



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 327**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 15/90** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05006893 .1**  
96 Fecha de presentación : **17.11.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1574573**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Composiciones y métodos para modificación genética de plantas.**

30 Prioridad: **18.11.1997 US 65627 P**  
**18.11.1997 US 65613 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2008**

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

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

72 Inventor/es: **Baszczynski, Christopher L.;**  
**Bowen, Benjamin A.;**  
**Peterson, David J. y**  
**Tagliani, Laura A.**

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

ES 2 308 327 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**

Composiciones y métodos para modificación genética de plantas.

**5 Campo de la invención**

Esta invención se relaciona con la modificación genética de plantas. Particularmente, se provee el control de integración génica y la expresión en plantas.

**10 Antecedentes de la invención**

Las técnicas de modificación genética permiten insertar secuencias exógenas de nucleótidos en un genoma de un organismo. Se han descrito una cantidad de métodos para la modificación genética de plantas. Todos estos métodos se basan en la introducción de un ADN foráneo dentro de la célula de la planta, el aislamiento de aquellas células que contienen el ADN foráneo integrado dentro del genoma, seguido por la regeneración posterior de una planta completa. Infortunadamente, tales métodos producen células transformadas que contienen al ADN foráneo introducido insertado aleatoriamente a todo lo largo del genoma y a menudo en copias múltiples.

La inserción aleatoria del ADN introducido en el genoma de las células huésped puede ser letal si ocurre la inserción del ADN foráneo dentro, y por lo tanto muta, a un gen nativo críticamente importante. Además, aún si un evento aleatorio de inserción no afecta el funcionamiento de un gen de una célula huésped, la expresión de un gen foráneo insertado puede ser influenciada por los "efectos de posición" causados por el ADN genómico circundante. En algunos casos, se inserta el gen en sitios en donde los efectos de posición son lo suficientemente fuertes para prevenir la síntesis de una cantidad efectiva de producto a partir del gen introducido. En otros casos, la sobreproducción del producto génico tiene efectos nocivos sobre la célula.

La expresión del transgén es típicamente gobernada por las secuencias, incluidos los promotores y reforzadores, que están físicamente enlazados al transgén. Actualmente, no es posible modificar en forma precisa la estructura de los transgenes una vez que ellos han sido introducidos en células de plantas. En muchas aplicaciones de tecnología de transgenes, sería deseable introducir al transgén en una forma, y luego ser capaz de modificar al transgén en una forma definida. Por este medio, los transgenes podrían ser activados o inactivados donde las secuencias que controlan la expresión del transgén pueden ser alteradas por cualquiera de las secuencias de remoción presentes en el transgén original o por medio de inserción de secuencias adicionales dentro del transgén.

Para eucariotas superiores, la recombinación homóloga es un evento esencial que participa en procesos como la reparación de ADN e intercambio de cromátide durante la mitosis y la meiosis. La recombinación depende de dos secuencias homólogas muy extendidas y de varias proteínas auxiliares. La separación de hebras puede ocurrir en cualquier punto entre las regiones de homología, aunque secuencias particulares pueden influenciar la eficiencia. Estos procesos pueden ser explotados para una integración dirigida de transgenes en el genoma de ciertos tipos de células.

Aún con los avances en modificación genética de plantas superiores, los principales problemas asociados con las técnicas convencionales de transformación génica han permanecido esencialmente sin resolverse en cuanto a los problemas antes mencionados relacionados con niveles de expresión variables debidos a efectos de posición cromosomales y a la variación en el número de copias de genes transferidos. Por estas razones, se necesitan métodos eficientes para dirigir y controlar la inserción de secuencias de nucleótidos que van a ser integradas dentro de un genoma de una planta.

**Resumen de la invención**

La invención se relaciona con la integración dirigida de secuencias de nucleótidos dentro de una planta transformada.

Los métodos encuentran uso dirigiendo la integración de secuencias de nucleótidos de interés a un sitio cromosomal específico, encontrando sitios de integración óptima en un genoma de una planta, comparando la actividad promotora en plantas transformadas, modificando por ingeniería genética los reordenamientos cromosómicos, y otras manipulaciones genéticas de plantas.

Se proveen nuevos sitios de recombinación mínima (FRT) para uso en la invención.

Por lo tanto, la invención provee una planta o una célula de una planta que contiene una construcción de ADN en la dirección 5' a 3' de transcripción un promotor funcional en una planta, un intrón, una secuencia de nucleótidos de interés, y una región terminadora, dicha construcción de ADN comprendiendo dos sitios no idénticos de recombinación, donde uno de dichos sitios no idénticos de recombinación está contenido dentro de dicho intrón y dichos sitios no idénticos de recombinación se pueden recombinar con sus correspondientes sitios de recombinación.

La invención provee también un polinucleótido aislado que contiene los siguientes componentes operativamente enlazados: un intrón y una secuencia de nucleótidos de interés, y más de un sitio de recombinación no idéntico de recombinación, en donde uno de dichos sitios no idénticos de recombinación está contenido dentro de dicho intrón y dicho intrón se selecciona entre un intrón de ubiquitina, un intrón ADH, y un intrón DnaJ.

**Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 provee un esquema para apilar al gen a través de una integración específica del sitio utilizando el sistema FLP.

La Figura 2 provee una construcción del plásmido representativo PHP10616.

**Descripción detallada de la invención**

La invención se relaciona con la integración dirigida de nucleótidos exógenos dentro de una planta transformada.

Se introduce una secuencia de nucleótidos flanqueada por dos sitios no idénticos de recombinación dentro del genoma de la planta objetivo estableciendo un sitio objetivo para inserción de secuencias de nucleótidos de interés. Una vez que se establece una planta estable o tejido cultivado, se introduce una segunda construcción, o secuencia de nucleótidos de interés, flanqueada por sitios de recombinación correspondientes como aquellos que flanquean al sitio objetivo dentro de la planta o tejidos transformados en forma estable en presencia de una proteína recombinasa. Este proceso resulta en el intercambio de las secuencias de nucleótidos entre los sitios no idénticos de recombinación del sitio objetivo y el casete de transferencia.

Se reconoce que la planta transformada puede contener múltiples sitios objetivo, esto es, conjuntos de sitios no idénticos de recombinación. De esta forma, están disponibles múltiples manipulaciones del sitio objetivo en la planta transformada. Por sitio objetivo en la planta transformada se entiende una secuencia de ADN que ha sido insertada dentro del genoma de la planta transformada y comprende sitios no idénticos de recombinación.

Los ejemplos de sitios de recombinación para uso en la invención son conocidos en el arte e incluyen sitios FRT (Ver, por ejemplo Schlake y Bode (1994) *Biochemistry* 33:12746-12751; Huang y colaboradores (1991) *Nucleic Acids Research* 19: 443-448; Paul D. Sadowski (1995) *En Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* vol. 51, páginas 53-91; Michael M. Cox (1989) *En Mobile DNA*, Berg y Howe (eds) American Society of Microbiology, Washington D.C., páginas 116-670; Dixon y colaboradores (1995) 18:449-458; Umlauf y Cox (1988) *The FMO Journal* 7:1845-1852; Buchholz y colaboradores (1996) *Nucleic Acids Research* 24:3118-3119; Kilby y colaboradores (1993) *Trends Genet.* 9:413-421; Rossant y Geagy (1995) *Nat. Med.* 1: 592-594; Albert y colaboradores (1995) *The Plant J.* 7:649-659; Bayley y colaboradores (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:353-361; Odell y colaboradores (1990) *Mol. Gen. Genet.* 223:369-378; y Dale y Ow (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10558-105620; Lax (Albert y colaboradores (1995) *Plant J.* 7:649-659; Qui y colaboradores (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1706-1710; Stuurman y colaboradores (1996) *Plant Mol. Biol* 32:901-913; Odell y colaboradores (1990) *Mol. Gen. Gevet.* 223:369-378; Dale y colaboradores (1990) *Gene* 91:79-85; y Bayley y colaboradores (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:353-361).

El plásmido de dos micrones encontrado en la mayoría de las cepas de ocurrencia natural de *Saccharomyces cerevisiae*, codifica a una recombinasa específica del sitio que promueve una inversión del ADN entre dos repeticiones invertidas. Esta inversión juega un papel central en la amplificación del número de copias del plásmido. La proteína, designada proteína FLP, cataliza los eventos de recombinación específicos del sitio. El sitio de recombinación mínima (FRT, SEQ ID NO. 1) ha sido denominado y contiene dos repeticiones de 13 pares de bases (pb) alrededor de un espaciador asimétrico de 8 pb. La proteína FLP escinde el sitio en las uniones de las repeticiones y el espaciador y está covalentemente enlazada al ADN a través de un fosfato 3'.

Las recombinasas específicas del sitio tipo FLP escinden y ligan nuevamente al ADN en secuencias objetivo específicas, resultando en una recombinación definida en forma precisa entre dos sitios idénticos. Para funcionar, el sistema necesita los sitios de recombinación y la recombinasa. No se requieren factores auxiliares. Por lo tanto, el sistema completo puede ser insertado dentro y funcionar en células de plantas.

Se ha demostrado que el sistema de recombinación específico del sitio FLP/FRP de levadura funciona en plantas. Hasta la fecha, el sistema ha sido utilizado para escisión del ADN no deseado. Ver, Lyznik y colaboradores (1993) *Nucleic Acid Res.* 21:969-975. En contraste, la presente invención utiliza FRTs no idénticos para intercambio, selección, disposición, inserción y control de expresión de secuencias de nucleótidos en el genoma de la planta.

De acuerdo con la invención, se necesita un organismo transformado de interés, particularmente una planta, que contiene un sitio objetivo integrado dentro de su genoma. El sitio objetivo se caracteriza por estar flanqueado por sitios no idénticos de recombinación. Se requiere adicionalmente un casete objetivo que contiene una secuencia de nucleótidos flanqueada por los sitios correspondientes no idénticos de recombinación como aquellos sitios contenidos en el sitio objetivo del organismo transformado. Se requiere una recombinasa que reconoce los sitios no idénticos de recombinación y cataliza la recombinación específica del sitio.

Se reconoce que la recombinasa puede ser suministrada por cualquier medio conocido en el arte. Esto es, puede ser suministrado en el organismo o célula de planta por medio de la transformación del organismo con un casete de expresión capaz de expresar la recombinasa en el organismo, por medio de expresión transitoria; o proveyendo un ARN mensajero (ARNm) para la recombinasa o la proteína recombinasa.

## ES 2 308 327 T3

Por “sitios no idénticos de recombinación” se entiende que los sitios de recombinación de flanqueo no son idénticos en secuencia y no se recombinarán o la recombinación entre los sitios será mínima. Esto es, un sitio de recombinación de flanqueo puede ser un sitio FRT donde el segundo sitio de recombinación puede ser un sitio FTR mutado. Los sitios no idénticos de recombinación utilizados en los métodos de la invención previenen o suprimen gratamente la recombinación entre los dos sitios de recombinación de flanqueo y la escisión de la secuencia de nucleótidos contenida allí dentro. Por lo tanto, se reconoce que cualquiera de los sitios adecuados no idénticos de recombinación puede ser utilizado en la invención, incluyendo sitios FRT y FRT mutante, sitios FRT y lox, sitios lox y lox mutante, así como otros sitios de recombinación conocidos en el arte.

Un sitio adecuado no idéntico de recombinación implica que en presencia de recombinasa activa, la escisión de secuencias entre dos sitios no idénticos de recombinación ocurre, si acaso, con una eficiencia considerablemente menor que el ordenamiento objetivo de intercambio mediado en forma recombinante de secuencias de nucleótidos dentro del genoma de la planta. De este modo, los sitios no idénticos adecuados para uso en la invención incluyen a aquellos sitios en donde la eficiencia de recombinación entre los sitios es baja; por ejemplo, donde la eficiencia es menos de aproximadamente 30 hasta aproximadamente 50%, preferiblemente menos de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30%, más preferiblemente menos de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10%.

Como se observó anteriormente, los sitios de recombinación en el casete objetivo corresponden a aquellos en el sitio objetivo de la planta transformada. Esto es, si el sitio objetivo de la planta transformada contiene sitios de flanqueo no idénticos de recombinación de FRT y un FRT mutante, el casete objetivo contendrá los mismos sitios no idénticos de recombinación FRT y FRT mutante.

Se reconoce adicionalmente que la recombinasa, que es utilizada en la invención, dependerá de los sitios de recombinación en el sitio objetivo de la planta transformada y el casete objetivo. Esto es, si se utilizan los sitios FRT, se necesitará la FLP recombinasa. En la misma forma, donde se utilizan los sitios lox, se requiere la Cre recombinasa. Si los sitios no idénticos de recombinación contienen tanto un sitio FRT como un sitio lox, se requerirá tanto la FLP recombinasa como la Cre recombinasa en la célula de la planta.

La FLP recombinasa es una proteína que cataliza una reacción específica del sitio que está involucrada en la amplificación del número de copias de los dos plásmidos micrón de *S. cerevisiae* durante la replicación del ADN: la proteína de FLP ha sido clonada y expresada. Ver, por ejemplo Cox (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:4223-4227. La FLP recombinasa para uso en la invención puede ser aquella derivada del género *Saccharomyces*. Puede ser preferible sintetizar la recombinasa utilizando codones preferidos de planta para expresión óptima en una planta de interés. Ver, por ejemplo, la solicitud estadounidense con serial No. 08/972,258 presentada el 18 de Noviembre, 1997 y correspondiente a WO99/25841 publicada el 27 de mayo de 1999, ambas tituladas “Novel Nucleic Acid Sequence Encoding FLP Recombinase”.

La Cre recombinasa de bacteriófago cataliza la recombinación específica del sitio entre dos sitios lox. La Cre recombinasa es conocida en el arte. Ver, por ejemplo, Guo y colaboradores (1997) Nature 389: 40-46; Abremski y colaboradores (1984) J. Biol. Chem. 259: 1509-1514; Chen y colaboradores (1996) Somat. Cell Mol. Genet. 22: 477-488; y Shaikh y colaboradores (1977) J. Biol. Chem. 272: 5695-5702. Tal secuencia de Cre puede ser sintetizada también utilizando codones preferidos de plantas.

Donde sea apropiado, las secuencias de nucleótidos que van a ser insertadas en el genoma de la planta pueden ser optimizadas para una mayor expresión en la planta transformada. Donde se utilizan genes de mamífero, de levadura, o bacterianos en la invención, ellos pueden ser sintetizados utilizando codones preferidos de planta para una mejor expresión. Se reconoce que para expresión en genes de monocotiledóneas, se pueden sintetizar también genes de dicotiledóneas utilizando codones preferidos de monocotiledóneas. Están disponibles en el arte métodos para sintetizar genes preferidos de plantas. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5.380.831, 5.436.391, y Murray y colaboradores (1989) Nucleic Acids Res. 17: 477-498.

Los codones preferidos de planta se pueden determinar a partir de los codones utilizados más frecuentemente en las proteínas expresadas en la planta de interés. Se reconoce que se pueden construir las secuencias preferidas de monocotiledóneas o de dicotiledóneas así como las secuencias preferidas de la planta para especies particulares de plantas. Ver, por ejemplo, EPA 0359472; EPA 0385962; WO 91/16432; Perlak y colaboradores (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 3324-3328; y Murray y colaboradores (1989) Nucleic Acids Research, 17. 477-498. La patente estadounidense No. 5.380.831; la patente estadounidense No. 5.436.391. Se reconoce adicionalmente que todo o parte de la secuencia génica puede ser optimizada o sintética. Esto es, también se pueden utilizar secuencias completamente optimizadas o parcialmente optimizadas.

Se sabe que modificaciones adicionales de secuencia mejoran la expresión génica en una célula huésped y pueden ser utilizadas en la invención. Estas incluyen eliminación de secuencias que codifican señales espurias de poliadenilación, señales del sitio de empalme del exón-intrón, repeticiones del tipo transposón, y otras tales como secuencias bien caracterizadas, que pueden ser nocivas para la expresión génica. El contenido de G-C de la secuencia se puede ajustar hasta niveles promedio para un huésped celular dado, como el calculado con referencia a genes conocidos expresados en la célula huésped. Cuando sea posible, se modifica la secuencia para evitar estructuras predichas de ARNm secundarias de horquilla.

## ES 2 308 327 T3

La presente invención también abarca nuevos sitios objetivo de recombinación FLP (FRT). El FRT (SEQ ID NO 1) ha sido identificado como una secuencia mínima que contiene dos repeticiones de 13 pares de bases, separadas por un espaciador de 8 bases, de la siguiente manera: 5'-GAAGTTCCTATTC[TCTAGAAA]GTATAGGAACTTC3' en donde los nucleótidos dentro del paréntesis indican la región del espaciador. Los nucleótidos en la región espaciadora pueden ser reemplazados con una combinación de nucleótidos, siempre y cuando que las dos repeticiones de 13 bases estén separadas por ocho nucleótidos. Parece que la secuencia real de nucleótidos del espaciador no es crítica, sin embargo para la práctica de la invención, algunas sustituciones de nucleótidos en el espaciador, región pueden trabajar mejor que otras.

El espaciador de ocho pares de bases está involucrado en el intercambio de hebras de ADN-ADN apareamiento puntual. La asimetría de la región determina la dirección de alineación del sitio en el evento de recombinación, que posteriormente conducirá ya sea a una inversión o a una excisión. Como se indicó anteriormente, la mayor parte del espaciador puede ser mutada sin una pérdida de función. Ver, por ejemplo, Schlake y Bode (1994) *Biochemistry* 33:12746-12751.

Los nuevos sitios mutantes FRT fueron suministrados para uso en la práctica de la presente invención. Tales sitios mutantes pueden ser construidos por mutagénesis con base en la PCR. Mientras que los sitios mutantes de FRT (SEQ ID Nos. 2, 3, 4 y 5) son suministrados aquí, se reconoce que otros sitios mutantes de FRT pueden ser utilizados en la práctica de la invención. La presente invención no es el uso de un FRT particular o sitio de recombinación, sino que se pueden utilizar en vez de sitios de recombinación no idénticos o sitios FRT para inserción dirigida y expresión de secuencias de nucleótidos en un genoma de planta. De este modo, se pueden construir y utilizar otros sitios FRT mutantes con base en la presente descripción.

Como se discutió anteriormente, poniendo al ADN genómico que contiene un sitio objetivo con sitios no idénticos de recombinación junto con un vector que contiene un casete de transferencia con los correspondientes sitios no idénticos de recombinación, en presencia de la recombinasa, resulta en recombinación. A la secuencia de nucleótidos del casete de transferencia localizada entre el genoma, se le pueden introducir sitios adicionales de recombinación por medio de la incorporación de tales sitios dentro de la secuencia de nucleótidos del casete de transferencia y la transferencia de los sitios a la secuencia objetivo. De esta forma, una vez se ha establecido un sitio objetivo, es posible añadir posteriormente sitios, o alterar los sitios por recombinación.

Otra variación incluye proveer un promotor o una región de iniciación de la transcripción operativamente enlazada con el sitio objetivo en un organismo. Preferiblemente, el promotor será 5' con el primer sitio de recombinación. Por medio de la transformación del organismo con un casete de transferencia que contiene una región de codificación, la expresión de la región de codificación por integración del casete de transferencia dentro del sitio objetivo. Esta modalidad provee un método para seleccionar células transformadas, particularmente células de planta, proveyendo una secuencia marcadora seleccionable como la secuencia de codificación.

Otras ventajas del presente sistema incluyen la habilidad para reducir la complejidad de la integración de transgenes o del ADN transferido en un organismo por medio de la utilización de casetes de transferencia como se discutió anteriormente y seleccionar organismos con patrones de integración simples. En la misma forma, los sitios preferidos dentro del genoma pueden ser identificados por medio de la comparación de varios eventos de transformación. Un sitio preferido dentro del genoma incluye uno que no altera la expresión de secuencias esenciales y hace posible la expresión adecuada de la secuencia transgénica.

Los métodos de la invención también hacen posible medios para combinar casetes múltiples en una ubicación dentro del genoma. Ver, por ejemplo, Figura 1. Se pueden añadir o suprimir sitios de recombinación en sitios objetivo dentro del genoma.

Cualquier medio conocido en el arte para reunir a los tres componentes del sistema puede ser utilizado en la invención. Por ejemplo, una planta puede ser establemente transformada para albergar al sitio objetivo en su genoma. La recombinasa puede ser proveída o expresada en forma temporal. Alternativamente, una secuencia de nucleótidos capaz de expresar la recombinasa puede ser integrada en forma estable dentro del genoma de la planta. En presencia del sitio objetivo correspondiente y la recombinasa, se inserta el casete de transferencia, flanqueado por los correspondientes sitios no idénticos de recombinación, dentro del genoma transformado de la planta.

Alternativamente, los componentes del sistema pueden ser colocados juntos por medio de plantas transformadas por cruzamiento sexual. En esta modalidad, una planta transformada, una progenitora uno, que contiene un sitio objetivo integrado en su genoma puede ser cruzada sexualmente con una segunda planta, progenitora dos, que ha sido genéticamente transformada con un casete de transferencia que contiene sitios de flanqueo no idénticos de recombinación, que corresponden a aquellos en la planta uno. Ya sea la planta uno o la planta dos, ambas contienen dentro de su genoma una secuencia de nucleótidos que expresan la recombinasa. La recombinasa puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o inducible.

Los promotores inducibles incluyen a los promotores inducibles por calor, a los promotores sensibles al estradiol, promotores inducibles químicamente, y similares. Los promotores inducibles por patógenos incluyen a aquellos de proteínas relacionadas con patogénesis (proteínas PR), que son inducidas después de la infección por un patógeno; por ejemplo, proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa, etc. Ver, por ejemplo, Redolfi y colaboradores

## ES 2 308 327 T3

(1983) Neth. J. Plant Pathol. 89: 245-254; Uknes y colaboradores (1992) The Plant Cell 4: 645-656; y Van Loon (1985) Plant Mol. Virol. 4: 111-116. En esta forma, se puede controlar la expresión de la recombinasa y la actividad posterior en los sitios de recombinación.

5 Los promotores constitutivos para uso en la expresión de genes en plantas son conocidos en el arte. Tales promotores incluyen, pero no se limitan al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Depicker y colaboradores (1982) Mol. Appl. Genet. 1:561-573; Odell y colaboradores (1985) Nature 313:810-812), al promotor de la ubiquitina (Christensen y colaboradores (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689), promotores de genes tales como ribulosa difosfato carboxilasa (De Almeida y colaboradores (1989) Mol. Gen. Genet. 218:78-98), actina (McElroy y colaboradores (1990) Plant J. 2:163-171), histona, DnaJ (Baszczynski y colaboradores (1997) Maydica 42:189-201), y similares.

10 Las composiciones y métodos de la invención encuentran uso en la dirección de la integración de secuencias de nucleótidos transferidos hacia un sitio cromosómico específico. La secuencia de nucleótidos puede codificar a cualquier secuencia de nucleótidos de interés. Los genes de interés particular incluyen a aquellos que proveen una característica funcional fácilmente analizable a la célula huésped y/o organismo, tal como los genes marcadores, así como otros genes que alteran el fenotipo de las células receptoras, y similares. De esta forma, los genes que afectan el crecimiento de la planta, la altura, susceptibilidad a la enfermedad, a los insectos, el valor nutricional, y similares pueden ser utilizados en la invención. La secuencia de nucleótidos puede codificar también una secuencia “antisentido” para desactivar o modificar la expresión génica.

15 Se reconoce que las secuencias de nucleótidos serán utilizadas en una unidad funcional de expresión o casete. Por unidad funcional de expresión o casete se entiende, la secuencia de nucleótidos de interés con un promotor funcional, y en la mayoría de los casos una región de terminación. Existen varias formas para lograr la unidad funcional de expresión dentro de la práctica de la invención. En una modalidad de la invención, se transfiere el ácido nucleico de interés o se lo inserta dentro del genoma como una unidad funcional de expresión. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos puede ser insertada en un sitio dentro del genoma que es 3' a una región promotora. En este caso, la inserción de la secuencia de codificación 3' a la región promotora es tal que se logra una unidad funcional de expresión por la integración. Por conveniencia, para la expresión en plantas, el ácido nucleico que codifica los sitios objetivo y los casetes de transferencia, incluidas las secuencias de nucleótidos de interés, pueden estar contenidos dentro de casetes de expresión. El casete de expresión contendrá una región de iniciación transcripcional, o promotora, operativamente enlazada al ácido nucleico que codifica la péptido de interés. Tal casete de expresión cuenta con una pluralidad de sitios de restricción para inserción del gen o genes de interés que están bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

20 La región de iniciación transcripcional, la promotora, puede ser nativa u homóloga o foránea o heteróloga al huésped, o podría ser la secuencia natural o una secuencia sintética. Por foránea se entiende que la región de iniciación transcripcional no se encuentra en el huésped de tipo natural dentro del cual se introduce la región de iniciación transcripcional. Se puede utilizar ya sea un promotor nativo o heterólogo con respecto a la secuencia de codificación de interés.

25 El casete transcripcional incluirá en la dirección 5'-3' de la transcripción, una región de iniciación transcripcional y de traducción, una secuencia de interés de ADN, y una región de terminación transcripcional y de traducción funcional en plantas. La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación transcripcional, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés, o se puede derivar de otra fuente. Las regiones de terminación convenientes están disponibles a partir del gen inhibidor de la proteinasa de patata (PinII) o a partir del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tal como las regiones de terminación de la octopina sintasa y la nopalina sintasa. Ver también, Guerineau y colaboradores, (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141-144; Proudfoot (1991) Cell 64: 671-674; Sanfacon y colaboradores (1991) Genes Dev. 5: 141-149; Mogen y colaboradores (1990) Plant Cell 2: 1261-1272; Munroe y colaboradores (1990) Gene 91: 151-158; Ballas y colaboradores (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7891-7903; Joshi y colaboradores (1987) Nucleic Acid Res. 15: 9627-9639.

30 Los casetes de expresión pueden contener adicionalmente secuencias líder 5' en la construcción del casete de expresión. Tales secuencias líderes pueden actuar para mejorar la traducción. Los líderes de traducción son conocidos en el arte e incluyen: líderes picornavirus, por ejemplo, el líder EMCV (la región no codificadora 5' de Encefalomiocarditis) (Elroy-Stein, O., Fuerst, T.R., y Moss, B. (1989) PNAS USA. 86: 6126-6130); líderes potivirus, por ejemplo, el líder TEV (Virus del Grabado del Tabaco) (Allison y colaboradores (1986); el líder MDMV (Virus del Mosaico Enano del Maíz); Virology, 154: 9-20), y proteína de enlazamiento de cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP), (Macejak, D.G., y P. Sarnow (1991) Nature, 353: 90-94; el líder no traducido del ARNm de la proteína de recubrimiento del virus del mosaico de la alfalfa (AMV RNA 4), (Jobling, S.A., y Gehrke, L., (1987) Nature, 325: 622-625; el líder del virus del mosaico del tabaco (TMV), (Gallie y colaboradores (1989) Molecular Biology of RNA, páginas 237-256, Gallie y colaboradores (1987) Nucl. Acids Res. 15: 3257-3273; y el líder del virus clorótico moteado del maíz (MCMV) (Lommel, S.A. y colaboradores (1991) Virology, 81:382-385). Ver también, Della-Cioppa y colaboradores (1987) Plant Physiology, 84: 965-968. Se pueden utilizar otros métodos conocidos para mejorar la traducción, por ejemplo, intrones, y similares.

35 Los casetes de expresión pueden contener uno o más de un gen o secuencia de ácido nucleico que van a ser transferidos y expresados en la planta transformada. De esta forma, cada secuencia de ácido nucleico estará operativamente enlazada a las secuencias reguladoras 5' y 3'. Alternativamente, se pueden proveer casetes de expresión múltiple.

Generalmente, el casete de expresión contendrá un gen marcador seleccionable para la selección de células transformadas. Los genes marcadores seleccionables son utilizados para la selección de células transformadas o tejidos.

Ver generalmente, G. T. Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.*, 3: 506-511; Christopherson y colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 6314-6318; Yao y colaboradores (1992) *Cell*, 71:63-72; W. S. Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.*, 6: 2419-2422; Barkley y colaboradores (1980) *The Operon*. páginas 177-220; Hu y colaboradores (1987) *Cell*, 48: 555-566; Brown y colaboradores (1987) *Cell*, 49: 603-612; Figge y colaboradores (1988) *Cell*, 52: 713-722; Deuschle y colaboradores (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 5400-5404; Fuerst y colaboradores (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 2549-2553; Deuschle y colaboradores (1990) *Science*, 248: 480-483; M. Gossen (1993) Tesis de Doctorado, Universidad de Heidelberg; Reines y colaboradores (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 1917-1921; Labow y colaboradores (1990) *Mol. Cell Bio.*, 10: 3343-3356; Zambretti y colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:395.2-3956; Baim y colaboradores (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5072-5076; Wyborski y colaboradores (1991) *Nuc. Acids Res.*, 19: 4647-4653; A. Hillenand-Wissman (1989) *Topics in Mol. and Struc. Biol.*, 10: 143-162; Degenkolb y colaboradores (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35: 1591-1595; Kleinschmidt y colaboradores (1988) *Biochemistry*. 27: 1094-1104; Gatz y colaboradores (1992) *Plant J.*, 2: 397-404; A. L. Bonin (1993) Tesis de Doctorado, Universidad de Heidelberg; Gossen y colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:5547-5551; Oliva y colaboradores (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36:913-919; Hlavka y colaboradores (1985) *Handbook of Exp. Pharmacology*, 78; Gill y colaboradores (1988) *Nature* 334: 721-724.

Los métodos de la invención también pueden ser utilizados para encontrar sitios de integración óptima dentro del genoma de una planta. De esta forma, se transforma una planta con un casete de expresión que incluye a un gen marcador seleccionable. El casete de expresión es un sitio objetivo ya que el gen marcador está flanqueado por sitios de recombinación no idénticos. Los protoplastos transformados, tejidos, o plantas enteras pueden ser analizados para determinar los niveles de actividad del gen insertado. Comparando la actividad celular del gen en sitios de inserción diferentes, los sitios de integración preferidos se pueden encontrar en donde el gen se expresa en niveles altos o aceptables. Estas plantas pueden ser utilizadas luego con técnicas posteriores de redireccionamiento para reemplazar al gen marcador con otros genes o secuencias de nucleótidos de interés. En la misma forma, se pueden insertar múltiples genes en el sitio óptimo para expresión. Ver, por ejemplo, la Figura 2 que expone un esquema para apilar genes utilizando integración específica del sitio usando el sistema FRT/FLP.

Una variedad de manipulaciones genéticas están disponibles utilizando la presente invención incluyendo, por ejemplo, la comparación de la actividad del promotor en una planta transformada. Antes de la presente invención, la actividad del promotor no podía ser evaluada y comparada con precisión debido a que los genes químicos fueron insertados en diferentes posiciones dentro del genoma de la planta. Tales posiciones dentro del cromosoma afectaron la actividad. Por medio de la utilización de la invención, es posible una comparación directa de la actividad del promotor en un contexto cromosomal definido. De este modo, utilizando los métodos, se puede lograr la actividad mejorada de los genes seleccionado los sitios cromosomales óptimos así como los promotores óptimos para expresión en la célula de la planta.

La presente invención puede ser utilizada para la transformación de cualquier especie de planta, incluyendo pero sin limitarse a maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), potato (*Solanum tuberosum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), arboles de cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma sativa*), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), judías de media luna (*Phaseolus limensis*), guisantes (*Lathyrus* spp.) y miembros del genero *Cucumis* tales como pepino (*C. sativus*), melón (*C. cantalupensis*), y melón reticulado (*C. melo*). Las plantas ornamentales incluyen azalea (*Rhododendron* spp.), hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipanes (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petunias (*Petunia hybrida*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), poinsetias (*Euphorbia pulcherrima*), y crisantemo. Las coníferas que pueden ser empleadas en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, pinos tales como el pino tea (*Pinus taeda*), pino laciniado (*Pinus elliotii*), pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino lodgepole (*Pinus contorta*), y pino Monterrey (*Pinus radiata*); abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); abeto Occidental (*Tsuga canadensis*); abeto Sitka (*Picea glauca*); sequoia (*Sequoia sempervirens*); abetos verdaderos tales como el abeto plateado (*Abies amabilis*) y el abeto balsámico (*Abies balsamea*); y cedros tales como el cedro rojo Occidental (*Thuja plicata*) y el cedro amarillo de Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*). Preferiblemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, alfalfa, girasol, canola, soja, algodón, cacahuete, sorgo, trigo, tabaco, etc.), más preferiblemente plantas de maíz y de soja, aún más preferiblemente plantas de maíz. Se reconoce que los métodos de la invención pueden ser aplicados en cualquier sistema de planta. Los métodos para la transformación de plantas son conocidos en el arte. De esta forma, se pueden obtener las plantas genéticamente modificadas, células de plantas, tejido de plantas, semillas, y similares. Los protocolos de transformación pueden variar dependiendo del tipo de planta o de las células de la planta, esto es, monocotiledóneas o dicotiledóneas, destinadas a la transformación. Los métodos adecuados de transformación de células de plantas incluyen microinyección (Crossway y colaboradores (1986) *Biotechniques* 4: 320-334), electroporación (Riggs y colaboradores (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5602-5606, la transformación mediada por *Agrobacterium* (Hinchee y colaboradores (1988) *Biotechnology*, 6: 915-921), transferencia génica directa (Paszowski y colaboradores (1984) *EMBO J.*, 3: 2717-2722), y aceleración balística de partículas (ver, por ejemplo, Sanford y colaboradores, patente estadounidense No. 4.945.050; WO91/10725 y McCabe y colaboradores (1988) *Biotechnology*, 6: 923-926). Ver también, Weissinger y colaboradores (1988) *Annual Rev. Genet.*, 22: 421-477; Sanford y

## ES 2 308 327 T3

colaboradores (1987) *Particulate Science and Technology*, 5: 27-37 (cebolla); Christou y colaboradores (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soja); McCabe y colaboradores (1988) *Bio/Technology*, 6: 923-926 (soja); Datta y colaboradores (1990) *Biotechnology*, 8: 736-740(arroz); Klein y colaboradores (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4305-4309 (maíz); Klein y colaboradores (1988) *Biotechnology*, 6: 559-563 (maíz); WO91/10725 (maíz); Klein y colaboradores (1988) *Plant Physiol.*, 91: 440-444(maíz); Fromm y colaboradores (1990) *Biotechnology*, 8: 833-839; y Gordon-Kamm y colaboradores (1990) *Plant Cell*. 2: 603-618 (maíz); Hooydaas-Van Slogteren & Hooykaas (1984) *Nature* (Londres), 311: 763-764; Bytebier y colaboradores (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5345-5349 (Liliáceas); De Wet y colaboradores (1985) *En The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. G.P. Chapman y colaboradores, páginas 197-209. Longman, NY (polen); Kaeppler y colaboradores (1990) *Plant Cell Reports*, 9: 415-418; y Kaeppler y colaboradores (1992) *Theor. Appl. Genet.*, 84:560-566 (transformación mediada por bigotes); D'Halluin y colaboradores (1992) *Plant Cell*, 4: 1495-1505 (electroporación); Li y colaboradores (1993) *Plant Cell Reports*, 12:250-255 y Christou y Ford (1995) *Annals of Botany*, 75:407-413 (arroz); Osjoda y colaboradores (1996) *Nature Biotechnology*, 14: 745-750 (maíz a través de *Agrobacterium tumefaciens*).

Las células que han sido transformadas pueden ser cultivadas en plantas de acuerdo con aproximaciones convencionales. Ver, por ejemplo, McCormick y colaboradores (1986) *Plant Cell Reports*, 5: 81-84. Estas plantas regeneradas pueden ser luego polinizadas ya sea con la misma cepa transformada o de cepas diferentes, y el híbrido resultante que tiene la característica fenotípica deseada identificada. Se pueden cultivar dos o más generaciones para garantizar que la característica fenotípica objetivo sea mantenida en forma estable y heredada y luego cosechadas las semillas para garantizar que se ha logrado el fenotipo deseado u otras propiedades.

Se reconoce que se puede utilizar cualquier medio de transformación para la presente invención. Sin embargo, para insertar el sitio objetivo dentro de la planta transformada, se puede preferir la transformación mediada por *Agrobacterium*. La transformación mediada por *Agrobacterium* generalmente tiende a insertar un número menor de copias de ADN transferido que a través del bombardeo de partículas o de otros medio de transformación.

Se ofrecen los siguientes ejemplos a manera de ilustración y no como una limitación.

### *Experimental*

La presente invención general provee un procedimiento para utilizar sitios existentes y nuevos de FRT en un nuevo sistema génico objetivo que facilita el redireccionamiento direccional de los genes deseados dentro de los sitios FRT previamente introducidos en el genoma del organismo objetivo. Los nuevos sitios FRT difieren de los sitios FRT previamente descritos en la secuencia de las regiones espaciadoras de 8 pb de los sitios FRT. Las publicaciones previas también han mostrado que en presencia de la proteína FLP, la recombinación de secuencias entre dos sitios FRT ocurre eficientemente únicamente con dos sitios FRT idénticos. Ver, por ejemplo Umlauf y Cox (1988) *Embo J.* 7: 1845-1852; Schlake y Bode (1994) *Biochem.* 33: 12746-12751. Para utilizar la invención, un gen o una secuencia de ADN está flanqueada por dos sitios FRT no idénticos e introducidos dentro de un genoma de un organismo objetivo. El gen acotado puede ser un marcador seleccionable, permitiendo por lo tanto la selección para secuencias introducidas exitosamente. La caracterización molecular confirma la integración de secuencias deseadas incluidos los sitios FRT completos. Más abajo se enlistan ejemplos genéricos de construcciones de vectores útiles en la práctica de la invención:

A. FRTa-P1-G1-T1-PRTb

B. FRTa-P1-G1-T1-FRTa

C. FRTb-P1-G1-T1-FRTb

D. P1-FRTa-G1-T1-FRTb

E. P1-FRTa-G1-T1-FRTa

F. P1-FRTb-G1-T1-FRTb

G. P1-ATG::FRTa::G1(noATG)-T1-P2-G2-T2-FRTb

H. P1-ATG::FRTa::G1(noATG)-T1-P2-G2-T2-FRTb-P3-G3-T3

I. P1-ATG::FRTa::G1(noATG)-T1-FRTa::G2(noATG)-T2-FRTb

J. P1-ATG::FRTa::G1(noATG)-T1-FRTa::G2(noATG)-T2-FRTb-P3-G3-T3

K. P1-FRTa-G1-T1-P2-G2-T2-FRTb

L. P1-FRTa-G1-T1-P2-G2-T2-FRTb-P3-G3-T3

M. P1-FRTa-G1-T1-FRTa-G2-T2-FRTb

N. P1-FRTa-G1-T1-FRTa-G2-T2-FRTb-P3-G3-T3

Se pueden construir variaciones de los mismos con otros promotores, genes, terminadores o sitios FRT.

FRTa y FRTb son dos ejemplos de sitios no idénticos FRT. P1, P2 y P3 son promotores diferentes, G1, G2, y G3 son genes diferentes, T1, T2 y T3 son terminadores diferentes. ATG es el inicio del codón de traducción para el

## ES 2 308 327 T3

gen posterior. La designación noATG indica que gen particular falta del codón de inicio de la traducción de ATG. El símbolo :: implica una fusión entre elementos adyacentes, y donde se los utiliza entre ATG, FRT y un gen, implica que las secuencias son colocadas juntas para generar una fusión de traducción en el marco que resulta en un producto génico funcional y adecuadamente expresado.

5 Desde A hasta F son configuraciones preferidas para analizar nuevos sitios FRT por la habilidad para recombinar secuencias entre ellas; siendo la situación deseada que cuando se utilizan dos del mismo sitio, la recombinación es eficiente y que cuando se utilizan dos sitios diferentes, no tiene lugar una recombinación entre ellas en presencia de proteína FLP. G hasta J son configuraciones preferidas para uso general en líneas de desarrollo para redireccionamiento. Se entiende que se pueden ensamblar cualquier cantidad de genes o de otras combinaciones de secuencias para uso como parte de esta invención. K hasta N son configuraciones posibles que podrían ser utilizadas también.

15 Una vez que se establece una planta estable o tejido cultivado con una de las construcciones anteriores, se introduce una segunda construcción flanqueada por los mismos sitios FRT utilizados para flanquear las secuencias en la primera construcción anterior dentro de los tejidos transformados en forma estable junto con la expresión de proteína FLP. Las nuevas construcciones del vector pueden ser, pero no se limitan a las siguientes:

O. FRTa::G1(noATG)-T1-FRTb

20 P. FRTa::G1(noATG)-T1-P2-G2-T2-FRTb

Q. FRTa-G1-T1-FRTb

R. FRTa-G1-T1-P2-G2-T2-FRTb

25 La proteína FLP puede ser suministrada por medio de a) transformación conjunta con un plásmido que porta a un gen que codifica a FLP; b) introducción conjunta del ARNm de FLP o de una proteína directamente; c) utilización de una línea para la transformación inicial que expresa a FLP ya sea constitutivamente o después de la inducción; o d) surgiendo de las plantas que portan a los vectores inicialmente destinados, cruzando las plantas que expresan proteína FLP activa y eventos de selección en la progenie.

30 Como un ejemplo práctico, se introduce la secuencia O anterior en una línea que contiene una copia de la secuencia G integrada en forma estable en el genoma, en presencia de proteína FLP funcional. Tiene lugar una recombinación entre sitios FRT idénticos tal que la secuencia entre sitios FRT en O reemplaza la secuencia entre los sitios FRT correspondientes de secuencia G, produciendo así una nueva secuencia reintegrada direccionalmente dirigida. El nuevo gen en O es sacado ahora del promotor P1 en G. El propósito para diseñar algunas de las construcciones sin un codón de inicio ATG sobre el gene es a fin de que si ocurre una integración aleatoria, exista una probabilidad extremadamente baja de expresión del gen introducido, ya que para que esto suceda, el fragmento necesitaría integrarse detrás de una región promotora endógena y en el marco de lectura correcto. Esto ocurriría muy raramente y nuestros datos hasta la fecha no han producido ejemplos de que esto ocurra utilizando una secuencia tal como O donde el gen contenido es el gen GUS fácilmente escorable. Un requerimiento para cada gen que es construido en esta forma (esto es, sin ATG sobre el gen pero con el ATG secuencia arriba del sitio FRT) es la demostración de que el gen puede tolerar una fusión de la secuencia FRT entre el codón ATG y el segundo codón de la proteína. Hasta la fecha esto ha funcionado para un buen número pero no para todos los genes; en estos casos se podría utilizar la otra forma de la construcción que retiene al ATG (por ejemplo Q). Todas las secuencias enlistadas anteriormente se espera que funcionen en este esquema, algunos a secuencias o eficiencias diferentes que otros.

50 Uno de los problemas de esta estrategia se ocupa de las limitaciones con los enfoques actuales de transformación, particularmente en plantas, donde el suministro de ADN dentro de las células o núcleos y la posterior integración en el genoma ocurre más o menos aleatoriamente y en forma impredecible. Esto es particularmente cierto con métodos de bombardeo de partículas; se han esgrimido argumentos de que los métodos basados en el *Agrobacterium* tienden a suministrar secuencias flanqueadas en el borde por T-ADN para regiones transcritas más activamente del genoma, pero más allá de que el proceso se encuentra todavía en gran parte al azar. Por lo tanto, para el desarrollo de un producto comercial, se necesita generar gran cantidad de eventos (se estima > 200) con el propósito de identificar un evento: a) que se exprese en el nivel deseado; b) donde el producto génico es funcional y eficaz; c) que tenga una complejidad de integración simple para facilitar la reproducción; d) que no contenga secuencias extrañas que planteen posibles preocupaciones reguladoras; e) que mantenga estabilidad de expresión durante generaciones; f) lo que es más importante, que no tenga un impacto negativo sobre las características de desempeño agronómico cuando es realizado a través de un programa de cría que involucra la introgresión del rasgo dentro de diferentes entornos genéticos. La utilización de recursos es muy grande y para que los esquemas que pueden reducir notablemente la demanda de recursos serían muy beneficiosos para la producción de grandes cantidades de los productos finales deseados.

### Ejemplo 1

#### *Creación de nuevos sitios FRT no idénticos*

65 Se construyeron fragmentos de ADN que contienen nuevas secuencias del FRT ya sea por medio de síntesis, apareamiento y ligación de oligonucleótidos complementarios o por medio de la creación de iniciadores para amplificación por PCR (Mullis y Faloona, 1987) de un producto de ADN que contiene la nueva secuencia FRT cerca del

## ES 2 308 327 T3

extremo 5' del producto de la PCR. El producto FRT recientemente construido incluye sitios de restricción de flaqueo útiles para clonación dentro de unidades de expresión de la planta. En general, el extremo 5' está flanqueado por un sitio NheI y un sitio terminal NcoI. El sitio NcoI incluye las bases ATG, que son convenientemente utilizadas en construcciones de vectores recientemente desarrolladas como la secuencia de reconocimiento para iniciar un marco de lectura abierta. En construcciones basadas en la secuencia, designadas como noATG/FRT, se utiliza el sitio NheI para clonar eliminando por lo tanto al ATG secuencia arriba en el proceso. En el extremo 3' de la secuencia FRT, se incluye un sitio de restricción que hace posible la identificación única de las secuencias espaciadoras individuales. Como ejemplos específicos, se clona el sitio FRT de tipo natural (designado aquí FRT1) con un sitio de flaqueo BglII, el sitio FRT5 (espaciador TTCAAAAG) tiene un sitio ScaI, el sitio FRT6 (espaciador TTCAAAAA) tiene un sitio AatII, y el sitio FRT7 (espaciador TTCAATAA) tiene un sitio SpeI. El sitio externo de restricción de flaqueo es un sitio XhoI y es utilizado para clonar un gen de interés dentro del marco de lectura abierta.

Las estructuras y las secuencias de los sitios FRT como las diseñadas y/o utilizadas en el presente ejemplo de la invención son descritas más abajo con las posiciones de los sitios de restricción, las repeticiones y las regiones espaciadoras indicadas.

### **FRT1 (SEQ ID NO 2)**

NcoI	NheI	Repetición 1	Repetición 2	Espaciador	Repetición Invertida	BglII	XhoI
5'		CCATGGCTAGC	GAAGTTCCTATTC	GAAGTTCCTATTC	TCTAGAAA	GTATAGGAACTTC	AGATCTCGAG

### **FRT5 (SEQ ID NO 3)**

NcoI	NheI	Repetición 1	Repetición 2	Espaciador	Repetición Invertida	ScaI	XhoI
5'		CCATGGCTAGC	GAAGTTCCTATTC	GAAGTTCCTATTC	TTCAAAAG	GTATAGGAACTTC	AGTACTCGAG

### **FRT6 (SEQ ID NO 4)**

NcoI	NheI	Repetición 1	Repetición 2	Espaciador	Repetición Invertida	AatII	XhoI
5'		CCATGGCTAGC	GAAGTTCCTATTC	GAAGTTCCTATTC	TTCAAAAA	GTATAGGAACTTC	AGACGCTCTCGAG

### **FRT7 (SEQ ID NO 5)**

NcoI	NheI	Repetición 1	Repetición 2	Espaciador	Repetición Invertida	SpeI	XhoI
5'		CCATGGCTAGC	GAAGTTCCTATTC	GAAGTTCCTATTC	TTTCAATAA	GTATAGGAACTTC	ACTAGTTCCTCGAG

### Ejemplo 2

#### *Creación de vectores de transformación de plantas que contienen nuevos sitios FRT no idénticos*

Con base en el diseño de sitios FRT como se describió anteriormente, se utilizaron protocolos de PCR o de mutagénesis estándar para crear un sitio XhoI que traslapa el inicio de una secuencia génica que es utilizada para clonación secuencia abajo del sitio FRT, convirtiendo por lo tanto al codón de inicio ATG en GTG. La ligación de un FRT con la secuencia génica mutada en XhoI creas un nuevo marco de lectura abierta que inicia 5' al FRT. Se puede clonar una segunda secuencia FRT secuencia abajo del terminador utilizando una variedad de métodos que incluyen PCR o ligación. La unidad FRT/gen/terminador/FRT puede ser utilizada luego para elaborar construcciones objetivo o sustrato.

Los objetivos son creados por medio de la inserción de un promotor en el sitio NcoI secuencia arriba del primer FRT. Esto mantiene un marco de lectura abierta completo de la fusión FRT/gen. Estas construcciones objetivo son para uso en experimentos de transformación para crear "líneas objetivo" deseables. Los vectores sustrato se construyen por medio de clonación con el sitio NheI para truncar al codón de inicio de la unidad FRT/gen, eliminando así al propio marco de lectura abierta. Estos vectores del sustrato se utilizan en experimentos diseñados para redirigir un nuevo gen flanqueado por sitios FRT dentro de los sitios FRT correspondientes previamente introducidos en las líneas objetivo. En cualquier caso, para crear múltiples casetes génicos, se insertan unidades promotor/gen/terminador adicionales entre el terminador y el segundo FRT ya sea en las moléculas objetivo o sustrato.

### Ejemplo 3

#### *Demostración de funcionalidad de nuevos sitios FRT y el requerimiento de dos sitios idénticos para recombinación eficiente de secuencias de ADN posicionadas entre dos sitios FRT*

Se analizaron plásmidos que contienen dos secuencias idénticas o dos diferentes de FRT por la eficiencia de recombinación de secuencias entre los sitios FRT por medio de transformación dentro de 294-FLP, una versión de la cepa MM294 de *E. coli* con FLP recombinasa integrada dentro del locus lacZ (Buchholz y colaboradores 1996). Las cepas fueron cultivadas durante la noche a 37°C con agitación, permitiendo la expresión constitutiva de la FLP recombinasa en los cultivos. El AND del plásmido fue aislado utilizando procedimientos estándar y digerido con

## ES 2 308 327 T3

enzimas de restricción que crean nuevos fragmentos de restricción después de recombinación mediada por FLP. El grado de recombinación entre sitios FRT se estimó por medio del examen de patrones de bandas sobre un gel de agarosa. La Tabla 1 resume los datos del análisis del gel.

TABLA 1

Combinación del Sitio Objetivo	Grado de Recombinación
<b>FRT1 y FRT1</b>	Completo
<b>FRT5 y FRT5</b>	Extenso, pero parcialmente incompleto
<b>FRT6 y FRT6</b>	Completo
<b>FRT7 y FRT7</b>	Completo
<b>FRT1 y FRT5</b>	Sin recombinación
<b>FRT1 y FRT6</b>	Sin recombinación
<b>FRT1 y FRT7</b>	Sin recombinación
<b>FRT5 y FRT6</b>	Sin recombinación
<b>FRT5 y FRT7</b>	Sin recombinación
<b>FRT6 y FRT7</b>	Cantidad muy pequeña de recombinación

Los resultados de estos estudios indican que la escisión de secuencias entre sitios FRT idénticos ocurre con alta eficiencia en general (FRT5, SEQ ID NO 3, parece ser menos eficiente en términos generales que los sitios FRT1, SEQ ID NO 2, o el nuevo FRT6, SEQ ID NO 4, y FRT 7, SEQ ID NO 5). Igualmente, estuvo ausente la recombinación con dos sitios diferentes FRT, o al menos indetectable bajo las condiciones de este ensayo para todas las combinaciones pero FRT6, SEQ ID NO 4, y FRT7, SEQ ID NO 5, donde se observó un pequeño grado de recombinación. Estos datos proveyeron un fuerte soporte para la utilidad potencial de sitios FRT no idénticos en el desarrollo de un sistema direccional de integración génica. Un punto para tener en cuenta es que debido a que puede ocurrir recombinación de secuencias entre dos sitios FRT idénticos con eficiencias diferentes dependiendo del sitio FRT específico utilizado (por ejemplo, FRT5, SEQ ID NO 3, en el presente experimento), el diseño de construcciones para integración direccional dirigida puede requerir una selección juiciosa de pares de sitios FRT para optimizar la eficiencia de recombinación deseada o para evitar cualquier recombinación no deseada.

### Ejemplo 4

*Introducción de secuencias de ADN que incluyen nuevos sitios FRT no idénticos dentro de células de plantas, generación y recuperación de eventos transgénicos estables ("líneas objetivo"), preservación de "líneas objetivo" y regeneración de plantas*

Se produjeron una cantidad de eventos transgénicos estables que portan sitios FRT objetivo. Estas líneas objetivo fueron generadas por medio de la introducción de una serie de construcciones que incluyen, por ejemplo, PHP9643, PHP10616, PHP11407, PHP11410, PHP11457, PHP11599, PHP11893 o PHP14220 (Ver Tabla 2) dentro de células de maíz, ya sea por medio del bombardeo de partículas, como se describe en Register y colaboradores (1994) Plant Mol. Biol. 25: 951-961 o a través del cocultivo de *Agrobacterium* como lo describen Heath y colaboradores (1997) Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 22-227; Hiei y colaboradores (1994) Plant J. 6: 271-282 e Ishida y colaboradores (1996) Nat. Biotech. 14: 745-750, y en la Solicitud Estadounidense Provisional con Serial No. 60/045.121 denominada "Agrobacterium Mediated Sorghum Transformation", presentada el 30 de abril de 1997. Todos los vectores fueron contruidos utilizando técnicas estándar de biología molecular como se describe por ejemplo en Sambrook y colaboradores, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2da ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y.). La Tabla 2 a continuación describe los componentes dentro de cada uno de los vectores utilizados para crear un conjunto de líneas objetivo. La estrategia de montaje fue la siguiente. La primera unidad de expresión en cada caso contiene al fragmento PstI de 2,0 kb del promotor de ubiquitina de maíz Ubi-1 (Christensen y colaboradores (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675-689). Secuencia abajo del promotor de ubiquitina, se insertaron diversas secuencias del FRT utilizando NcoI u otros sitios que retuvieron al codón de inicio ATG. PHP10616 tiene la secuencia de codificación mo-PAT (Solicitud de Patente Estadounidense Provisional con Serial No. 60/035.560 denominada "Methods for Improving Transformation Efficiency", presentada el 14 de enero de 1997) fusionada en el marco al sitio XhoI que flanquea a FRT1 (ver más arriba, SEQ ID NO 2). PHP11407 y PHP11893 tienen GFPm-C3 (PCT/US97/07688 presentada el 1 de mayo de 1997 a partir de la Solicitud Provisional 60/016.345 presentada el 1 de mayo de 1996) que contiene al segundo intrón ST-LS1 de patata (Vancanneyt y colaboradores (1990) Mol. Gen. Genet. 220:245-250) fusionado en el marco al sitio XhoI de FRT1 y FRT6, respectivamente. Se ligó al inhibidor II terminador de la proteinasa de patata (PinII) (bases 2 a 310 de An y colaboradores (1989) Plant Cell 1:115-122) secuencia debajo de las secuencias de codificación. PHP10616 tiene una secuencia FRT5 (SEQ ID NO 3) clonada secuencia abajo del PinII terminador.

Tabla 2

PHP	Secuencia arriba-1	Codificación-1	Secuencia abajo-1	Secuencia arriba -2	Codificación -2	Secuencia abajo -2	Codificación -3	Secuencia abajo -3
9643	Ubiquitina	ATG/FRT1		intrón E35S/35S/O' /ADH	moPAT	35S term.	NoATG/FUT1 /GFPm	pinII, FRT5
10616	Ubiquitina	ATG/FRT1/moPAT	pinII, FRT5					
11407	Ubiquitina	ATG/FRT1/GFPm-C3-intrón	pinII	Ubiquitina	HM1	pinII, FRT5		
11410	Ubiquitina	ATG/FRT5		intrón E35S/35S/O' /ADH	BAR	35S term. FRT1		
11457	Ubiquitina	ATG/FRT6		Intrón E35S/35S/O' /ADH	BAR	35S term. FRT1		
11599	Ubiquitina	ATG/FRT6		intrón 35S/O' /ADH	BAR	35S term, FRT1		
11893	Ubiquitina	ATG/FRT6/GFPm-C3-intrón	pinII	Ubiquitina	HM1	pinII, FRT1		
14120	Ubiquitina/FR T1 en 5'UTR	FLPm	pinII	Ubiquitina	GFPm	pinII, FRT5		
	Ubiquitina/FR T1 en el intrón	FLPm	pinII	Ubiquitina	GFPm	pinII, FRT5		

## ES 2 308 327 T3

Las segundas unidades de expresión tienen al promotor de ubiquitina del maíz o alternativamente ya sea a la versión mejorada o a la estándar del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. El promotor estándar 35S incluye las bases -421 a +2 (de Gardner y colaboradores (1981) Nucl. Acids Res. 9: 2871-2888), y la versión mejorada tiene una duplicación de bases -421 a -90 secuencia arriba de este promotor 35S estándar. Se inserta el líder O' del virus del mosaico del tabaco de 79 pb (Gallie y colaboradores (1987) Nucl. Acids Res. 15: 3257-3273) secuencia abajo del promotor 35S seguido por el primer intrón de la deshidrogenasa alcohólica del maíz: gen ADH 1-S (Dennis y colaboradores (1984) Nucl. Acids Res. 12:3983-3990). Las secuencias de codificación en estas segundas unidades de expresión incluyen ya sea a los genes mo-PAT, bar (Thompson y colaboradores (1987) EMBO J. 6: 2519-2523), o HM1 (Johal y Briggs, Science 258:985-987) seguidos por, ya sea el PinII terminador o el 35S terminador (nucleótidos 7487-7639 en Gardner y colaboradores (1981) Nucl. Acids Res. 9: 2871-2888). Diferentes sitios FRT están ligados secuencia abajo de los terminadores como se muestra en la tabla. Una tercera unidad de expresión está presente en PHP9643 y tiene una fusión FRTI/GFPm clonada utilizando el sitio de flanqueo NheI de FRT1 (SEQ ID NO 2) para remover el codón de inicio ATG de GFPm, haciéndola por lo tanto no funcional en la construcción existente, pero donde la escisión correcta de secuencias entre los sitios FRT1 (SEQ ID NO 2) puede traer al GFPm en el marco con el promotor de ubiquitina y ATG de la primera unidad de expresión, haciéndola por lo tanto funcional. Secuencia abajo de GFPm está el PinII terminador seguido por una secuencia FRT5 (SEQ ID NO 3).

PHP9643 fue clonado dentro de una columna vertebral del plásmido derivado de pUC. Todos los otros vectores fueron clonados dentro de un plásmido tipo pSB11 (Ver, por ejemplo, EPA0672752A1, EPA0604662A1, EPA0687730A1 y la patente estadounidense No. 5.591.616) con las unidades de expresión contenidas entre las secuencias TDNA del borde. Todas están orientadas con una unidad de expresión adyacente al borde derecho. Se integraron los plásmidos con base en pSB11 dentro del plásmido súper binario pSB1 (Ver, por ejemplo, EPA0672752A1, EPA0604662A1, EPA0687730A1 y la patente estadounidense No. 5.591.616) por medio de recombinación homóloga entre los dos plásmidos. La cepa HB101 de *E. coli* que contiene a los derivados pSB11 fue cruzada con la cepa LBA4404 de Agrobacterium que hospeda pSB1 para crear a los plásmidos cointegrados PHP10616, PHP11407, PHP11410, PHP11457, PHP11599, PHP11893 y PHP14220 en Agrobacterium (por medio del método de Ditta y colaboradores (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7347-7351). Los cointegrados fueron verificados por resistencia del Agrobacterium a espectinomicina y a digestiones de restricción Sall.

La Tabla 2 también incluye un ejemplo de un vector para crear una línea objetivo donde los sitios FRT son insertados en el intrón de ubiquitina del maíz (última entrada) como una ubicación alternativa para la colocación de FRT o de otros sitios objetivo.

Después de la selección de eventos transformados en forma estable, se criopreservaron muestras de estas líneas objetivo como un suministro para futuros experimentos utilizando la aproximación descrita por Peterson (ver solicitud 08/859.313). Para varios pero no para todos los eventos, se cultivó otra muestra de callo de varios de los eventos transgénicos estables, se la transfirió sobre medio de regeneración para inducir la formación de plántulas y se recuperaron luego las plantas y se las cultivó hasta la madurez (Register y colaboradores (1994) Plant Mol. Biol. 25:951-961).

### Ejemplo 5

#### *Demostración de funcionalidad de nuevos sitios FRT en plantas*

(A) *Escisión de secuencias de ADN entre dos sitios FRT idénticos, pero no cuando están flanqueadas por dos secuencia FRT no idénticas*

Se examine el grado de recombinación dentro del plásmido en plantas utilizando las construcciones de escisión de FRT descritas en la Tabla 3 más abajo. Se construyeron los vectores PHP10968, PHP10998, PHP10969, PHP11272, PHP11243, PHP11244, PHP12140, PHP12141, PHP12156, y PHP12157 por medio de la ligación del promotor de Ubiquitina del maíz secuencia arriba de las secuencias del FRT utilizando NcoI u otros sitios que mantuvieron al codón de inicio ATG. Se fusionó la secuencia FRT en el marco del sitio de flanqueo XhoI a una secuencia GFPm que contenía una mutación de serina por treonina en el residuo aminoácido 65 en la secuencia de tipo natural (nueva secuencia denominada GFPm-S65T). Se clonó al pinII terminador secuencia abajo de GFPm. La segunda unidad de expresión consiste de un FRT sin promotor, clonado con el sitio de flanqueo NheI 5' para remover al codón de inicio ATG, fusionado en el marco a la secuencia de codificación de GUS (Jefferson y colaboradores (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8447-8451) y seguido por el pinII terminador. La columna vertebral del vector es un plásmido derivado de pUC en todos los casos. Se llevaron a cabo experimentos por medio de bombardeo de los plásmidos indicados dentro de células de maíz junto con la construcción PHP5096, que porta un casete de expresión funcional para la proteína FLP. PHP5096, el vector de expresión de FLPm que fue utilizado en experimentos con la escisión y vectores sustrato, consiste del promotor de Ubiquitina del maíz clonado secuencia arriba de la secuencia de codificación de FLPm (solicitud estadounidense de patente con serial No. 08/972.258 denominada "Novel Nucleic Acid Sequence Encoding FLP Recombinase") y el pinII terminador en una columna vertebral de plásmido derivada de pUC. En cada caso, la escisión exitosa removería las secuencias que intervienen entre los sitios FRT indicados trayendo por lo tanto un gen uidA (GUS) inactivo en el marco con y en la proximidad del promotor de ubiquitina resultando en la actividad de GUS. Si no ocurre la escisión, no se espera expresión de GUS. Los resultados de la expresión de GUS de estos experimentos están indicados en la Tabla 4 más abajo. En estos estudios la escisión eficiente ocurrida únicamente donde las construcciones contenían dos sitios FRT idénticos. En el caso de la combinación de FRT6 (SEQ ID NO 4) y FRT7 (SEQ ID NO 5), se observó una pequeña cantidad de recombinación, enfatizando nuevamente la necesidad de analizar las combinaciones del sitio objetivo y seleccionando juiciosamente combinaciones apropiadas para la aplicación.

Tabla 3

PHP	Secuencia arriba -1	Codificación-1	Secuencia abajo-1	Secuencia arriba-2	Codificación-2	Secuencia abajo-2
10968	Ubiquitina	ATG/FRT1/GFPm-S65T	PinII		noATG/FRT1/GUS	pinII
10998	Ubiquitina	ATG/FRT5/GFPm-S65T	PinII		noATG/FRT5/GUS	pinII
11272	Ubiquitina	ATG/FRT6/GFPm-S65T	PinII		noATG/FRT6/GUS	pinII
12157	Ubiquitina	ATG/FRT7/GFPm-S65T	PinII		noATG/FRT7/GUS	pinII
10969	Ubiquitina	ATG/FRT1/GFPm-S65T	PinII		noATG/FRT5/GUS	pinII
11243	Ubiquitina	ATG/FRT1/GFPm-S65T	PinII		noATG/FRT6/GUS	pinII
12140	Ubiquitina	ATG/FRT1/GFPm-S65T	PinII		noATG/FRT7/GUS	pinII
11244	Ubiquitina	ATG/FRT5/GFPm-S65T	PinII		noATG/FRT6/GUS	pinII
12141	Ubiquitina	ATG/FRT5/GFPm-S65T	PinII		noATG/FRT7/GUS	pinII
12156	Ubiquitina	ATG/FRT6/GFPm-S65T	PinII		noATG/FRT7/GUS	pinII
12933	Ubiquitina/FRTI en 5' UTR	GFPm-S65T	PinII	FRT1 en 5' UTR/ intrón Ubi	GUS	pinII
14076	Ubiquitina/FRTI en el intrón	AHAS	PinII	FRTI en el intrón Ubi	GUS	pinII
14053	Ubiquitina/FRTI en el intrón	AHAS	PinII	FRT5 en el intrón Ubi	GUS	pinII
14086	Ubiquitina/FRTI en el intrón	AHAS	PinII	FRT6 en el intrón Ubi	GUS	pinII

## ES 2 308 327 T3

TABLA 4

Plásmido	Recombinación analizada entre	Expresión de GUS
PHP10968	FRT1 y FRT1	+++
PHP10998	FRT5 y FRT5	++
PHP11272	FRT6 y FRT6	+++
PHP12157	FRT7 y FRT7	+++
PHP9643	FRT1 y FRT5	-
PHP11243	FRT1 y FRT6	-
PHP12140	FRT1 y FRT7	-
PHP11244	FRT5 y FRT6	-
PHP12141	FRT5 y FRT7	-
PHP12156	FRT6 y FRT7	+

B) Integración transitoria de una segunda secuencia de ADN flanqueada por dos secuencias del FRT no idénticas dentro de las células de la planta

En la Tabla 5 más abajo están resumidos los datos de los experimentos en los cuales las líneas objetivo creadas utilizando los plásmidos descritos en la Tabla 2 fueron bombardeadas con un plásmido sustrato que contenía un gen reportero GUS flanqueado por los sitios FRT correspondientes utilizados en las construcciones objetivo. Este experimento midió la habilidad para detectar la expresión transitoria de GUS poco después de la introducción del plásmido sustrato. Ya que no hay un promotor en frente de la primera secuencia de codificación en los plásmidos sustrato, integración aleatoria, a menos que ocurra en el marco detrás de una secuencia reguladora apropiada en alguna otra parte en el genoma, no resultaría en expresión de GUS. Este sistema de ensayo evalúa entonces la habilidad para dirigir a los genes flanqueados FRT dentro de sitios FRT en el genoma. En general, los vectores sustrato del FRT (Tabla 6) son construidos como fusiones FRT/gen sin promotor clonadas utilizando el sitio NheI de flaqueo 5' del FRT para remover al codón de inicio ATG. Los genes fusionados en el marco al FRT con el sitio de flaqueo XhoI incluyen uno de varios genes marcadores escorables o seleccionables tales como aadA (Svab y colaboradores (1990) Plant Mol. Biol. 14: 197-205), uidA, GFPm, GFPm-C3/intrón o bar y están seguidos por un pinII terminador. En algunos casos (PHP10259, PHP10603, PHP11561, y PHP11633), los plásmidos contienen una única unidad de expresión y el segundo sitio FRT heterólogo está cerrado secuencia abajo del pinII. Los plásmidos sustrato PHP10859, PHP10997, PHP11204, PHP11699, y PHP12190 tienen además de la primera unidad de expresión descrita anteriormente, una segunda unidad que consiste del promotor de ubiquitina del maíz, el promotor 35S mejorado o un promotor quimérico que consiste de la región reforzadora 35S clonada secuencia arriba de un promotor central sintético llamado Rsyn7 (solicitud de patente estadounidense con serial No. 08/661.601 presentada el 11 de junio de 1996) clonado secuencia arriba ya sea las secuencias de codificación HM1, aadA, GUS, o bar y el pinII terminador. Se inserta un FRT heterólogo secuencia abajo del segundo terminador. Finalmente, PHP11003 y PHP11809 contienen tres unidades de expresión. La primera unidad es una fusión noATG/FRT/gen sin promotor como se describió anteriormente, la segunda unidad contiene ya sea al promotor Rsyn7/reforzador quimérico 35S descrito anteriormente o al promotor ZmdJ1 (Baszczynski y colaboradores (1997) Maydica 42: 189-201) clonados secuencia arriba de la secuencia de codificación de GUS y el pinII terminador. La tercera unidad de expresión consiste del promotor de ubiquitina del maíz clonado secuencia arriba de la secuencia de codificación de HM1, pinII terminador y una secuencia FRT heteróloga. Todos los vectores sustrato del FRT son clonados dentro de una columna vertebral del plásmido derivado de pUC. Los detalles de los componentes de estos vectores están descritos en la Tabla 6. También están enlistados en la Tabla 6 dos vectores con ubicación alternativa de los sitios FRT en el 5' UTR de ubiquitina o intrón.

TABLA 5

# de manchas de GUS	PHP9643 (n=74)	PHP11147 (n=127)	PHP11410 (n=32)	PHP11407 (n=38)	PHP11457 (n=113)
sin manchas	17,57%	3,15%	6,25%	2,63%	7,96%
1-25	22,97%	48,03%	62,50%	10,53%	27,43%
26-100	31,08%	37,80%	18,75%	18,42%	32,74%
101-200	14,86%	8,66%	12,50%	57,89%	27,43%
incontables	13,51%	2,36%	0,00%	10,53%	4,42%

Tabla 6

PHP	Codificación-1	Secuencia abajo-1	Secuencia arriba-2	Codificación-2	Secuencia abajo-2	Secuencia arriba-3	Codificación-3	Secuencia abajo-3
10259	NoATG/FRT1/aadA	pinII, FRT5						
10603	NoATG/FRT1/GUS	pinII, FRT5						
10859	NoATG/FRT1/GFPm	pinII	Ubiquitina	HM1	pinII, FRT5			
10997	NoATG/FRT5/GUS	pinII	Ubiquitina	aadA	pinII, FRT5			
11003	NoATG/FRT1/GFPm	pinII	intrón E35S/Rsyn7/O'/ADH	GUS	pinII	Ubiquitina	HM1	pinII, FRT5
11204	NoATG/FRT1/BAR	pinII	Intrón E35SIRsyn7/O'/ADH	GUS	pinII, FRT5			
11561	NoATG/FRT6/GUS	pinII, FRTI						
11633	NoATG/FRT5/GUS	pinII, FRTI						
11699	NoATG/FRT6/GFPm- C3-intrón	PinII	Ubiquitina	HM1	pinII, FRTI			
11809	NoATG/FRT6/GFPm- C3-intrón	Finn	F3.7	GUS	pinII	Ubiquitina	HM1	pinII, FRTI
12190	NoATG/FRT1/GUS	PinII	intrón E35S135S/O'/ADH	BAR	pinII, FRT5			
			Ubiquitina/FRT1 en 5' UTR	HM1	pinII	intrón E35S/35S/O'/ADH	BAR	pinII, FRT5
			Ubiquitina/FRT1 en intrón	HM1	pinII	intrón E35S/35S.O'/ADH	BAR	pinII, FRT5

## ES 2 308 327 T3

Los resultados en la Tabla 5 indican que la frecuencia y el nivel de expresión de GUS varían entre diferentes eventos, como se puede predecir por los genes insertados en diferentes posiciones en el genoma. La predicción es que una vez que se identifica una línea de alta expresión y alta frecuencia, que la expresión de los genes introducidos posteriormente dentro de esos mismos sitios será también más alta que en otros eventos que expresan menos.

5

C) Integración estable de una segunda secuencia de ADN flanqueada por dos secuencias de FRT no idénticas en células de plantas

Se utilizó un subconjunto de las "líneas objetivo" transgénicas estables descritas en el ejemplo 4 anterior en experimentos con el propósito de redireccionar en forma estable dentro de estas líneas objetivo primarias un nuevo gen flanqueado por los mismos sitios FRT utilizados en las líneas objetivo y clonado en una segunda construcción de plásmido "sustrato". En la Tabla 7 se enlistan las construcciones contenidas en las líneas objetivo primarias (de la Tabla 2), los sitios FRT contenidos en estas líneas y los plásmidos sustrato (de la Tabla 6) que fueron posteriormente redireccionados dentro de las líneas objetivo.

15

La Tabla 8 presenta los datos de eventos transgénicos estables que demuestran el direccionamiento exitoso y reproducible de las secuencias introducidas para los sitios genómicos objetivo previamente creados. Los datos mostrados son para 18 líneas objetivo independientes, cada una direccionada con una construcción de GUS sin promotor. Ya que el gen bar gene fue introducido al mismo tiempo sobre el mismo plásmido, la proporción de eventos que expresan GUS del total de eventos recuperados sobre una selección de bialofos proporciona una medida de la frecuencia de redireccionamiento con relación a una integración aleatoria.

20

TABLA 7

25

Construcción Objetivo	Sitios FRT	Sustratos que están siendo evaluados
<b>PHP9643</b>	1/1/5	10603, 10259, 10859, 10997, 11003
<b>PHP11147</b>	1/5	10603, 10859, 11003
<b>PHP11407</b>	1/5	10603, 11204, 12190
<b>PHP11410</b>	5/1	1 11633
<b>PHP11457</b>	6/1	11561, 11699, 11809
<b>PEP11893</b>	6/1	Experimentos en progreso

30

35

40

TABLA 8

45

Línea Objetivo	# de Eventos Aleatorios	# de Eventos Dirigidos	Frecuencia Objetivo (%)
A	13	1	7,1
B	14	1	6,7
C	108	14	11,5
D	18	1	5,3
E	14	2	12,5
F	9	1	10,0
G	65	1	1,5
H	63	9	12,5
I	71	6	7,8
J	15	1	6,3
K	33	9	21,4
L	19	2	9,5

50

55

60

65

## ES 2 308 327 T3

TABLA 8 (continuación)

Línea Objetivo	# de Eventos Aleatorios	# de Eventos Dirigidos	Frecuencia Objetivo (%)
M	8	1	11,1
N	12	1	7,7
O	29	4	12,1
P	43	4	8,5
Q	16	3	15,8
R	4	1	20,0
S	12	1	7,7
T	10	1	9,1
U	1	2	66,7

### Ejemplo 6

*Evaluación del impacto de secuencias introducidas del FRT sobre el desarrollo de las plantas, expresión génica y desempeño agronómico*

La evaluación inicial del impacto de las secuencias introducidas sobre el crecimiento de las plantas y la expresión génica se realiza en el invernadero por medio de observaciones regulares a través de polinización y de la semilla sembrada. Las plantas se someten tanto a reproducción vegetativa como a cruzamiento con otros genotipos para obtener una semilla T1 para evaluación posterior en invernadero y en campo. Para la evaluación de la expresión génica, se recolectan tanto datos cualitativos como cuantitativos y se analizan. Las semillas T1 de eventos transgénicos que producen niveles aceptables o deseables de expresión y que no muestran un impacto negativo significativo sobre el desarrollo de la planta (por ejemplo, tienen morfología normal de desarrollo, son macho y hembra fértiles, etc.) se cultivan luego en porciones de terreno administradas junto con plantas de control no transgénicas, y se recolectan datos estándar de desempeño agronómico y se evalúan.

### Ejemplo 7

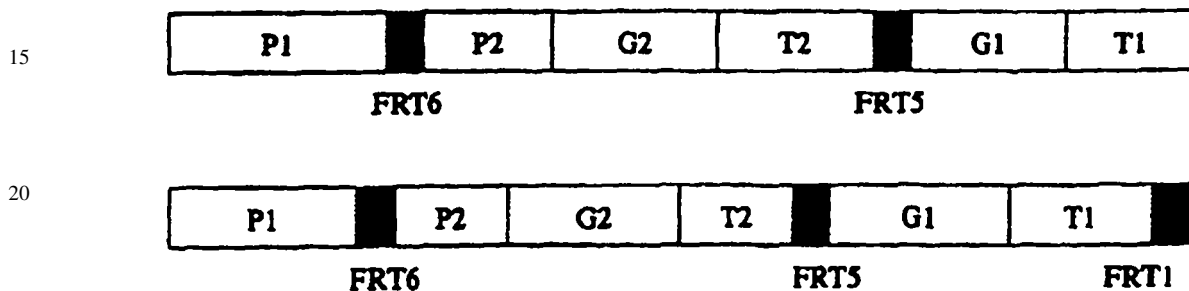
*Conversión de una secuencia funcional del FRT introducida dentro de una segunda secuencia del FRT funcional no idéntica*

El enfoque utilizado aquí para desarrollar un método para conversión entre diferentes sitios FRT para uso en diferentes aplicaciones se basa en la estrategia previamente descrita de "quimeroplastia" para hacer modificaciones específicas dirigidas de nucleótidos con una secuencia genómica objetivo o extracromosomal especificada en células animales (Yoon y colaboradores (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 2071-2076; Cole-Strauss y colaboradores (1996) Science 273: 1386-1389). Esta posibilidad en plantas, como se demostró recientemente en nuestros laboratorios es benéfica para extender el uso potencial de la presente invención para una aplicación más amplia. El uso propuesto de esta tecnología de "quimeroplastia" en la presente invención sería dirigir y modificar nucleótidos en un sitio FRT de un par de sitios FRT no idénticos que flanquean a una secuencia de ADN de interés en una forma que hace a los dos sitios FRT idénticos. La expresión posterior o concurrente de la FLP recombinasa en células con estas modificaciones del sitio FRT conduciría a escisión de las secuencias entre estos sitios FRT ahora idénticos, removiendo así específicamente las secuencias indeseables de ADN del evento transgénico estable previamente creado que contiene aquellas secuencias. Una aplicación de esta metodología estaría por ejemplo en el caso de un marcador seleccionable que es requerido durante las etapas iniciales de un programa de cultivo o de retrocruzamiento para mantener y seleccionar plantas individuales preferidas, pero que no es deseada en el producto final.

A) *Diseño y construcción de un vector para analizar la conversión del sitio FRT basado en quimeroplastia*

Los vectores objetivo para evaluar esta estrategia de modificación del sitio FRT se muestran genéricamente más abajo, donde P1 y P2 representan a dos promotores diferentes, G1 y G2 representan a dos genes, y T1 y T2 representan a dos regiones terminadoras; estas regiones se muestran como cajas blancas. Diferentes sitios FRT están indicados y son mostrados como cajas oscuras. Una versión de la construcción incorpora a un tercer sitio FRT único secuencia abajo del segundo gen y es utilizada para evaluar si la conversión dirigida, en este caso, de FRT5 a FRT6 (SEQ ID NO 4), también resulta en una conversión del sitio FRT1 (SEQ ID NO 2) secuencia abajo hasta un sitio FRT6 (SEQ

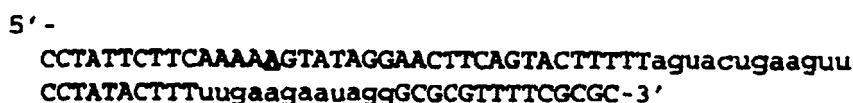
ID NO 4). En el caso anterior, la expresión del gen secuencia abajo se detectaría (G1), mientras que si la conversión no es específica para FRT5 (SEQ ID NO 3) y el sitio FRT1 (SEQ ID NO 2) es convertido también, entonces ambas actividades génicas se perderán. Para los ejemplos específicos utilizados aquí, P1 es el promotor de ubiquitina de maíz, P2 es el promotor mejorado CaMV 35S, G es el gen uidA (GUS), G2 es el gen bar, y T1 y T2 son pinII terminadores. Se entiende que con base en las diferentes descripciones anteriores de construcciones de vectores en esta solicitud, se podrían utilizar una variedad de diferentes promotores, genes, terminadores o secuencias de ADN o sitios FRT en la práctica de este método componente. Los casetes de ADN como los mostrados más abajo podrían ser ensamblados ya sea dentro de un plásmido basado en pUC por métodos directos de suministro de ADN (tal como el bombardeo de partículas) o dentro de un vector binario para transformaciones basadas en el Agrobacterium como se describió previamente.



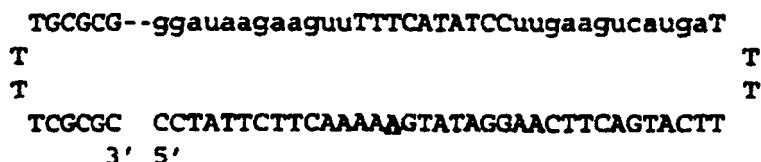
B) *Diseño de moléculas quiméricas de oligonucleótido para conversión dirigida con base en quimeroplastia de un sitio FRT*

Más abajo se muestran ejemplos específicos de moléculas quiméricas que se utilizarían para modificar un único nucleótido a fin de convertir el sitio FRT5 (SEQ ID NO 3) en un sitio FRT6 (SEQ ID NO 4) en construcciones como las descritas anteriormente. Se muestran tanto la secuencia lineal de estas moléculas quiméricas así como la forma activa predicha de la molécula (con base en las publicaciones anteriores de Yoon y colaboradores y de Cole-Strauss y colaboradores). Los residuos de ADN están representados en letras mayúsculas, los residuos de ARN en letras minúsculas, y el sitio que va a ser modificado (una única diferencia de nucleótidos entre FRT5, SEQ ID NO 3, y FRT6, SEQ ID NO 4) está subrayada y en negrilla. Más abajo se presentan dos ejemplos de quimeras que difieren en el número de residuos secuencia abajo del sitio FRT5 (SEQ ID NO 4) que estarían incluidos en el diseño de la molécula quimérica y que determinarían por lo tanto la especificidad con la secuencia objetivo.

1. *Secuencia quimérica lineal de oligonucleótidos* (la secuencia incluye seis residuos específicos objetivo secuencia abajo del sitio FRT que está siendo modificado en la construcción objetivo y debe convertir únicamente este sitio FRT5 único específico, SEQ ID NO 3, en un sitio FRT6, SEQ ID NO 4)



*Conformación activa del oligonucleótido*



## ES 2 308 327 T3

2. *Secuencia química lineal del oligonucleótido* (la secuencia contiene residuos específicos únicamente para las secuencias en el sitio FRT y por lo tanto deberían convertir el sitio FRT5, SEQ ID NO 3, en una molécula objetivo para un sitio FRT6, SEQ ID NO 4)

5  
5' -  
TATTCTTCAAAAAGTATAGGAAGCTTCTTTTgaaguuccuaTACTTTuuga  
agaauaGCGCGTTTTTCGCGC-3'

10

*Conformación activa del oligonucleótido*

15  
TGCGCG - -auaagaaguTTTCATAuccuugaagT  
T T  
T T  
20  
TCGCGC TATTCTTCAAAAAGTATAGGAAGCTTCT  
3' 5'

Se generaron construcciones vectoriales y moléculas químicas de oligonucleótido como se describió anteriormente y se las utilizó en experimentos.

### 25 C) *Demostración de conversiones de un sitio FRT en otro*

Se generan líneas estables transgénicas de maíz con las construcciones como se describió anteriormente o con otras relacionadas por medio de la transformación en las construcciones y seleccionando sobre bialofos como se describió anteriormente. Los tejidos que son utilizados para el suministro de quimera son transferidos sobre medio que no contiene bialofos y se suministran los oligonucleótidos químicos dentro de las células de estos eventos estables por medio de bombardeo de partículas, junto con el suministro conjunto de PHP5096 que porta un casete de expresión funcional de FLP recombinasa. En experimentos de control, únicamente se suministran moléculas químicas o únicamente PHP5096. Después de un período suficiente de tiempo para las células para recuperarse sin selección de bialofos, se evaluaron las muestras de los eventos bombardeados por la expresión de GUS. Para aquellos eventos bombardeados que contienen la construcción con el sitio FRT1 secuencia abajo (SEQ ID NO 2) que no muestran expresión de GUS, se sembró en placa una muestra equivalente de células y se la cultivó sobre medio con o sin selección de bialofos para evaluar la sensibilidad al químico. Si las moléculas químicas son específicas para modificar únicamente al sitio FRT5 (SEQ ID NO 3), entonces no se deben observar diferencias en cantidad y crecimiento de las células entre tratamientos con o sin selección. De lo contrario, debe observarse un crecimiento reducido y de recuperación.

40

### D) *Verificación molecular de conversión estable de sitios FRT*

Se aísla el ADN de estas muestras que exhiben expresión de GUS, se lo amplifica por medio de PCR si es necesario, y se lo secuencia por medio de métodos estándar a través de la región correspondiente a la conversión predicha de nucleótidos. Se secuencia un tramo suficiente de ADN para cubrir la región completa originalmente introducida de ADN a fin de confirmar una conversión correcta y específica. Utilizando métodos estándar para la PCR, análisis de Southern y/o secuenciación de muestras que expresan y que no expresan GUS se establece la presencia o la ausencia de fragmentos específicos de ADN antes de y después de la molécula química y el suministro de FLP recombinasa, y luego confirmar las observaciones visuales y bioquímicas hechas anteriormente.

50

### E) *Utilidad de la conversión del sitio FRT con base en quimeroplastia en una estrategia de apilamiento del transgen para plantas*

En la Figura 1 se describe una estrategia potencial para la combinación o el apilamiento de múltiples transgenes deseados en una ubicación genómica utilizando el sistema basado en FRT no idénticos de la presente invención. Aunque el apilamiento de genes se puede lograr sin el uso del método de conversión dirigida de FRT descrito en este ejemplo 7, este método extiende las posibilidades del sistema permitiendo la conversión *in vivo* de sitios FRT para crear nuevos sitios, en vez de introducir nuevamente nuevos sitios FRT por medio de transformación. En el diagrama de la Figura 1, un sitio FRT con un asterisco al lado indica que fue creado inicialmente para ser no funcional con respecto a la recombinación entre él y el sitio FRT equivalente sin un asterisco, pero que por conversión con la aproximación basada en quimeroplastia descrita aquí la hace capaz de recombinación con su contraparte equivalente sin asterisco. En el ejemplo específico presentado en la figura, esto facilitaría por ejemplo la remoción de un marcador seleccionable ya sea para no tenerlo más presente, o para permitir reutilizar al marcador seleccionable en transformaciones futuras. Por lo tanto, este método también provee un mecanismo para reciclar marcadores seleccionables, tal como utilizando el sistema FRT de la presente invención solo.

65

### Discusión

Hasta el momento en las plantas, la principal aplicación del sistema FLP/FRT ha sido para la escisión de ADN (Lyznik y colaboradores (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 969-975). Por ejemplo, se introduce primero como un marcador seleccionable flanqueado por sitios FRT en células de plantas por medio de una de varias aproximaciones de transformación, y se recuperaron eventos transgénicos estables o plantas a través de una selección apropiada. Luego, con el propósito de eliminar al gen marcador seleccionable, la proteína FLP se expresa en las células ya sea en forma transitoria por medio de la introducción en forma estable de un plásmido que porta un casete de expresión de FLP, después de la integración de un casete de expresión FLP introducido, o por medio de cruzamiento de plantas que portan al gen marcador seleccionable flanqueado por FRT con plantas que portan secuencias para, y que expresan proteína FLP activa (solicitud de patente estadounidense con serial No. 08/972.258 denominada “Novel Nucleic Acid Sequence Encoding FLP Recombinase”).

Un problema principal asociado con el desarrollo del sistema FLP/FRT para integrar genes en animales o en tallos de plantas a partir del hecho de que la reacción de recombinación catalizada por FLP recombinasa de levadura es un proceso reversible (Sadowski (1995) en *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 51:53-91). Por ejemplo, después de la introducción de una secuencia de ADN flanqueada por sitios FRT similarmente orientados en células de plantas en presencia de FLP recombinasa que se expresa activamente, la recombinación debe conducir a la inserción de las nuevas secuencias de ADN en el sitio FRT endógeno. Sin embargo, con expresión continuada de la enzima FLP, la reacción inversa conduciría a la nueva escisión de las secuencias introducidas debido a la recombinación entre sitios FRT idénticos. Ya que la reacción es reversible, la integración y la escisión pueden continuar repetidamente hacia el equilibrio. En la medida en que las células se dividen y la concentración del sustrato de ADN por célula disminuye, la probabilidad de la integración disminuye, de tal manera que en general, mientras que la proteína activa FLP se expresa, la reacción se dirigirá hacia el estado no integrado. Para favorecer la integración, se debe establecer una situación que impida la nueva escisión una vez que ocurra la integración. Se han sugerido una cantidad de estrategias, incluida la limitación de la duración de actividad de la FLP recombinasa a través de la expresión inducible o por medio de la introducción directa de la proteína FLP o del ARN dentro de las células (Sadowski (1995) *Progress on Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 51:53-91), pero hasta la fecha no se ha establecido un sistema de integración de rutina no aleatorio para plantas.

La presente invención describe el desarrollo de un nuevo sistema útil de reconocimiento génico para plantas que utiliza la FLP recombinasa de levadura o una FLP recombinasa modificada diseñada para trabajar más eficientemente en ciertas especies de plantas y nuevos sitios FRT no idénticos que pueden ser utilizados para integración direccional no reversible de ADN. Adicionalmente, se describe aquí un nuevo uso de tecnologías accesorias tales como la “quimeroplastia” permitiendo la modificación *in vivo* o *in vitro* de secuencias de ADN, tal como sitios FRT para extender adicionalmente la utilidad del sistema. Los datos suministrados demuestran la integración exitosa estable de secuencias de ADN entre dos sitios FRT no idénticos previamente introducidos en maíz. Mostramos también que las secuencias de ADN entre los sitios FRT pueden ser posteriormente reemplazados por una segunda secuencia de ADN flanqueada por los mismos sitios FRT que la primera. Juntos, estos resultados demuestran que es posible introducir y recuperar pares de sitios FRT no idénticos en ciertas ubicaciones genómicas, de tal manera que uno puede seleccionar ubicaciones genómicas deseables o preferidas para la expresión de secuencias de ADN de interés, y que estas ubicaciones seleccionadas pueden ser utilizadas para redireccionar otras secuencias de ADN de interés. Aparte de los beneficios obvios de ser capaz de integrar genes dentro del genoma de plantas, la presente invención provee un medio para facilitar la introducción de nuevos genes o secuencias de ADN en ubicaciones genómicas que previamente se ha determinado que son particularmente benéficas para integración génica desde la perspectiva de la provisión de niveles adecuados de expresión estable de el(los) gen(es) introducido(s) y que no exhiben impactos nocivos sobre las características agronómicas incluida la producción. Además, la invención provee un sistema por medio del cual se puede dirigir la integración de dos o más genes a la misma ubicación genómica, proveyendo un mecanismo para “apilamiento de genes”. Estos genes apilados pueden ser luego mantenidos y manejados como un par estrechamente enlazado de rasgos en programas de reproducción. De este modo, esta invención también provee un método mejorado para introducir, mantener y reproducir múltiples rasgos genéticos de interés, incluidos los rasgos agronómicos, los genes comercialmente importantes u otros productos génicos heterólogos.

La invención propone además la utilización de la característica no recombinante de sitios FRT no idénticos para permitir la creación de un conjunto de líneas “progenitoras”, que están inicialmente bien caracterizadas por todos los parámetros deseados de expresión y de desempeño descritos anteriormente. Estas líneas sirven luego como las bases para la introducción de nuevos rasgos dentro de los mismos sitios predefinidos en el genoma donde fueron introducidos los genes iniciales. Muchos menos eventos necesitarían ser generados, ya que la integración ocurriría preferencialmente en sitios que mostraron que se expresan bien y tienen impacto negativo mínimo sobre el desempeño.

Aunque la invención anterior ha sido descrita con algún detalle a manera de ilustración y ejemplo para propósitos de entender con claridad, será obvio que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

## ES 2 308 327 T3

### Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

### Documentos de patente citados en la descripción

- US 97225897 A [0026]
- WO 9925841 A [0026]
- US 5380831 A [0028] [0029]
- US 5436391 A [0028] [0029]
- EP 0359472 A [0029]
- EP 0385962 A [0029]
- WO 9116432 A [0029]
- US 4945050 A [0052]
- WO 9110725 A [0052] [0052]
- US 04512197 P [0068]
- US 03556097 P [0068]
- US 9707688 W [0068]
- US 60016345 B [0068]
- US 5591616 A [0070] [0070]
- US 972258 A [0073] [0085]
- US 66160196 A [0074]
- US 60065627 B [0090]

### Literatura citada en la descripción que no es de patentes

- SCHLAKE; BODE. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 12746-12751 [0016] [0032]
- HUANG y colaboradores *Nucleic Acids Research*, 1991, vol. 19, 443-448 [0016]
- PAUL D. SADOWSKI. *Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1995, vol. 51, 53-91 [0016]
- MICHAEL M. COX. Mobile DNA. *American Society of Microbiology*, 1989, 116-670 [0016]
- DIXON y colaboradores *THE EMBO JOURNAL*, 1995, vol. 18, 449-458 [0016]
- UMLAUF; COX. *The EMBO Journal*, 1988, vol. 7, 1845-1852 [0016]
- BUCHHOLZ y colaboradores *Nucleic Acids Research*, 1996, vol. 24, 3118-3119 [0016]
- KILBY y colaboradores *Trends Genet.*, 1993, vol. 9, 413-421 [0016]
- ROSSANT; GEAGY. *Nat. Med.*, 1995, vol. 1, 592-594 [0016]
- ALBERT y colaboradores *The Plant J.*, 1995, vol. 7, 649-659 [0016]
- BAYLEY y colaboradores *Plant Mol. Biol.*, 1992, vol. 18, 353-361 [0016] [0016]
- ODELL y colaboradores *Mol. Gen. Genet.*, 1990, vol. 223, 369-378 [0016]
- DALE; OW. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 10558-105620 [0016]
- ALBERT y colaboradores *Plant J.*, 1995, vol. 7, 649-659 [0016]
- QUI y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 1706-1710 [0016]
- STURMAN y colaboradores *Plant Mol. Biol.*, 1996, vol. 32, 901-913 [0016]
- ODELL y colaboradores *Mol. Gen. Gevet.*, 1990, vol. 223, 369-378 [0016]
- DALE y colaboradores *Gene*, 1990, vol. 91, 79-85 [0016]
- LYZNIK. *Nucleic Acid Res.*, 1993, vol. 21, 969-975 [0019]
- COX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, vol. 80, 4223-4227 [0026]

## ES 2 308 327 T3

- **GUO** y colaboradores *Nature*, 1997, vol. 389, 40-46 [0027]
- **ABREMSKI** y colaboradores *J. Biol. Chem.*, 1984, vol. 259, 1509-1514 [0027]
- 5 • **CHEN** y colaboradores *Somat. Cell Mol. Genet.*, 1996, vol. 22, 477-488 [0027]
- **SHAIKH** y colaboradores *J. Biol. Chem.*, 1977, vol. 272, 5695-5702 [0027]
- **MURRAY** y colaboradores *Nucleic Acids Res.*, 1989, vol. 17, 477-498 [0028]
- 10 • **PERLAK**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 3324-3328 [0029]
- **MURRAY** y colaboradores *Nucleic Acids Research*, 1989, vol. 17, 477-498 [0029]
- 15 • **REDOLFI** y colaboradores *Neth. J. Plant Pathol.*, 1983, vol. 89, 245-254 [0040]
- **UKNES** y colaboradores *The Plant Cell*, 1992, vol. 4, 645-656 [0040]
- **VAN LOON**. *Plant Mol. Virol.*, 1985, vol. 4, 111-116 [0040]
- 20 • **DEPICKER** y colaboradores *Mol. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 561-573 [0041]
- **ODELL** y colaboradores *Nature*, 1985, vol. 313, 810-812 [0041]
- 25 • **CHRISTENSEN** y colaboradores *Plant Mol. Biol.*, 1992, vol. 18, 675-689 [0041] [0068]
- **DE ALMEIDA** y colaboradores *Mol. Gen. Genet.*, 1989, vol. 218, 78-98 [0041]
- **MCELROY** y colaboradores *Plant J.*, 1990, vol. 2, 163-171 [0041]
- 30 • **BASZCZYNSKI** y colaboradores *Maydica*, 1997, vol. 42, 189-201 [0041] [0074]
- **GUERINEAU** y colaboradores *Mol. Gen. Genet.*, 1991, vol. 262, 141-144 [0045]
- 35 • **PROUDFOOT**. *Cell*, 1991, vol. 64, 671-674 [0045]
- **SANFACON** y colaboradores *Genes Dev.*, 1991, vol. 5, 141-149 [0045]
- **MOGEN** y colaboradores *Plant Cell*, 1990, vol. 2, 1261-1272 [0045]
- 40 • **MUNROE** y colaboradores *Gene*, 1990, vol. 91, 151-158 [0045]
- **BALLAS** y colaboradores *Nucleic Acids Res.*, 1989, vol. 17, 7891-7903 [0045]
- 45 • **JOSHI** y colaboradores *Nucleic Acid Res.*, 1987, vol. 15, 9627-9639 [0045]
- **ELROY-STEIN, O.; FUERST, T.R.; MOSS, B.** *PNAS USA*, 1989, vol. 86, 6126-6130 [0046]
- **ALLISON** y colaboradores MDMV leader (Maize Dwarf Mosaic Virus. *Virology*, 1986, vol. 154, 9-20 [0046]
- 50 • **MACEJAK, D.G.; P. SARNOW.** *Nature*, 1991, vol. 353, 90-94 [0046]
- **JOBLING, S.A.; GEHRKE, L.** *Nature*, 1987, vol. 325, 622-625 [0046]
- 55 • **GALLIE** y colaboradores *Molecular Biology of RNA*, 1989, 237-256 [0046]
- **GALLIE** y colaboradores *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 15, 3257-3273 [0046] [0069]
- **LOMMEL, S.A.** y colaboradores *Virology*, 1991, vol. 81, 382-385 [0046]
- 60 • **G. T. YARRANTON.** *Curr. Opin. Biotech.*, 1992, vol. 3, 506-511 [0049]
- **CHRISTOPHERSON** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, vol. 89, 6314-6318 [0049]
- 65 • **YAO** y colaboradores *Cell*, 1992, vol. 71, 63-72 [0049]
- **W. S. REZNIKOFF.** *Mol. Microbiol.*, 1992, vol. 6, 2419-2422 [0049]

## ES 2 308 327 T3

- **BARKLEY** y colaboradores *The Operon.*, 1980, 177-220 [0049]
- **HU** y colaboradores *Cell*, 1987, vol. 48, 555-566 [0049]
- 5 • **BROWN** y colaboradores *Cell*, 1987, vol. 49, 603-612 [0049]
- **FIGGE** y colaboradores *Cell*, 1988, vol. 52, 713-722 [0049]
- **DEUSCHLE** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 5400-5404 [0049]
- 10 • **FUERST** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 2549-2553 [0049]
- **DEUSCHLE** y colaboradores *Science*, 1990, vol. 248, 480-483 [0049]
- 15 • **M. GOSSEN**. PhD Thesis, University of Heidelberg, 1993 [0049]
- **REINES** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 1917-1921 [0049]
- **LABOW** y colaboradores *Mol. Cell Bio.*, 1990, vol. 10, 3343-3356 [0049]
- 20 • **ZAMBRETTI** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 3952-3956 [0049]
- **BAIM** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 5072-5076 [0049]
- 25 • **WYBORSKI** y colaboradores *Nuc. Acids Res.*, 1991, vol. 19, 4647-4653 [0049]
- **A. HILLENAND-WISSMAN**. *Topics in Mol. And Struc. Biol.*, 1989, vol. 10, 143-162 [0049]
- **DEGENKOLB** y colaboradores *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991, vol. 35, 1591-1595 [0049]
- 30 • **KLEINSCHNIDT** y colaboradores *Biochemistry*, 1988, vol. 27, 1094-1104 [0049]
- **GATZ** y colaboradores *Plant J.*, 1992, vol. 2, 397-404 [0049]
- 35 • **A. L. BONIN**. PhD Thesis, University of Heidelberg, 1993 [0049]
- **GOSSEN** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 5547-5551 [0049]
- **OLIVA** y colaboradores *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, vol. 36, 913-919 [0049]
- 40 • **HLAVKA** y colaboradores *Handbook of Exp. Pharmacology*. 1985, vol. 78 [0049]
- **GILL** y colaboradores *Nature*, 1988, vol. 334, 721-724 [0049]
- 45 • **CROSSWAY** y colaboradores *Biotechniques*, 1986, vol. 4, 320-334 [0052]
- **RIGGS** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 5602-5606 [0052]
- **HINCHEE** y colaboradores *Biotechnology*, 1988, vol. 6, 915-921 [0052]
- 50 • **PASZKOWSKI** y colaboradores *EMBO J.*, 1984, vol. 3, 2717-2722 [0052]
- **MCCABE** y colaboradores *Biotechnology*, 1988, vol. 6, 923-926 [0052]
- 55 • **WEISSINGER** y colaboradores *Annual Rev. Genet.*, 1988, vol. 22, 421-477 [0052]
- **SANFORD** y colaboradores *Particulate Science and Technology*, 1987, vol. 5, 27-37 [0052]
- **CHRISTOU** y colaboradores *Plant Physiol.*, 1988, vol. 87, 671-674 [0052]
- 60 • **MCCABE** y colaboradores *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 923-926 [0052]
- **DATTA** y colaboradores *Biotechnology*, 1990, vol. 8, 736-740 [0052]
- 65 • **KLEIN** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 4305-4309 [0052]
- **KLEIN** y colaboradores *Biotechnology*, 1988, vol. 6, 559-563 [0052]

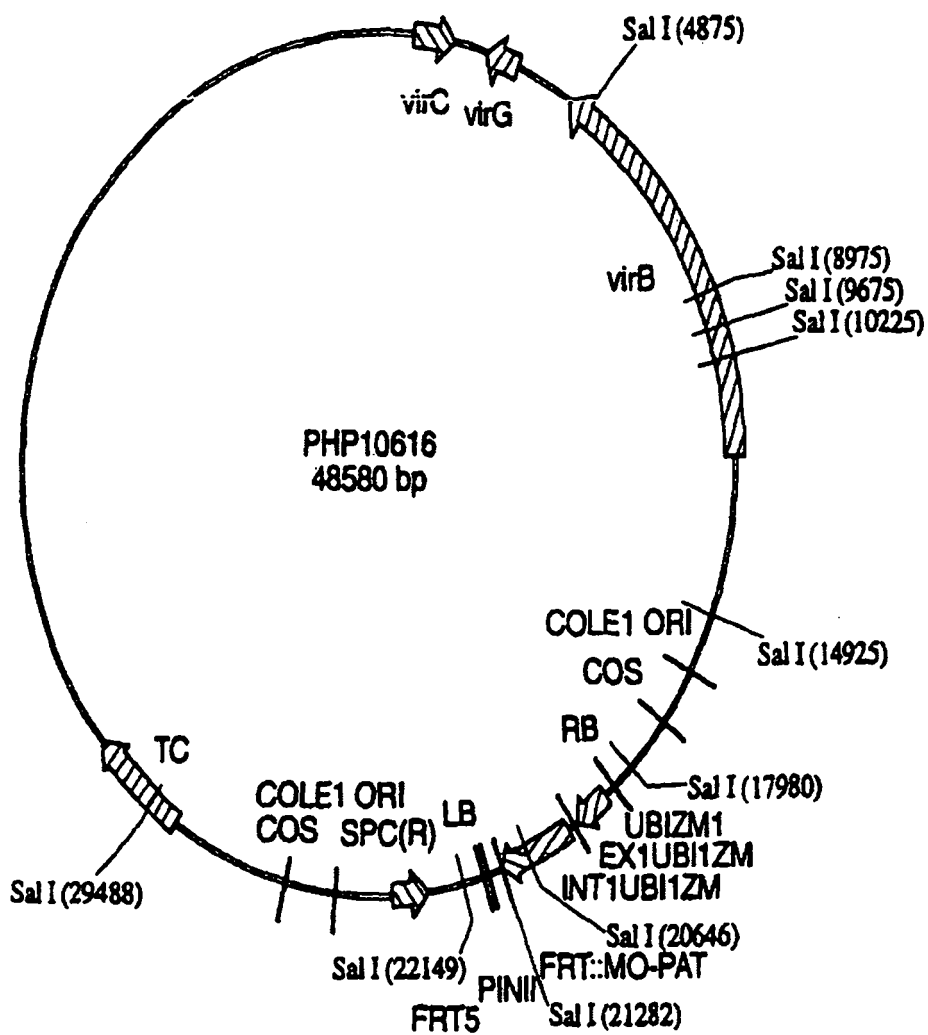
## ES 2 308 327 T3

- **KLEIN** y colaboradores *Plant Physiol.*, 1988, vol. 91, 440-444 [0052]
- **FROMM** y colaboradores *Biotechnology*, 1990, vol. 8, 833-839 [0052]
- 5 • **GORDON-KAMM** y colaboradores *Plant Cell*, 1990, vol. 2, 603-618 [0052]
- **HOODAAS-VAN SLOGTEREN; HOOYKAAS**. *Nature* (London), 1984, vol. 311, 763-764 [0052]
- **BYTEBIER** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 5345-5349 [0052]
- 10 • **DE WET** y colaboradores *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*. Longman, 1985, 197-209 [0052]
- **KAEPPLER** y colaboradores *Plant Cell Reports*, 1990, vol. 9, 415-418 [0052]
- 15 • **KAEPPLER** y colaboradores *Theor. Appl. Genet.*, 1992, vol. 84, 560-566 [0052]
- **D'HALLUIN** y colaboradores *Plant Cell*, 1992, vol. 4, 1495-1505 [0052]
- **LI** y colaboradores *Plant Cell Reports*, 1993, vol. 12, 250-255 [0052]
- 20 • **CHRISTOU; FORD**. *Annals of Botany*, 1995, vol. 75, 407-413 [0052]
- **OSJODA** y colaboradores *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 745-750 [0052]
- 25 • **MCCORMICK** y colaboradores *Plant Cell Reports*, 1986, vol. 5, 81-84 [0053]
- **UMLAUF; COX**. *Embo J*, 1988, vol. 7, 1845-1852 [0056]
- **SCHLAKE; BODE**. *Biochem.*, 1994, vol. 33, 12746-12751 [0056]
- 30 • **REGISTER** y colaboradores *Plant Mol. Biol.*, 1994, vol. 25, 951-961 [0068] [0072]
- **HEATH** y colaboradores *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1997, vol. 10, 22-227 [0068]
- 35 • **HIEI** y colaboradores *Plant J.*, 1994, vol. 6, 271-282 [0068]
- **ISHIDA** y colaboradores *Nat. Biotech.*, 1996, vol. 14, 745-750 [0068]
- 40 • **SAMBROOK** y colaboradores *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0068]
- **VANCANNEYT** y colaboradores *Mol. Gen. Genet.*, 1990, vol. 220, 245-250 [0068]
- **AN** y colaboradores *Plant Cell*, 1989, vol. 1, 115-122 [0068]
- 45 • **GARDNER** y colaboradores *Nucl. Acids Res.*, 1981, vol. 9, 2871-2888 [0069] [0069]
- **DENNIS** y colaboradores *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 3983-3990 [0069]
- 50 • **THOMPSON** y colaboradores *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 2519-2523 [0069]
- **JOHAL; BRIGGS**. *Science*, vol. 258, 985-987 [0069]
- **DITTA** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 7347-7351 [0070]
- 55 • **JEFFERSON** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 8447-8451 [0073]
- **SVAB** y colaboradores *Plant Mol. Biol.*, 1990, vol. 14, 197-205 [0074]
- 60 • **YOON** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, vol. 93, 2071-2076 [0079]
- **COLE-STRAUSS** y colaboradores *Science*, 1996, vol. 273, 1386-1389 [0079]
- **LYZNIK** y colaboradores *Nucleic Acids Res.*, 1993, vol. 21, 969-975 [0085]
- 65 • **SADOWSKI**. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1995, vol. 51, 53-91 [0086]
- **SADOWSKI**. *Progress on Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1995, vol. 51, 53-91 [0086]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta o célula de planta que contiene una construcción de ADN que comprende en la dirección 5' a 3' de transcripción un promotor funcional en una planta, un intrón, una secuencia de nucleótidos de interés, y una región terminadora, dicha construcción de ADN comprendiendo dos sitios no idénticos de recombinación, donde uno de dichos sitios no idénticos de recombinación está contenido dentro de dicho intrón y dichos sitios no idénticos de recombinación se pueden recombinar con sus correspondientes sitios de recombinación.
- 10 2. La planta o célula de planta de la reivindicación 1, en donde dicho intrón es un intrón de ubiquitina, un intrón ADH o un intrón Dna.J.
3. La planta o célula de planta de la reivindicación 1 ó 2, en donde al menos uno de dichos sitios no idénticos de recombinación es un sitio FRT, un sitio FRT mutante, un sitio LOX o un sitio LOX mutante.
- 15 4. La planta o célula de planta de la reivindicación 2, en donde dicho intrón es de maíz.
5. La planta o célula de planta de la reivindicación 3, en donde dicho sitio FRT mutante es FRT 5 como se muestra en la SEQ ID NO: 3, FRT 6 como se muestra en la SEQ ID NO: 4 o FRT 7 como se muestra en la SEQ ID NO: 5.
- 20 6. La planta o célula de planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha planta o célula de planta es una monocotiledónea o dicotiledónea.
7. La planta o célula de planta de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha monocotiledónea es maíz (*Zea mays*).
- 25 8. La planta o célula de planta de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha dicotiledónea es canola, soja, girasol o algodón.
9. Una semilla de la planta de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que contiene la construcción.
- 30 10. Un polinucleótido aislado que contiene los siguientes componentes operativamente enlazados: un intrón y una secuencia de nucleótidos de interés, y más de un sitio de recombinación no idéntico de recombinación, en donde uno de dichos sitios no idénticos de recombinación está contenido dentro de dicho intrón y dicho intrón se selecciona entre un intrón de ubiquitina, un intrón ADH, y un intrón DnaJ.
- 35 11. Un polinucleótido aislado de la reivindicación 10, en donde el intrón comprende al primer intrón de un gen de ubiquitina de maíz, el primer intrón de un gen Adh de maíz, o el primer intrón de un gen DnaJ de maíz.
- 40 12. El polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en donde al menos uno de dichos sitios no idénticos de recombinación es un sitio FRT, un sitio FRT mutante, un sitio LOX o un sitio LOX mutante.
- 45 13. El polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde sitio FRT mutante es FRT 5 como se muestra en la SEQ ID NO: 3, FRT 6 como se muestra en la SEQ ID NO: 4 o FRT 7 como se muestra en la SEQ ID NO: 5.
- 50
- 55
- 60
- 65





UBI::ATG/FRT1/moPAT/pinII + FRT5

**FIG. 2.**

# ES 2 308 327 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Baszczyński, Christopher  
Bowen, Benjamin A.  
5 Peterson, David J.  
Tagliani, Laura A.
- <120> composiciones y Métodos para Modificación Genética de Plantas  
<130> 035718-158667  
10 <140>  
<141>  
<150> 60/065.627  
<151> 1997-11-18  
15 <160> 5  
<170> PatentIn Ver. 2.0  
<210> 1  
20 <211> 34  
<212> ADN  
<213> *Saccharomyces cerevisiae*  
<220>  
25 <223> (14)...(21) región espaciadora  
  
<400> 1  
30           gaagtccta ttctctagaa agtataggaa ctcc  
  
<210> 2  
<211> 69  
35 <212> ADN  
<213> Desconocido  
<220>  
40 <223> (39)...(46) región espaciadora  
<220>  
<223> Descripción de un Organismo Desconocido: Construido por síntesis, apareamiento y ligación de oligonucleó-  
tidos complementarios, o por medio de la creación de iniciadores para la amplificación por PCR  
45 <400> 2  
  
**ccatggetag cgaagttcct attccgaagt tcctattctc tagaaagtat aggaacttca 60**  
50 **gatctcgag** **69**  
  
<210> 3  
55 <211> 69  
<212> ADN  
<213> Desconocido  
60 <220>  
<223> Descripción de un Organismo Desconocido: Construido por síntesis, apareamiento y ligación de oligonucleó-  
tidos complementarios, o por medio de la creación de iniciadores para la amplificación por PCR  
<220>  
65 <223> (39)...(46) región espaciadora

## ES 2 308 327 T3

<400> 3

**ccatggctag cgaagttcct attccgaagt tctatttctt caaaaggtat aggaacttca 60**

5

**gtactcgag**

**69**

<210> 4

10 <211> 72

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

15 <223> Descripción de un Organismo Desconocido: Construido por síntesis, apareamiento y ligación de oligonucleótidos complementarios, o por medio de la creación de iniciadores para la amplificación por PCR

<220>

20 <223> (36) ... (49) región espaciadora

<400> 4

**ccatggctag cgaagttcct attccgaagt tctatttctt caaaaagtat aggaacttca 60**

25

**gacgtcctcg ag**

**72**

<210> 5

30 <211> 72

<212> ADN

<213> Desconocido

35 <220>

<223> Descripción de un Organismo Desconocido: Construido por síntesis, apareamiento y ligación de oligonucleótidos complementarios, o por medio de la creación de iniciadores para la amplificación por PCR

<220>

40 <223> (39)...(46) región espaciadora

<400> 5

**ccatggctag cgaagttcct attccgaagt tctatttctt caataagtat aggaacttca 60**

45

**ctagttctcg ag**

**72**

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N° de publicación : ES 2 308 327 T3

② Número de solicitud: E 05006893

## MODIFICACIÓN DEL FOLLETO DE PATENTE

**Debido a la publicación de corrección de errores de la Oficina Europea de Patentes, folleto B9, boletín de fecha 04.03.2009, se realizan las siguientes correcciones en el fascículo T3:**

**Página 5, a partir de la línea 24 y hasta la 32, queda como sigue:**

Como se discutió anteriormente, poniendo al ADN genómico que contiene un sitio objetivo con sitios no idénticos de recombinación junto con un vector que contiene un casete de transferencia con los correspondientes sitios no idénticos de recombinación, en presencia de la recombinasa, resulta en recombinación. A la secuencia de nucleótidos del casete de transferencia localizado entre los sitios de recombinación flanqueantes se intercambia con la secuencia de nucleótidos del sitio objetivo localizado entre los sitios de recombinación flanqueantes. De esta manera, las secuencias de nucleótidos de interés pueden ser incorporadas con precisión en el genoma del huésped.

Se reconoce que pueden practicarse muchas variaciones de la invención. Por ejemplo, los sitios objetivo pueden construirse de manera que tengan muchos sitios de recombinación no idénticos. Así, pueden apilarse u ordenarse muchos genes o secuencias de nucleótidos en localizaciones precisas en el genoma de la planta. De la misma forma, una vez que un sitio objetivo ha sido establecido dentro del genoma, pueden introducirse sitios de recombinación adicionales incorporando tales sitios dentro de la secuencia de nucleótidos del casete de transferencia de los sitios de la secuencia objetivo. Así, una vez que se ha establecido un sitio objetivo, es posible agregar sitios subsecuentemente, o alterar sitios a través de recombinación.

**Página 7, a partir línea 40 hasta página 8, línea 15 queda como sigue:**

La presente invención puede ser utilizada para la transformación de cualquier especie de planta, incluyendo pero sin limitarse a maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), 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*), árboles de cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma sativa*), té (*Camellia sinensis*), plátano (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha de azúcar (*Beta vulgaris*), avenas, cebadas, vegetales, ornamentales y coníferas.

Las verduras incluyen tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (p.ej. *Lactuca sativa*), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), judías de media luna (*Phaseolus limensis*), guisantes (*Lathyrus* spp.) y miembros del género *Cucumis* tales como pepino (*C. sativus*), melón (*C. cantalupensis*), y melón reticulado (*C. melo*). Las plantas ornamentales incluyen azalea (*Rhododendron* spp.), hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipanes (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petunias (*Petunia hybrida*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), poinsetias (*Euphorbia pulcherrima*), y crisantemo. Las coníferas que pueden ser empleadas en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, pinos tales como el pino tea (*Pinus taeda*), pino laciniado (*Pinus elliotii*), pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino lodgepole (*Pinus contorta*), y pino Monterrey (*Pinus radiata*); abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); abeto Occidental (*Tsuga canadensis*); abeto Sitka (*Picea glauca*); secuoya (*Sequoia sempervirens*); abetos verdaderos tales como el abeto plateado (*Abies amabilis*) y el abeto balsámico (*Abies balsamea*); y cedros tales como el cedro rojo Occidental (*Thuja plicata*) y el cedro amarillo de Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*). Preferiblemente,



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N° de publicación : ES 2 308 327 T3

② Número de solicitud: E 05006893

## MODIFICACIÓN DEL FOLLETO DE PATENTE

las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, alfalfa, girasol, canola, soja, algodón, cacahuete, sorgo, trigo, tabaco, etc.), más preferiblemente plantas de maíz y de soja, aún más preferiblemente plantas de maíz. Se reconoce que los métodos de la invención pueden ser aplicados en cualquier sistema de planta. Los métodos para la transformación de plantas son conocidos en el arte. De esta forma, se pueden obtener las plantas genéticamente modificadas, células de plantas, tejido de plantas, semillas, y similares. Los protocolos de transformación pueden variar dependiendo del tipo de planta o de las células de la planta, esto es, monocotiledóneas o dicotiledóneas, destinadas a la transformación. Los métodos adecuados de transformación de células de plantas incluyen microinyección (Crossway y colaboradores (1986) *Biotechniques* 4: 320-334), electroporación (Riggs y colaboradores (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5602-5606, la transformación mediada por *Agrobacterium* (Hinchee y colaboradores (1988) *Biotechnology*, 6: 915-921), transferencia génica directa (Paszkowski y colaboradores (1984) *EMBO J.*, 3: 2717-2722), y aceleración balística de partículas (ver, por ejemplo, Sanford y colaboradores, patente estadounidense No. 4.945.050; WO91/10725 y McCabe y colaboradores (1988) *Biotechnology*, 6: 923-926). Ver también, Weissinger y colaboradores (1988) *Annual Rev. Genet.*, 22: 421-477; Sanford y colaboradores (1987) *Particulate Science and Technology*, 5: 27-37 (cebolla); Christou y colaboradores (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soja); McCabe y colaboradores (1988) *Bio/Technology*, 6: 923-926 (soja); Datta y colaboradores (1990) *Biotechnology*, 8: 736-740(arroz); Klein y colaboradores (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4305-4309(maíz); Klein y colaboradores (1988) *Biotechnology*, 6: 559-563 (maíz); WO91/10725 (maíz); Klein y colaboradores (1988) *Plant Physiol.*, 91: 440-444(maíz); Fromm y colaboradores (1990) *Biotechnology*, 8: 833-839; y Gordon-Kamm y colaboradores (1990) *Plant Cell*. 2: 603-618 (maíz); Hooydaas-Van Slogteren & Hooykaas (1984) *Nature (Londres)*, 311: 763-764; Bytebier y colaboradores (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5345-5349 (Liliáceas); De Wet y colaboradores (1985) *En The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. G.P. Chapman y colaboradores, páginas 197-209. Longman, NY (polen); Kaeppeler y colaboradores (1990) *Plant Cell Reports*, 9: 415-418; y Kaeppeler y colaboradores (1992) *Theor. Appl. Genet.*, 84:560-566 (transformación mediada por bigotes); D'Halluin y colaboradores (1992) *Plant Cell*, 4: 1495-1505 (electroporación); Li y colaboradores (1993) *Plant Cell Reports*, 12:250-255 y Christou y Ford (1995) *Annals of Botany*, 75:407-413 (arroz); Osjoda y colaboradores (1996) *Nature Biotechnology*, 14: 745-750 (maíz a través de *Agrobacterium tumefaciens*).