar cualquier número de residuos de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de enteros que consisten de 1 a 15. Así, por ejemplo, se pueden hacer 1, 2, 3, 4, 5, 7, o 10 alteraciones. Las variantes conservadoramente modificadas proporcionan típicamente actividad biológica similar como la secuencia de polipéptido no modificada de la cual ellos se derivan. Por ejemplo, especificidad de sustrato, actividad de enzima, o unión de ligando/receptor es generalmente por lo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% de la proteína nativa para su sustrato nativo. Son bien conocidas en la técnica tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares.

Los siguientes seis grupos cada uno contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras para cada uno:

1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);

2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofán (W).

Ver Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company.

Cuando el ácido nucleico se prepara o se altera sintéticamente, se puede tener ventaja de preferencias de codón conocidas del anfitrión destinado donde el ácido nucleico se expresa. Por ejemplo, aunque las secuencias de ácido nucleico de la presente invención se pueden expresar en especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, las secuencias se pueden modificar para contar las preferencias de codón específicas y las preferencias del contenido de GC de monocotiledóneas o dicotiledóneas como estas preferencias se han mostrado por diferir (Murray *et al.* (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:477-498; y Campbell *et al.* (1990) *Plant Physiol.* 92:1). Así, el codón preferido de maíz para un aminoácido particular se puede derivar de secuencias de gen conocidas del maíz. El codón de maíz utilizado para 28 genes de plantas de maíz se lista en la Tabla 4 de Murray *et al.*, *supra*.

El gen de recombinasa FLP de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) está disponible comercialmente en plásmido pOG44 de Stratagene Cloning Systems (11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037). De forma similar, las secuencias de muchos otras recombinasas específicas de sitio y sus sitios objetivo cognato están disponibles comercialmente o públicamente.

Los genes que codifican una recombinasa específica de sitio, ADN vírico, T-ADN y sitios objetivo se pueden hacer utilizando (a) métodos recombinantes estándar, (b) técnicas sintéticas, o combinaciones de las mismas. El uso de los vectores de clonación, los vectores de expresión, adaptadores, y ligadores es bien conocido en la técnica y se puede encontrar en tales referencias como Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, New York, 1989). Una variedad de estrategias están disponibles para ligar fragmentos de ADN, la elección que depende de la naturaleza del terminal de los fragmentos de ADN y cuyas elecciones se pueden hacer fácilmente por aquellos expertos en la técnica. Para una descripción de varios ácidos nucleicos ver, por ejemplo, Stratagene Cloning Systems, Catálogos 1995, 1996, 1997 (La Jolla, CA); y, Amersham Life Sciences, Inc, Catálogo = 97 (Arlington Heights, IL). Se pueden obtener genes que codifican FLP, por ejemplo, al sintetizar genes con oligonucleótidos largos mutuamente cebados. Ver, por ejemplo, Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols In Molecular Biology*, páginas 8.2.8 a 8.2.13, Wiley Interscience (1990). También, ver Wosniak *et al.* (1987) *Gene* 60:115. Más aún, las técnicas actuales

utilizando la reacción de cadena polimerasa proporcionan la capacidad para sintetizar genes tan grandes como 1.8 kilobases en longitud (Adang *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 21:1131; Bombat *et al.* (1993) *PCR Methods and Applications* 2: 266).

5 A diferencia del uso de recombinasas de longitud completa, los fragmentos funcionales de recombinasas específicas de sitio se pueden utilizar en los métodos y composiciones de la invención. Los fragmentos funcionales de recombinasas específicas de sitio se pueden identificar utilizando una variedad de técnicas tal como análisis de restricción, análisis Southern, análisis de extensión cebador, y análisis de secuencia de ADN. El análisis de extensión  
10 cebadora o análisis de protección de nucleasa S1, por ejemplo, se puede utilizar para localizar el sitio de inicio putativo de transcripción del gen clonado. Ausubel en las páginas 4.8.1 a 4.8.5; Walmsley *et al.*, *Quantitative and Qualitative Analysis of Exogenous Gene Expression by the S1 Nuclease Protection Assay*, in *Methods In Molecular Biology*, Vol. 7: *Gene Transfer and Expression Protocols*, Murray (ed.), páginas 271-281 (Humana Press, Inc. 1991). Por ejemplo, los fragmentos funcionales de la proteína FLP se pueden identificar por su capacidad, luego de introducción a células que contienen sustratos FRT apropiados, para catalizar la recombinación específica de sitio (por ejemplo, escisión de  
15 una secuencia flanqueada FRT que luego de la remoción activará un gen marcador que se puede ensayar.

El alcance general de tal análisis funcional involucra fragmentos de subclonación de ADN de un clon genómico, clon de cADN o secuencia de gen sintetizada en un vector de expresión, que introduce el vector de expresión en un anfitrión heterólogo, y que detecta para detectar el producto de recombinación (es decir utilizando análisis de restricción para verificar el producto de recombinación en el nivel de ácido nucleico, o que se basa en un sistema de ensayo  
20 para recombinación como se describió anteriormente). Son bien conocidos los métodos para generar fragmentos de un CADN o clon genómico. Las variantes de un ADN aislado que codifica una recombinasa específica de sitio se puede producir al eliminar, agregar y/o sustituir nucleótidos. Tales variantes se pueden obtener, por ejemplo, mediante mutagenia dirigida a oligonucleótido, mutagenia de exploración de ligador, mutagenia utilizando la reacción de cadena polimerasa, y similares. Ver, por ejemplo, Ausubel, páginas 8.0.3-8.5.9. También, ver generalmente, McPherson (ed.), *Directed Mutagenesis: A Practical approach*, (IRL Press, 1991).

La secuencia de ácido nucleico que codifica la recombinasa específica de sitio se liga operablemente a un promotor que controla la expresión en una planta. Como se utiliza aquí “ligado operablemente” incluye referencia a un ligado  
30 funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en donde la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN que corresponde a la segunda secuencia. Generalmente, ligado operablemente significa que las secuencias de ácido nucleico que se ligan son contiguas y, donde sea necesario para unir dos regiones que codifican la proteína, contiguas y en el mismo marco de lectura.

35 Como se utiliza aquí “promotor” incluye referencia a una región de ADN en la dirección 5’ del inicio de transcripción y se involucra en el reconocimiento y la unión de polimerasa de ARN y otras proteínas para iniciar transcripción. Un “promotor de planta” es un promotor capaz de iniciar la transcripción en células de planta. Promotores de planta de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se obtienen de plantas, virus de planta, y genes de bacterias que se expresan en células de planta tal como aquellas de *Agrobacterium* o *Rhizobium*. Los promotores heterólogos  
40 y no heterólogos (es decir, endógenos) se pueden emplear para dirigir la expresión de una secuencia que codifica una recombinasa específica de sitio. El promotor puede ser constitutivo, inducible o específico de tejido.

Muchos diferentes promotores constitutivos se pueden utilizar en la actual invención. Promotores constitutivos de ejemplo incluyen lo promotores de virus de planta tal como el promotor 35S de CaMV (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812) y los promotores de tal gen como actina de arroz (McElroy *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:163-171); ubiquitina (Christensen *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 y Christensen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last *et al.* (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); histona H3 de maíz H3 (Lepetit *et al.* (1992) *Mol. Gen. Genet.* 231: 276-285 y Atanassova *et al.* (1992) *Plant Journal* 2(3):291-300); el promotor 1’- o 2’-derivado de T-ADN de *Agrobacterium tumefaciens*, el promotor ubiquitina 1, el promotor  
50 Smas, el promotor deshidrogenada de alcohol cinnamilo (Patente Estadounidense No. 5,683,439), el promotor Nos, el promotor Pemu, el promotor rubisco, el promotor GRP1-8, y otras regiones de inicio de transcripción de varios genes de planta conocidas por aquellos expertos. El promotor ALS, un fragmento XbaI/NcoI de cebador 5 en el gen estructural *Brassica napus* ALS3 (o una secuencia de nucleótido que tienen similitud de secuencia sustancial en dicho fragmento XbaI/NcoI), representa un promotor constitutivo particularmente útil para dicotiledóneas. (Ver Solicitud de Patente Estadounidense Internacional Pioneer Hi-Bred copendiente 08/409,297 (Patente Estadounidense  
55 No. 5,659,026, presentada en Agosto 19 1997).

Una variedad de promotores inducibles se puede utilizar en la actual invención. Ver Ward *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:361-366. Los promotores inducibles de ejemplo incluyen que del sistema ACE1 que responde al cobre (Mett  
60 *et al.* (1993) *PNAS* 90:4567-4571); el gen In2 del maíz que responde a aseguradores herbicidas bencenosulfonamida (Hershey *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genetics* 227: 229-237 y Gatz *et al.* (1994) *Mol. Gen. Genetics* 243: 32-38); el promotor Adh1 que es inducible por hipoxia o tensión de frío, el promotor Hsp70 que es inducible por tensión de calor, y el promotor PPK que es inducible por luz; o represor Tet de Tn10 (Gatz *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237. Un promotor inducible particularmente preferido es un promotor que responde a un agente que induce a  
65 que las plantas no respondan normalmente. Un promotor inducible de ejemplo es el promotor inducible de la actividad transcripcional de un gen de hormona esteroide del que se induce mediante una hormona glucocorticosteroide (Schena *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 10421).

Ejemplos de promotores bajo control de desarrollo incluyen promotores que inician transcripción solo, o preferencialmente, en ciertos tejidos, tal como hojas, raíces, frutos, semillas, o flores. La operación de un promotor también puede variar dependiendo de su ubicación en el genoma. Así, un promotor inducible puede llegar a ser completamente o parcialmente constitutivo en ciertas ubicaciones.

La recombinasa específica de sitio se puede expresar en las células de planta con el fin de movilización del ADN vírico del T-ADN. De acuerdo con lo anterior, la proteína recombinasa se puede expresar ya que esta está presente en la célula en una concentración efectiva algunas veces cuando el T-ADN se transfiere a las células de planta y antes del T-ADN no integrado se pierde de las células de planta.

De acuerdo con lo anterior, el casete de expresión que codifica la recombinasa específica de sitio se puede suministrar en el TADN en cis al ADN vírico; en trans en un cromosoma de planta o replicón extracromosómico; o se puede transferir a la planta cerca al tiempo de transformación agromediada. El gen recombinasa específica de sitio se puede expresar constitutivamente o transitoriamente, o puede ser inducible. Si se requieren cofactores para un sistema de recombinación específica de sitio particular, ellos se pueden codificar en el TADN de la invención o en el ADN cromosómico o extracromosómico de anfitrión de planta.

“Sitio objetivo para una recombinasa específica de sitio” significa una secuencia de ADN que se reconoce por una recombinasa específica de sitio particular. Una variedad de sitios objetivo se conocen por aquellos expertos en la técnica y se pueden utilizar en los métodos y composiciones de la invención. El sitio puede tener la secuencia del sitio cognato para una recombinasa dada, o se puede modificar, mientras este es capaz de actuar como un sitio objetivo. El sitio puede contener las secuencias mínimas necesarias para recombinación, o este puede contener secuencias adicionales que mejoran la recombinación. Ejemplos de sitios objetivo para uso en la invención se conocen en la técnica e incluyen FRT y sitios loxP (Ver, por ejemplo, Schlake y Bode (1994) *Biochemistry* 33: 12746-12751; Huang *et al.* (1991) *Nucleic Acids Research* 19:443-448; Paul D. Sadowski (1995) *In Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* vol. 51, pp. 53-91; Michael M. Cox (1989) *In Mobile ADN*, Berg y Howe (eds) American Society of Microbiology, Washington D.C., pp. 116- 670; Dixon *et al.* (1995) 18: 449-458; Umlauf and Cox (1988) *The EMBO Journal* 7: 1845-1852; Buchholz *et al.* (1996) *Nucleic Acids Research* 24:3118-3119; Kilby *et al.* (1993) *Trends Genet.* 9:413-421; Rossant and Geagy (1995) *Nat. Med.* 1: 592-594; Lox Albert *et al.* (1995) *The Plant J.* 7:649-659; Bayley *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:353-361; Odell *et al.* (1990) *Mol. Gen. Genet.* 223:369-378; y Dale y Ow (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10558-105620; Qui *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1706-1710; Stuurman *et al.* (1996) *Plant Mol. Biol.* 32: 901-913; Hartley *et al.* (1980) *Nature* 286: 860-864; Sauer (1994) *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527; y Dale *et al.* (1990) *Gene* 91:79-85).

Cada sitio loxP y FRT contiene 13 pares base que invierte repeticiones que flanquean el espaciador de 8 pares base. El sitio FRT contiene una repetición de 13 pares base no esencial adicional. Las secuencias de los sitios loxP y FRT se muestran en la Figura 1. Un sitio FRT mínimo que comprende dos repeticiones de 13 pares base, separado por un espaciador de 8 bases, es:

5'-GAAGTTCCTATTC[TCTAGAAA]  
GTATAGGAAC TTC3'

en donde los nucleótidos dentro de los paréntesis indican la región espaciadora. Los nucleótidos en la región espaciadora se pueden reemplazar con una combinación de nucleótidos, mientras las dos repeticiones de 13-bases se separan por ocho nucleótidos. El FLP es una recombinasa específica de sitio, conservadora, capaz de catalizar la inversión de una secuencia de ácido nucleico posicionada entre dos FRT orientados inversamente; la recombinación entre dos moléculas cada una que contiene un sitio FRT; y escisión entre los sitios FRT. La región de núcleo no es simétrica, y dicta asimétricamente la direccionalidad de la reacción. La recombinación entre los sitios FRT invertidos origina la inversión de una secuencia de ADN entre ellos, aunque la recombinación entre los sitios directamente orientados conduce a escisión del ADN entre ellos.

Los T-ADN que contienen ADN vírico flanqueado mediante sitios de recombinación, los casetes de expresión para recombinasas específicas de sitio y los vectores que llevan estas secuencias se pueden construir utilizando técnicas de biología molecular estándar. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.* (eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold Spring Harbor, NY 1989).

Los vectores típicos útiles en los métodos y composiciones de la invención son bien conocidos en la técnica e incluyen vectores derivados del plásmido que induce tumor (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens* descrito por Rogers *et al.* (1987) *Meth. in Enzymol.*, 153:253-277. Estos vectores son vectores que integran plantas en que en transformación, los vectores integran una porción del vector ADN en el genoma de la planta anfitriona. Los vectores A. tumefaciens de ejemplo útiles aquí son plásmidos pKYLX6 y pKYLX7 de Schardl *et al.*, *Gene*, 61:1-11 (1987) y Berger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:8402-8406 (1989). Otro vector útil aquí es el plásmido pBI101.2 que está disponible de Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA).

Las técnicas para transformar una amplia variedad de especies mayores de planta son bien conocidas y se describen en la literatura técnica, científica y de patente. Ver, por ejemplo, Weising *et al.*, *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477 (1988). Estos métodos son útiles para transformar una célula de planta con un casete de expresión de recombinasa específica

de sitio. Esta etapa será necesaria si el casete no se incluye en el T-ADN transferido. El casete de expresión que codifica la recombinasa específica de sitio puede estar presente en el genoma de planta antes de Agroinfección o se puede transformar en la planta alrededor del tiempo de la transferencia del T-ADN a las células de planta ya que este se expresará transitoriamente. Por ejemplo, la construcción de ADN se puede introducir directamente en el ADN genómico de las células de planta utilizando técnicas tal como electroporación, poración PEG, bombardeo de partícula, suministro de fibra de silicona, microinyección de protoplastos de células de planta o callos embrionarios, o transformación mediada por *Agrobacterium* (Hiei *et al.* (1994) *Plant J.* 6:271-282).

La introducción de construcciones de ADN utilizando precipitación de polietilenglicol se describe en Paszkowski *et al.*, *Embo J.* 3: 2717-2722 (1984). Se describen técnicas de electroporación en Fromm *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 5824 (1985). Se describen técnicas de transformación balística en Klein *et al.*, *Nature* 327: 70-73 (1987).

También se puede introducir ADN en plantas mediante transferencia directa de ADN en polen como se describe por Zhou *et al.*, *Métodos in Enzymology*, 101:433 (1983); D. Hess, *Intern Rev. Cytol.*, 107:367 (1987); Luo *et al.*, *Plane Mol. Biol. Reporter*, 6:165 (1988). La expresión de genes que codifican polipéptido se puede obtener mediante inyección del ADN en órganos reproductivos de una planta como se describe por Pena *et al.*, *Nature*, 325:274 (1987). El ADN también se puede inyectar directamente en células de embriones inmaduros y la rehidratación de embriones disecados como se describe por Neuhaus *et al.*, *Theor. Appl. Genet.*, 75:30 (1987); y Benbrook *et al.*, in *Proceedings Bio Expo 1986*, Butterworth, Stoneham, Mass., pp. 27-54 (1986). Una variedad de virus de planta que se pueden emplear como vectores se conocen en la técnica e incluyen virus mosaico del coliflor (CaMV), geminivirus, virus mosaico de cebadilla, y virus mosaico del tabaco.

Las células de plantas transformadas establemente con un casete de expresión de recombinasa específica de sitio se puede regenerar, por ejemplo, de células únicas, tejido de callo o discos de hoja de acuerdo con técnicas de cultivo de tejido de planta estándar. Se conoce bien en la técnica que varias células, tejidos, y órganos de casi cualquier planta se puede cultivar exitosamente para regenerar una planta completa. La regeneración de planta de protoplastos de cultivo se describe en Evans *et al.*, *Protoplasts Isolation and Culture*, Handbook of Plant Cell Culture, Macmillan Publishing Company, New York, pp. 124-176 (1983); y Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, CRC Press, Boca Raton, pp. 21-73 (1985).

La regeneración de las plantas que contienen el gen recombinasa introducido por *Agrobacterium* de explantes de hoja se puede lograr como se describe por Horsch *et al.*, *Science*, 227:1229-1231 (1985). En este procedimiento, los transformantes se hacen crecer en la presencia de un agente de selección y en un medio que induce la regeneración de brotes en especies de plantas transformadas como se describe por Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:4803 (1983). Este procedimiento típicamente produce brotes dentro de dos a cuatro semanas y estos brotes transformantes luego se transfieren a un medio que induce raíz apropiada que contiene el agente selectivo y un antibiótico para evitar el crecimiento bacteriano. Las plantas transgénicas de la presente invención pueden ser fértiles o estériles.

La regeneración también se puede obtener de callos de planta, explantes, órganos, o partes de la misma. Tales técnicas de regeneración se describen generalmente en Klee *et al.*, *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38: 467-486 (1987). La regeneración de las plantas de protoplastos de única planta o varios explantes son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, *Methods for Plant Molecular Biology*, A. Weissbach y H. Weissbach, eds., Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1988). Este proceso de regeneración y crecimiento incluye las etapas de selección de células y brotes transformantes, enraizar los brotes transformantes y crecimiento de las plántulas en el suelo. Para el cultivo de células de maíz y regeneración ver generalmente, *The Maize Handbook*, Freeling y Walbot, Eds., Springer, New York (1994); *Corn and Corn Improvement*, 3ra edición, Sprague and Dudley Eds., American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin (1988).

Un experto reconocerá que después que se incorpora establemente el casete de expresión de recombinasa específica de sitio en plantas transgénicas y se confirma que es operable, este se puede introducir en otras plantas mediante cruzamiento sexual. Cualquiera de un número de técnicas cultivo estándar se puede utilizar, dependiendo de las especies a ser cruzadas.

Los métodos y composiciones de la invención son útiles para movilizar ADN vírico de los T-ADN transferidos mediante agroinfección a cualquier anfitrión de planta. Como se utiliza aquí, el término "planta" incluye referencia a plantas completas, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas y células de planta y progenie de las mismas. La célula de planta, como se utiliza aquí incluye, sin limitación, cultivos de suspensión de semilla, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen, y microsporas. La clase de plantas que se pueden utilizar en los métodos de la invención es generalmente tan amplio como la clase de plantas mayores aconsejables para técnicas de transformación de *Agrobacterium*, que incluyen plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Una monocotiledónea particularmente preferida es maíz. Otras monocotiledóneas de interés particular incluyen trigo, arroz, cebada, sorgo y centeno. Las dicotiledóneas de interés particular incluyen soya, Brassica, girasol, alfalfa, y coliflor.

El T-ADN que contiene el ADN vírico flanqueado por los sitios para una recombinasa específica de sitio se transfiere a una célula de planta mediante agroinfección. Las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium tumefaciens* se describen bien en la literatura científica. Ver, por ejemplo Horsch *et al.*, *Science* 233: 496-498 (1984), Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 4803 (1983) y Kado, (1991), *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:1. Se proporcionan descrip-

ciones de los sistemas de vector *Agrobacterium* y métodos para transferencia mediada por *Agrobacterium* en Gruber *et al.*, *supra*; Miki, *et al.*, *supra*; y Moloney *et al.* (1989), *Plant Cell Reports* 8:238. Aunque el *Agrobacterium* es principalmente útil en dicotiledóneas, se pueden transformar ciertas monocotiledóneas mediante *Agrobacterium*. Por ejemplo, se describe la transformación de *Agrobacterium* de maíz en la Patente Estadounidense No. 5,550,318. Otros métodos de agroinfección incluyen transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes* (ver, por ejemplo, Lichtenstein and Fuller In: *Genetic Engineering*, vol. 6, PWJ Rigby, Ed., London, Academic Press, 1987; y Lichtenstein, C. P., y Draper, J., In: *ADN Cloning*, Vol. II, D. M. Glover, Ed., Oxford, IRI Press, 1985), Application PCT/US87/02512 (WO 88/02405 publicado en Abr. 7, 1988) describe el uso de la cepa *A. rhizogenes* A4 y su plásmido Ri junto con vectores *A. tumefaciens* pARC8 o pARC16.

Los métodos y vectores optimizados para la transformación mediada por *Agrobacterium* de las plantas en la familia Graminae, tal como arroz y maíz se han descrito por Heath *et al.* (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 221-227; Hiei *et al.* (1994) *Plant J.* 6:271-282 y Ishida *et al.* (1996) *Nat. Biotech.* 14:745-750.

La eficiencia de transformación de maíz se afecta por una variedad de factores que incluyen los tipos y etapas de tejido infectado, la concentración de *Agrobacterium*, el medio de cultivo de tejido, los vectores Ti y el genotipo de maíz. Los vectores super binarios que llevan los genes vir de cepas *Agrobacterium* A281 y A348 son útiles para la transformación de alta eficiencia de monocotiledóneas. Sin embargo, aún sin el uso de vectores de alta eficiencia, se ha demostrado que el T-ADN se transfiere al maíz en una eficiencia que resulta en infección sistémica por virus introducidos mediante agroinfección, aunque no se forman tumores (Grimsley *et al.* (1989) *Mol. Gen. Genet.* 217: 309-316). Esto se debe a la integración del T-ADN que contiene el genoma vírico que no se requiere para multiplicación vírica, ya que el genoma vírico cortado actúa como un replicón independiente.

Otro protocolo de transformación básico útil involucra una combinación de lesión de tejido mediante bombardeo de partículas, seguido por el uso de *Agrobacterium* para suministro de ADN, como se describe por Bidney *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 301-313. En general, el método de transformación intacto meristema involucra embeber la semilla durante 24 horas en la oscuridad, remover las cotiledóneas y los radicales de raíz, seguido por el cultivo de los explantes meristema. Veinticuatro horas después, se remueven las hojas primarias para exponer el meristema de ápice. Los explantes se colocan del domo del ápice hacia arriba y se bombardean, por ejemplo, dos veces con partículas, seguido por cocultivo con *Agrobacterium*. Para iniciar el cocultivo para meristemas intactos, el *Agrobacterium* se coloca en el meristema. Después de aproximadamente un periodo de 3 días de cocultivo los meristemas se transfieren al medio de cultivo con agentes de selección.

El método de división de meristema involucra la semilla embebida, el rompimiento de las cotiledóneas para producir una fractura limpia en el plano del eje embrionario, el corte de la punta de la raíz y luego bisectar los explantes longitudinalmente entre las hojas primordiales. Las dos mitades se colocan cortadas en la superficie en el medio luego de bombardear dos veces con partículas, seguido por cocultivo con *Agrobacterium*. Para la división de meristemas, después de bombardeo, los meristemas se colocan en una suspensión de *Agrobacterium* durante 30 minutos. Ellos luego se remueven de la suspensión en medio de cultivo sólido para cocultivo de tres días. Después de este periodo, los meristemas se transfieren a medio fresco con cefotaxima (más agentes de selección).

La escisión de ADN vírico del T-ADN se puede determinar por una variedad de medios que incluyen pero no se limitan a observación de lesiones víricas u otros signos de infección vírica en la planta, por detección basada en anticuerpo de proteínas víricas, por amplificación de productos PCR específicos al genoma circular, o por análisis Northern para ARN vírico. Adicionalmente, los ensayos para actividad recombinasa FLP se conocen y generalmente miden la actividad general de la enzima en los sustratos ADN que contienen sitios FRT. En esta forma, se puede determinar una frecuencia de escisión de la secuencia. La escisión de ADN de una molécula lineal o frecuencia intermolecular de recombinación inducida por la enzima se puede evaluar, como se describe, por ejemplo, en Babineau *et al.* (1985) *JBC* 260:12313; Meyer-Leon *et al.* (1987) *NA Res* 15:6469; y Gronostajski *et al.* (1985) *JBC* 260:12328.

Los siguientes ejemplos se ofrecen por vía de ilustración no por vía de limitación.

## Experimentos

### Ejemplo 1

#### *Construcción de Vectores de T-ADN que Contienen ADN vírico Flanqueado por Sitios de Recombinación específica de Sitio*

Los fragmentos de ADN que contienen ADN vírico flanqueado por sitios de recombinación específica de sitio FRT o loxP se construyen al sintetizar, hibridar y ligar oligonucleótidos complementarios o al crear cebadores para amplificación PCR de un producto de ADN que contiene el sitio FRT o loxP y sitios de restricción útiles para clonación en T-ADN cerca al extremo 5' del producto PCR.

Por ejemplo, los cebadores PCR largos se pueden designar en donde el extremo 3' del cebador hibrida al extremo 5' del genoma vírico de interés y el extremo 5' del cebador que contiene adicionalmente un sitio LoxP y sitios de clonación útiles (Ver Figura 5). El producto PCR resultante se digiere con la enzima de restricción apropiada y se inserta en el T-ADN de un vector binario *Agrobacterium* como se describe por Bevan, M. (1984) *Nucl. Acids Res.*

## ES 2 338 284 T3

12: 8711-8721: Un casete de expresión para Cre también se inserta en el T-ADN. Las construcciones resultantes se transforman en *E. coli*, se detectan, y luego se transfieren al *Agrobacterium*.

### 5 Ejemplo 2

#### *Transferencia de T-ADN a Células de Plantas Dicotiledóneas*

10 Se propagan células *Nicotiana tabacum* BY-2 en medio Murashige y Skoog (Gibco BRL) que contiene 3% de sacarosa, 1  $\mu\text{g/ml}$  de tiamina, 0.2  $\mu\text{g/ml}$  de 2,4-D, y 370  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Se propagan células de maíz Black Mexican Sweet (BMS) en medio Murashige y Skoog que contiene 2% de sacarosa, 2  $\mu\text{g/ml}$  de 2,4-D, 0.2 mg/ml de mioinositol, 0.13 mg/ml de L-asparagina, 0.13  $\mu\text{g/ml}$  de ácido nicotínico, y 0.25  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de tiamina, piridoxina, y ácido pantoténico. Los cultivos se agitan a 140 rpm en 25°C en luz continua.

15 Para infectar células de planta, la actividad de gen de virulencia (vir) se induce mediante tratamiento con acetosiringona en *Agrobacterium* que lleva el vector construido en el Ejemplo 1. Se hacen crecer células de *Agrobacterium* en una densidad de  $2 \times 10^9$  células por ml ( $A = 100$ , utilizando un espectrofotómetro Klett-Summerson, filtro rojo) en medio de AB-sacarosa. Las células se centrifugan a 10,000 g, se suspenden en una concentración de  $1 \times 10^9$  células por ml ( $A = 50$ ) en medio de inducción (sales AB, 0.5% de glucosa, 2 mM fosfato de sodio, 50 mM Mes, Ph 5.6, 20 50  $\mu\text{M}$  acetosiringona), y se incuban con agitación gentil a 25°C durante 14 a 18 hr. Después de lavar las células bacterianas en medio de cultivo de planta, se inoculan células de planta con *Agrobacterium* inducido (-20 células bacterianas por célula de planta, excepto donde se nota otra cosa) y se cocultiva a 25°C con agitación a 140 rpm durante varios periodos. La mayor parte de las bacterias se lava mediante centrifugación de la mezcla de cocultivo a 300 rpm (centrífuga clínica modelo GLC-2; Beckman Sorvall, Newtown, CT) durante 2 min. El glóbulo de células de planta se 25 suspende y se lava una vez más en medio de cultivo de planta y luego se resuspende en cultivo que contiene 100  $\mu\text{g/ml}$  de timentina o 200  $\mu\text{g/ml}$  de cefotaxima. La movilización de genomas víricos del T-ADN se monitorea al cuantificar partículas víricas infecciosas.

### 30 Ejemplo 3

#### *Transferencia de T-ADN a Plantas monocotiledóneas*

35 Antes de inoculación, las cepas de *Agrobacterium* que llevan el vector construido en el Ejemplo 1 se rayan en YEB (Grimsley *et al.* (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:3282-3286) placas solidificadas con 1.5% de agar y complementado con 100  $\mu\text{g/ml}$  de rifampicina y 25  $\mu\text{g/ml}$  de canamicina y que permite crecimiento durante 48 h. Se utiliza una colonia única para inocular 10 ml de medio YEB líquido en un matraz Erlenmeyer de 100 ml complementado con antibióticos como anteriormente. Se continúa el crecimiento con agitación a 200 r.p.m. durante 24 h, luego 500  $\mu\text{l}$  de este cultivo se utiliza para inocular un matraz similar y continúa el crecimiento durante 20h adicionales. Este procedimiento produce una densidad final de células viables de *Agrobacterium* en la región de 109/ml (estimado por placas). 40 Las células luego se cosechan mediante centrifugación y se resuspenden en un volumen igual de 10 mM  $\text{MgSO}_4$  sin antibióticos; tal una suspensión se refiere posteriormente como no diluido o dilución  $10^0$ ; para experimentos que involucran una serie de dilución de 10 mM  $\text{MgSO}_4$  también se utiliza como el diluyente.

45 Las semillas de maíz para plantas de 10 días de edad se siembran en potes en un fitotrón en un ciclo de 12 horas luz/oscuridad a 25°C en una intensidad de luz de aproximadamente 10000 lux (lámparas fluorescentes Sylvania 215 W tipo F96T12/CW/VHO) luego se mueven al laboratorio de contención BL3 inmediatamente antes de inoculación; se han descrito condiciones de crecimiento posteriores (Grimsley *et al.* (1987) Nature 325:177-179). Se preparan plántulas de tres días de edad mediante (i) esterilización mediante agitación durante 20min en 0.7% de solución de 50 hipoclorito de calcio, (ii) lavar tres veces (agitando durante 20 min cada vez) en agua destilada estéril (iii) preparar platos Petri presterilizados de 9cm de diámetro con 3 láminas de papel de filtro estéril de 8.5 cm de diámetro Macherey-Nagel (Alemania) en el fondo y ca. 10 ml de agua estéril por plato, (iv) poner ca. 20 semillas en cada plato de geranio, y (v) incubar en la oscuridad a 28°C durante 3 días, o hasta la distancia entre el nodo de escudo y la punta de ápice de los coleóptilos es 1-2 cm.

55 Para la inoculación de las plantas, se carga una jeringa fija de 50  $\mu\text{l}$  o 100  $\mu\text{l}$  Hamilton con una aguja desechable de 0.4 mm de diámetro con la suspensión bacteriana que evita atrapar burbujas de aire. Entre las inoculaciones con diferentes cepas bacterianas la aguja se descarga y la jeringa se enjuaga 3 veces con 100% etanol y 3 veces con agua destilada estéril. Se inoculan plantas de 10 días de edad mediante (i) abrasión de una hoja superior, aplicando 20  $\mu\text{l}$  de 60 suspensión, y se frota con polvo de carborundo hasta que la hoja parece húmeda, (ii) inyección de 10  $\mu\text{l}$  de suspensión bacteriana en la parte central de la planta justo antes de la primera lámina de hoja, o 1 cm por debajo de la primera lámina de hoja, o en la base de la planta, en la región meristemática donde las raíces accidentales comienzan luego a aparecer. Se inyectan plántulas de tres días de edad con 10  $\mu\text{l}$  de suspensión bacteriana en diferentes formas al (i) empujar la aguja a través de la punta de ápice del coleóptilo al nodo coleoptilar, (ii) inyectar 2mm por debajo la 65 punta de ápice del coleóptilo, (iii) 2 mm por encima del nodo coleoptilar, (iv) en el nodo coleoptilar, (iv) 2 mm por debajo del nodo coleoptilar, (v) en el nodo de escudo, y al empujar la aguja a través de la raíz principal en una región cercana al nodo de escudo. Se utiliza diez  $\mu\text{l}$  como un inóculo estándar de suspensión bacteriana, pero solo 1-2  $\mu\text{l}$  permanece rutinariamente en el sitio de inoculación, el resto se fuerza, usualmente salen del punto de entrada de la

## ES 2 338 284 T3

aguja inoculante. Luego de inoculación se plantan las plántulas inmediatamente en suelo húmedo, se incuban como anteriormente (Grimsley *et al.* (1987) Nature 325: 177-179), y observan diariamente para la aparición de síntomas de infección vírica, caracterizado por la aparición de manchas amarillas y/o bandas en la base de nuevas hojas.

5        Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la especificación son indicadoras del nivel de aquellos expertos en la técnica al cual esta invención pertenece.

10        Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle por vía de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de entendimiento, será obvio que ciertos cambios y modificaciones se pueden practicar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para movilizar un replicón vírico de un T-ADN, que comprende:

- a) proporcionar un replicón Agrobacterium que comprende un T-ADN, que contiene un replicón vírico flanqueado al repetir directamente sitios objetivo para una recombinasa específica de sitio; y
- b) infectar una célula de una planta con un Agrobacterium que lleva dicho replicón Agrobacterium bajo condiciones que permiten la transferencia de dicho T-ADN y la expresión de dicha recombinasa específica de sitio en dicha célula; en donde dicha célula, dicho T-ADN, o dicho replicón vírico comprende una secuencia de nucleótido que codifica dicha recombinasa o un fragmento activo o una variante activa de la misma, y dicha secuencia de nucleótido se liga operablemente a un promotor que controla la expresión en dicha célula.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método proporciona a dicha célula de planta una pluralidad de copias de una secuencia de ADN de interés y en donde dicho T-ADN contiene en una orientación 5' a 3' o 3' a 5', un primer sitio objetivo para dicha recombinasa específica de sitio, dicho replicón vírico, dicha secuencia de ADN de interés, y un segundo sitio objetivo para dicha recombinasa en repetición directa con dicho primer sitio objetivo, en donde dicho primer y segundo sitios objetivo son idénticos.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método proporciona a una célula de planta una pluralidad de copias de una secuencia de ADN de interés, en donde dicho T-ADN contiene en una orientación 5' a 3' o 3' a 5', un primer sitio objetivo para dicha recombinasa, dicho replicón vírico, un segundo sitio objetivo para dicha recombinasa, dicha secuencia de ADN de interés, y un tercer sitio objetivo para dicha recombinasa, en donde dicho primer y dicho tercer sitios objetivo se repiten directamente y son idénticos con respecto uno del otro, y dicho segundo sitio objetivo no es idéntico a dicho primer y dicho tercer sitios objetivo.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el genoma de dicha célula de planta comprende por lo menos un sitio objetivo que corresponde a sitios objetivo idénticos en dicho T-ADN, y en donde dicho replicón vírico y dicho ADN de interés se inserta dentro del sitio objetivo en el genoma de dicha célula de planta.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el genoma de dicha célula de planta comprende por lo menos dos sitios objetivo no idénticos que corresponden al segundo y tercer sitios objetivo no idénticos que flanquean la secuencia de ADN de interés, y en donde dicho ADN de interés se inserta dentro del sitio objetivo en el genoma de dicha célula de planta.

6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha recombinasa específica de sitio es un miembro de la familia integrasa o es FLP, Cre, Int, SSVI, integrasa R, un fragmento activo, o una variante activa de la misma.

7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dichos sitios objetivo se seleccionan de un sitio FRT, un sitio FRT mutante, un sitio LoxP y un sitio LoxP mutante.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 a 7, en donde dicha célula de planta es de una monocotiledónea o una dicotiledónea o en donde dicha monocotiledónea es maíz, trigo, arroz, cebada, sorgo o centeno o en donde dicha dicotiledónea es soya, Brassica, girasol, alfalfa o alazor.

9. Un T-ADN que contiene un replicón vírico flanqueado al repetir directamente sitios objetivo para una recombinasa específica de sitio.

10. Un T-ADN de acuerdo con la reivindicación 9, dicho T-ADN comprende en una orientación 5' a 3' o 3' a 5', un primer sitio objetivo para dicha recombinasa específica de sitio, dicho replicón vírico, una secuencia de ADN de interés, y un segundo sitio objetivo para dicha recombinasa en repetición directa con dicho primer sitio objetivo, en donde dicho primer y segundo sitios objetivo son idénticos.

11. Un T-ADN de acuerdo con la reivindicación 9 que comprende en una orientación 5' a 3' o 3' a 5', un primer sitio objetivo para la recombinasa, el replicón vírico, un segundo sitio objetivo para la recombinasa, una secuencia de ADN de interés, y un tercer sitio objetivo para dicha recombinasa, en donde dicho primer y dicho tercer sitios objetivo se repiten directamente y son idénticos con respecto uno del otro, y dicho segundo sitio objetivo no es idéntico a dicho primer y dicho tercer sitios objetivo.

12. Un T-ADN de acuerdo con la reivindicación 9, 10 o 11, en donde dicho replicón vírico contiene una secuencia de nucleótido que codifica dicha recombinasa o un fragmento activo o una variante activa de la misma, y dicha secuencia de nucleótido se liga operablemente a un promotor que controla la expresión en una célula de planta.

## ES 2 338 284 T3

13. Un T-ADN de acuerdo con la reivindicación 9, 10, 11 o 12, en donde dicha recombinasa específica de sitio es FLP, Cre, Int, SSVI, o Integrasa R o un fragmento funcional o una variante activa de la misma, y en donde dicho fragmento o variante retiene la actividad de recombinación específica de sitio.

5 14. Un T-ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde dichos sitios objetivo se seleccionan de un sitio FRT, un sitio FRT mutante, un sitio LoxP, y un sitio LoxP mutante.

10 15. Un replicón Agrobacterium o un Agrobacterium que contiene el T-ADN como se define por cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14.

16. Una célula de planta que tiene una construcción de ADN que comprende en una orientación 5' a 3' o 3' a 5' un primer sitio objetivo para una recombinasa específica de sitio, un replicón vírico, una secuencia de nucleótido de interés, y un segundo sitio objetivo para dicha recombinasa específica de sitio, en donde dicho primer y dicho segundo sitio objetivo se repiten directamente y son idénticos con respecto uno del otro.

15 17. Una célula de planta de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha construcción de ADN comprende en la orientación 5' a 3' o 3' a 5' el primer sitio objetivo para dicha recombinasa específica de sitio, dicho replicón vírico, un tercer sitio objetivo para dicha recombinasa específica de sitio, la secuencia de nucleótido de interés, y el segundo sitio objetivo para dicha recombinasa específica de sitio, en donde dicho primer y dicho segundo sitio objetivo se repiten directamente y son idénticos con respecto uno del otro, y dicho tercer sitio objetivo no es idéntico a dicho primer y dicho segundo sitio objetivo.

20 18. Una célula de planta de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en donde dicha construcción de ADN se incorpora en el genoma de dicha célula de planta.

25 19. Una célula de planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16, 17, o 18, en donde dicha célula de planta comprende una secuencia de nucleótido que codifica dicha recombinasa específica de sitio.

30 20. Una célula de planta de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha recombinasa específica de sitio es un miembro de la familia integrasa o es FLP, Cre, Int, SSVI, Integrasa R, o un fragmento activo o una variante activa de la misma.

35 21. Una célula de planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en donde dichos sitios objetivo se seleccionan de un sitio FRT, un sitio FRT mutante, un sitio LoxP, y un sitio LoxP mutante.

22. Una célula de planta de acuerdo con las reivindicaciones 16 a 21, en donde dicha célula de planta es de una monocotiledónea o una dicotiledónea o en donde dicha monocotiledónea es maíz, trigo, arroz, cebada, sorgo, o centeno o dicha dicotiledónea es soya, Brassica, girasol, alfalfa, o alazor.

40 23. Una planta que comprende una célula de planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22.

24. Una semilla transformada que comprende una célula de planta como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22.

45

50

55

60

65

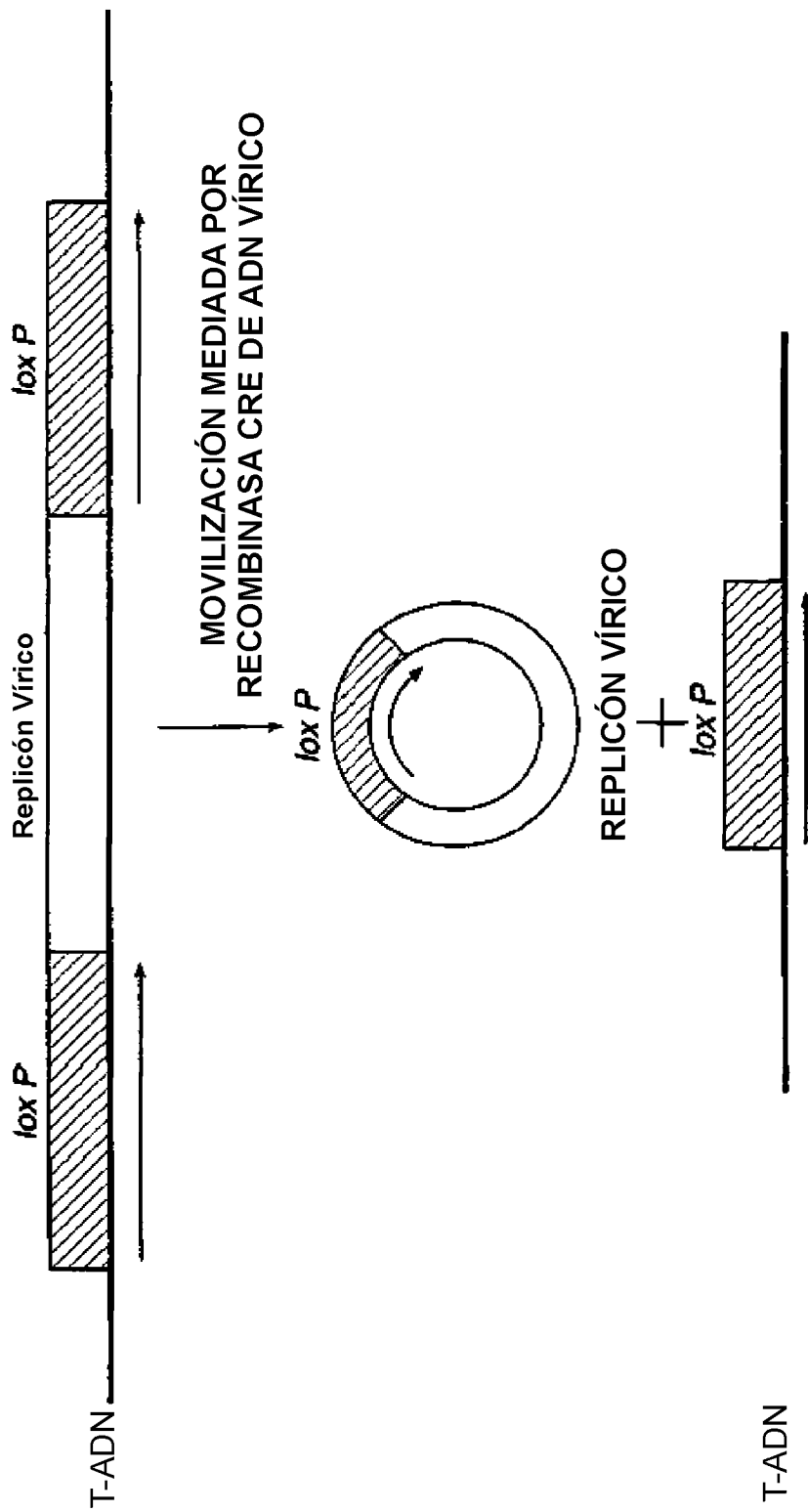


FIG. 1.

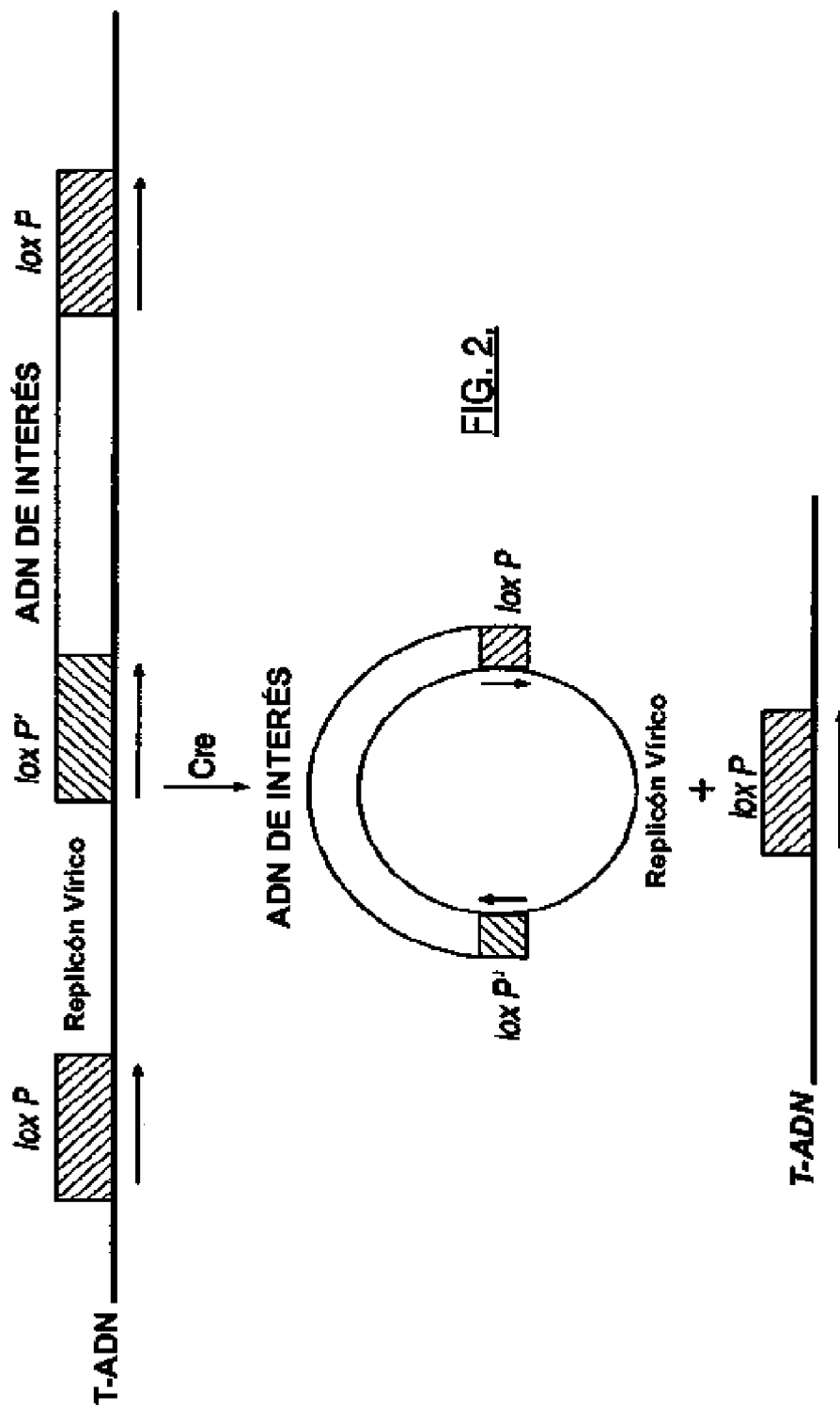
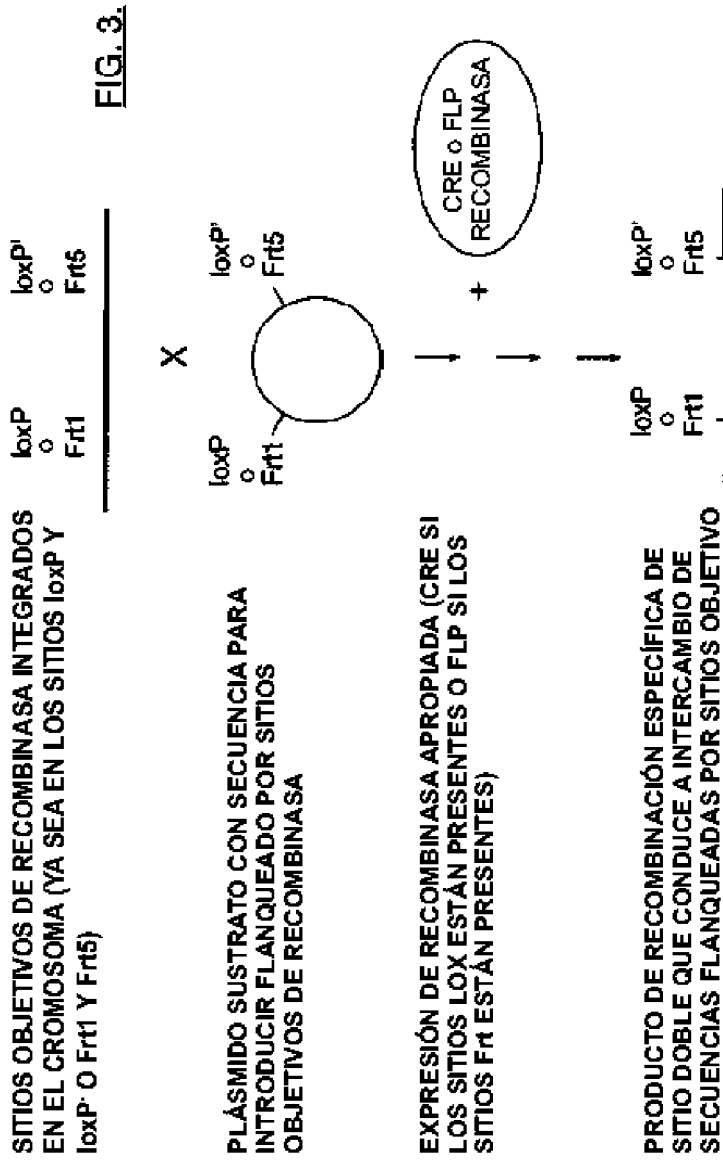
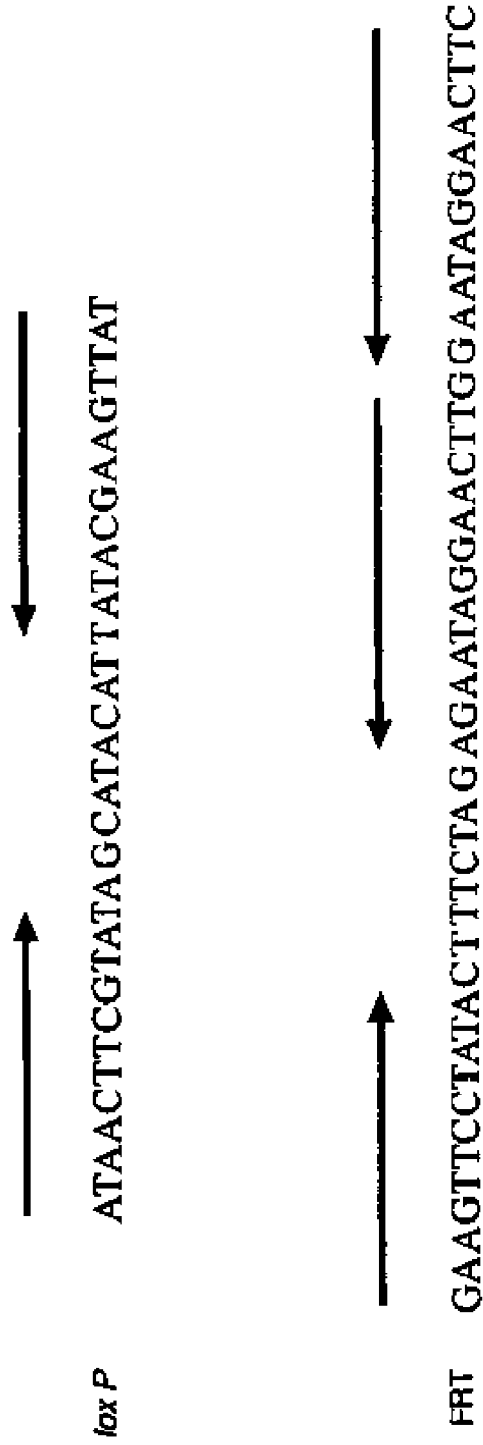
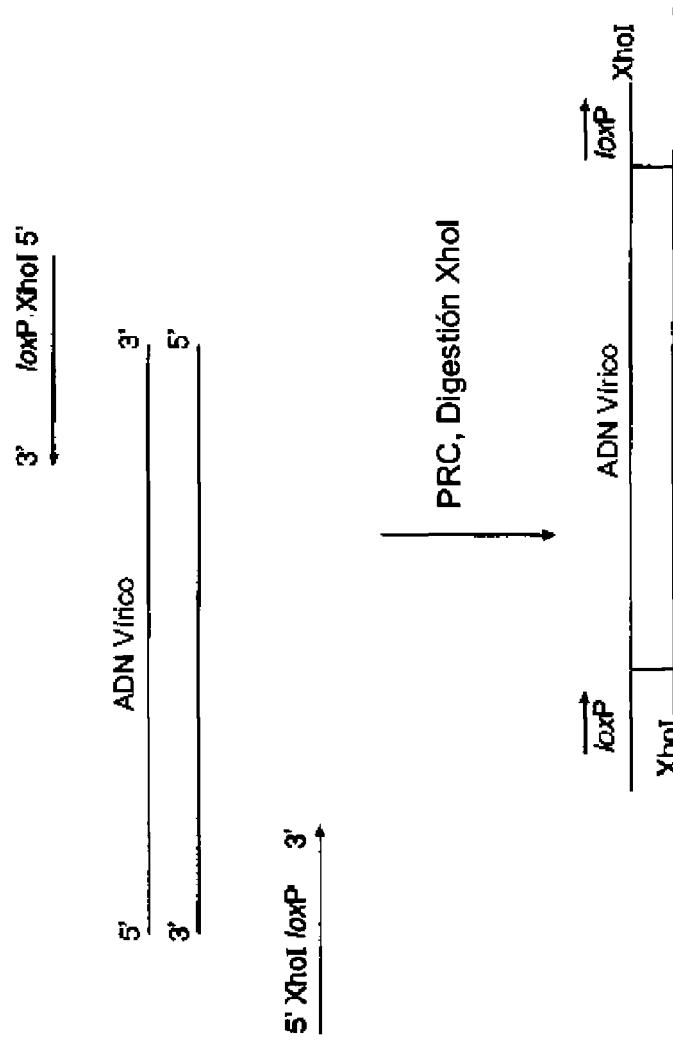


FIG. 2.





**FIG. 4.**



**FIG. 5.**