



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 611**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
C12N 9/06 (2006.01)
C07F 9/38 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12P 17/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03704795 .8**
96 Fecha de presentación : **14.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1481068**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

54 Título: **Método para producir selectivamente plantas estériles masculinas o femeninas.**

30 Prioridad: **26.02.2002 GB 0204484**
08.10.2002 GB 0223359

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.06.2011

73 Titular/es: **SYNGENTA LIMITED**
European Regional Centre Priestley Road
Surrey Research Park Guildford
Surrey GU2 7YH, GB

72 Inventor/es: **Hawkes, Timothy R.;**
Mitchell, Glynn;
Hadfield, Stephen, Thomas;
Thompson, Paul, Anthony;
Viner, Russell y
Zhang, Yan

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 360 611 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

Método para producir selectivamente plantas estériles masculinas o femeninas.

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 La heterosis en plantas cultivadas tiene un efecto notable en la mejora del rendimiento. En general, los híbridos presentan rendimientos incrementados en comparación con las variedades no híbridas. Los híbridos proporcionan normalmente una unidad de retorno mayor para factores de crecimiento como agua y fertilizante. Los híbridos proporcionan a menudo una tolerancia al estrés superior, uniformidad en el producto y la maduración y proporcionan así mismo una oportunidad sencilla de mejora genética para combinar características o rasgos que puede ser difícil combinar de otras formas. El vigor del híbrido en plantas es de suficiente magnitud, generalmente, para garantizar la explotación comercial. Los híbridos comerciales se usan extensamente en muchos cultivos, incluyendo maíz, sorgo, remolacha azucarera, girasol y colza. Sin embargo, debido principalmente a la falta de métodos económicos de producción de semillas híbridas, el trigo, la cebada y el arroz se cultivan aún principalmente como consanguíneos.

20 Tradicionalmente, la producción de semillas híbridas implica plantar bloques separados de líneas parentales femeninas y masculinas, cosechándose sólo las semillas de los genitores femeninos. Para asegurar que dicha semilla es híbrida, se tiene que minimizar la autopolinización de la línea parental femenina, haciendo la línea masculino-estéril. Los métodos para hacer la línea parental femenina masculino-estéril incluyen métodos mecánicos, químicos y genéticos. En plantas monoicas como el maíz, la esterilidad masculina se puede conseguir fácilmente mecánicamente mediante despendonación de la inflorescencia masculina. Sin embargo, la mayoría de los cultivos son dioicos y la presencia de órganos masculinos y femeninos en la misma flor hace tal castración inviable. Por tanto, se han usado algunas veces los enfoques genéticos.

25 Los rasgos de esterilidad genética masculina que aparecen son controlados normalmente por genes nucleares en los que los alelos asociados con el fenotipo estéril se expresan en general de forma recesiva con respecto a los alelos asociados con la fertilidad. Cuando se produce la esterilidad masculina genética está asociada normalmente con un gen recesivo único que tiene que ser homocigoto para que se exprese la esterilidad masculina. A fin de usar de forma práctica tales rasgos de esterilidad masculina genética, los obtentores desarrollan normalmente una línea femenina fenotípicamente uniforme que se segrega en plantas masculino-estériles y plantas femenino-fértiles. Las plantas masculino-estériles, una vez identificadas, se tienen que destruir, lo cual es trabajoso. Existe siempre un problema con el mantenimiento de la línea parental, ya que las plantas masculinas fértiles no se pueden eliminar de la población porque son esenciales para el mantenimiento de la población. Mejor que basarse en la existencia de alelos de esterilidad masculina naturales, es posible también usar los métodos de biología molecular. Se pueden obtener mediante ingeniería genética plantas que expresen, por ejemplo, genes de ribozima o antisentido que reduzcan o eliminen la expresión de genes clave necesarios para la formación de polen viable. Tales líneas transgénicas de plantas son masculino-estériles y se usan para la producción de semillas híbridas mediante cruzamiento, usando polen de plantas masculino-fértiles. El principal problema con tales líneas es que sólo se pueden mantener en un estado hererozigótico en generaciones posteriores mediante cruces con las líneas fértiles isogénicas. Esto puede ser un problema en la producción de semillas híbridas, en la que el rendimiento es crítico. Aunque, por ejemplo ligando la resistencia a herbicida con la esterilidad masculina, se puede destruir selectivamente las plantas masculino-fértiles, esto precisa aún que las plantas se planten inicialmente a densidades extraelevadas.

45 El uso de esterilidad masculina citoplásmica para la producción de híbridos comerciales requiere un citoplasma masculino-estéril estable y una fuente de polen. El sistema citoplásmico-genético de la esterilidad masculina requiere la existencia de tres tipos de línea para la producción de híbrido: la línea A (masculino-estéril citoplásmica), la línea B (masculino-fértil de mantenimiento) y la línea R (masculino-fértil con genes restauradores). Los cruzamientos en los tres sentidos producidos con este sistema implican el mantenimiento y producción de cuatro líneas, y una línea A y B de un consanguíneo y consanguíneos masculino-fértiles de los otros dos. La confianza en una única fuente de citoplasma masculino-estéril puede minimizar la flexibilidad de la mejora genética y conducir a una descendencia con una gran susceptibilidad global a enfermedades particulares.

55 Las semillas híbridas se pueden producir también mediante el uso de productos químicos que inhiban la formación de polen viable. Estas sustancias químicas, denominadas gametocidas, se usan para producir esterilidad masculina transitoria. Sin embargo, el coste, registrabilidad y fiabilidad de los gametocidas ha limitado su uso.

60 Una deficiencia de los sistemas tradicionales de producción de semillas híbridas es la necesidad de plantar filas o bloques separados de las líneas parentales masculina y femenina. En este aspecto, la baja eficiencia de polinización es un problema especialmente grave en especies cultivadas, como el trigo, que liberan pequeñas cantidades de polen que no viaja lejos con el viento. En tales cultivos hasta dos tercios del terreno de producción del híbrido tienen que dedicarse a plantas donantes de polen masculino y consecuentemente, la producción de semillas híbridas se vuelve, por tanto, no rentable.

A fin de conseguir una producción de semillas más rentable en trigo y otros cultivos es necesario desplazar las plantas masculinas y femeninas más próximamente entre sí para una transferencia del polen más eficiente; con la máxima eficiencia mediante plantación intercalada de machos y hembras en las mismas filas a una distancia de centímetros entre ellas. En tal sistema sería inviable cosechar sólo la semilla de los genitores femeninos (masculino-estériles). La contaminación con semilla no híbrida procedente del genitor femenino se puede minimizar usando un porcentaje lo más bajo posible de tales plantas genitoras masculinas en la mezcla para plantar y/o usando plantas masculinas que sean femenino-estériles. Se ha descrito un método para obtener una línea femenino-estéril dominante (EP-412.006-A1 (1991); Goldman et al., (1994) EMBO, J., 13, 2976-2984) pero, como para las líneas masculino-estériles, la línea tiene que mantenerse como heterocigoto.

Consecuentemente, persiste la necesidad de métodos económicos simples de producción de semillas híbridas. En particular, a fin de producir semilla híbrida eficientemente, persiste la necesidad de proporcionar tanto líneas parentales femeninas masculino-estériles, como líneas parentales masculinas femenino-estériles que se puedan mantener fácilmente como líneas homocigóticas puras y que sean útiles para la producción eficiente de semillas híbridas. Los métodos descritos en el estado de la técnica para lograrlo incluyen métodos en los que la semilla híbrida se produce de líneas parentales masculina y femenina, al menos una de las cuales comprende un gen quimérico heterólogo, preferiblemente expresado en el tejido floral, que vuelve a la línea condicionalmente estéril, dependiendo de la aplicación exógena de una sustancia no fitotóxica, que se puede convertir específica y localmente en una fitotoxina, mediante una enzima codificada por el gen quimérico heterólogo y que se expresa preferiblemente, bien en las estructuras reproductivas masculinas o femeninas. La sustancia no fitotóxica puede ser un precursor de herbicida. La ventaja de tener tales líneas parentales condicionalmente estériles es que les permite mantenerse como homocigotas con respecto al rasgo de la esterilidad. La fertilidad se altera sólo tras la aplicación exógena de la sustancia no fitotóxica. En uno de tales ejemplos de un sistema de esterilidad masculina condicional, un gen que codifica la enzima desacetilasa se expresa preferentemente en las células del tapete del tejido floral masculino, donde convierte el precursor de herbicida precursor de herbicida N-acetil-L-fosfinotricina aplicado exógenamente, en la fitotoxina L-fosfinotricina y, por tanto, evita la formación de polen viable. En otros ejemplos similares: (i) la expresión preferencial del tapete del citocromo P450 bacteriano cataliza la conversión del precursor de herbicida R7402 en una fitotoxina sulfonil-urea que evita la producción de polen viable; y (iii) la expresión preferente en el tapete de una hidrolasa de monoéster de fosfonato cataliza la conversión del precursor del herbicida gliceril-glifosato en la fitotoxina glifosato, que evita así mismo la producción de polen viable. WO 98/03838 describe ejemplos de un sistema de esterilidad femenino condicional, en el que las enzimas capaces de convertir los precursores de herbicidas en fitotoxinas se expresan preferiblemente en estructuras reproductivas femeninas.

A pesar de la existencia de estos métodos de obtención de líneas parentales masculinas y femeninas que son condicionalmente estériles, la producción de semillas híbridas dista aún de ser una rutina en cultivos como el trigo. La presente solicitud se refiere, entre otros, a mejoras en la técnica con respecto a la producción de líneas parentales femeninas que son condicionalmente masculino-estériles y líneas parentales femeninas que son condicionalmente femenino-estériles.

La presente solicitud se refiere a mejoras en métodos para la producción de semilla híbrida para el cultivo. En particular, la solicitud se refiere a un método de producción de semilla híbrida de líneas parentales femenina y masculina, al menos una de las cuales es condicionalmente femenino o masculino-estéril, dependiendo de la aplicación exógena de una sustancia que no es fitotóxica para el cultivo y que incluye precursores de herbicidas. La solicitud se refiere así mismo a un método en el que dicha sustancia no fitotóxica se aplica de una vez y en una cantidad suficiente para que la autofertilización se minimice o evite en la línea o líneas parentales condicionalmente estériles. La presente solicitud se refiere también a un método de producción de plantas condicionalmente masculino- o femenino-estériles, mediante (i) transformación del material vegetal con uno o más genes quiméricos que, de forma aislada o conjunta, codifican una o más enzimas capaces de reaccionar con una sustancia no fitotóxica, preferiblemente en forma de precursor de herbicida, para producir una sustancia fitotóxica. Las enzimas se expresan bajo el control modulable de uno o más promotores que, en el caso de plantas condicionalmente masculino-estériles, hace que la enzima o enzimas se expresen preferentemente en las estructuras reproductivas masculinas o las cuales, en el caso de plantas condicionalmente femenino-estériles, hace que dicha enzima o enzimas se expresen preferentemente en las estructuras reproductivas femeninas. El material vegetal se regenera en plantas fértiles morfológicamente normales, que son condicionalmente masculino- o femenino-estériles. La solicitud incluye también el uso de plantas condicionalmente masculino-estériles en combinación con plantas condicionalmente femenino-estériles para producir semilla híbrida más eficientemente, el uso, como sustancias no fitotóxicas, de ciertos precursores de herbicidas y el uso de genes quiméricos para producir más eficientemente semillas híbridas, genes quiméricos y enzimas útiles para la invención. La solicitud proporciona también plantas condicionalmente masculino-estériles, plantas condicionalmente femenino-estériles, semillas de estas plantas y semillas híbridas producidas mediante dicho método. En realizaciones preferidas de la solicitud, las plantas cultivadas a las que se aplica el método de obtención de semilla híbrida son maíz, arroz, sorgo, trigo, mijo, avena, colza y cebada.

Según la presente invención, se proporciona un método para producir plantas estériles masculinas o femeninas, que comprende las etapas de transformar el material vegetal con un polinucleótido que codifica al menos una enzima que

5 reacciona con una sustancia no fitotóxica para producir una fitotóxica, y regenerar el material así transformado en una planta, en el que dicha sustancia no fitotóxica se aplica a la planta hasta el momento de la formación y/o maduración del gameto femenino o masculino, de forma que la sustancia no fitotóxica permite la producción de una fitotóxica que evita selectivamente la formación de los gametos, o, si no, transforma vuelve gametos no funcionales, en el que la enzima se expresa preferentemente bien en estructuras reproductivas masculinas o femeninas. El método se caracteriza por que (i) la sustancia no fitotóxica es un D-alfa-aminoácido y (ii) la enzima es una D-aminoácido-oxidasa.

10 Debido a que un objetivo deseable es maximizar el rendimiento de semilla híbrida y, por tanto, minimizar cualquier daño del cultivo, en realizaciones preferidas, la sustancia no fitotóxica es un precursor de herbicida seleccionado entre compuestos que sean relativamente no fitotóxicos para el cultivo. A fin de que sean capaces de producir un efecto contra los tejidos florales, también es deseable que los precursores de herbicidas sean precursores de fitotoxinas que sean efectivas sobre tejidos "no verdes". Por tanto, en realizaciones preferidas de la invención, se seleccionan precursores de herbicidas de aquellos que son precursores de fitotoxinas que sean directamente fitotóxicas para tejidos no verdes, mejor que aquellos que tienen un sitio de acción principal en la fotosíntesis o en la producción de pigmentos fotosintéticos. También es un objetivo deseable minimizar los costes de la producción de semillas híbridas. Por tanto, en realizaciones preferidas se seleccionan precursores de herbicidas de aquellas sustancias químicas para las cuales ya se ha concedido o se está tramitando la concesión de la aprobación para el uso en cultivos por las autoridades reguladoras apropiadas.

20 Nomenclatura: Definiciones

25 "Gen" según se usa aquí se refiere a cualquier secuencia de ADN que comprende varios fragmentos de ADN unidos operativamente, como un promotor y una región reguladora en 5'; una secuencia codificante; y un región no traducida en 3' que comprende un sitio de poliadenilación.

"Quimérico", cuando se refiere a un gen o una secuencia de ADN se usa para referirse al hecho de que, en la naturaleza, la secuencia codificante no está asociada con el promotor o con al menos otra región reguladora del ADN en el gen.

30 "Gen quimérico", según se usa aquí, se refiere a un gen en el que, en la naturaleza, la secuencia codificante codificante no está asociada con el promotor o con al menos otra región reguladora del ADN en el gen.

35 "Casete de expresión", según se usa aquí, se refiere a una región transferible del ADN que comprende un gen quimérico que está flanqueado por uno o más sitios de restricción u otros sitios que facilitan la escisión precisa desde un locus de ADN y su inserción en otro.

40 "Sustancias no fitotóxicas" son, en el contexto de la presente invención, sustancias que son relativamente no fitotóxicas para las plantas, células o tejidos de cualquier cultivo particular al que se aplica el método de la invención. Las sustancias no fitotóxicas tienen que ser no fitotóxicas en todos los tejidos vegetales de todas las plantas. Las sustancias no fitotóxicas incluyen precursores de herbicidas que son sustancias con un efecto tóxico directo inapreciable sobre los tejidos vegetales, pero que son precursoras de fitotoxinas activas. En especies de plantas susceptibles, tales precursores de herbicidas actúan indirectamente como herbicidas a través de la acción de enzimas endógenas que los convierten en una fitotoxina en el seno de la planta.

45 "Fitotoxinas" son, en el contexto de la presente invención, sustancias que son tóxicas para las plantas, tejidos vegetales y células vegetales del cultivo particular el que se aplica el método de la invención. Tales fitotoxinas no tienen que ser fitotóxicas para todos los tejidos de todas las especies vegetales.

50 "Estructura reproductiva femenina" significa los gametos femeninos y aquellas porciones de la planta que están especializadas en la producción, maduración y viabilidad de los gametos femeninos. Normalmente, estas comprenden aquellas porciones de una planta que comprenden el carpelo o gineceo ("pistilo"). El carpelo de una planta incluye, pero no está limitado a, un estigma, estilo, ovario y células o tejidos comprendidos en el estigma, estilo y ovario.

55 "Estructura reproductiva masculina" significa los gametos masculinos y aquellas porciones de la planta que están especializadas en la producción, maduración y viabilidad de los gametos masculinos. Éstas comprenden aquellas porciones de una planta que comprenden, por ejemplo, microsporas, estambres, tapete, anteras y polen.

60 "Planta femenino-estéril", según se usa aquí, es una planta que es incapaz de soportar la formación de semilla viable cuando se poliniza con polen funcional o viable. Tal esterilidad femenina puede ser el resultado de la selección genética o de la presencia de un transgén. Una "planta condicionalmente femenino-estéril" se refiere a una planta que, bajo condiciones normales de crecimiento es femenino-fértil y que puede volverse femenino-estéril bajo condiciones específicas. En el contexto de la presente invención, dichas condiciones comprenden la aplicación exógena de un precursor de herbicida o de otra sustancia no-fitotóxica. En el contexto de la presente invención, dicha "planta femenino-estéril" o "planta condicionalmente femenino-estéril" permanece masculino-fértil y capaz de producir polen viable.

5 “Planta masculino-estéril”, según se usa aquí, es una planta que es incapaz de soportar la formación de polen viable. Tal esterilidad masculina puede ser el resultado de la selección genética o de la presencia de un transgén. Una “planta condicionalmente masculino-estéril” se refiere a una planta que, bajo condiciones normales de crecimiento es masculino-fértil y que puede volverse masculino-estéril bajo condiciones específicas. Por ejemplo, las condiciones pueden comprender la despendonación física o la aplicación de un gametocida químico específico. En el contexto de la presente invención, dichas condiciones comprenden particularmente la aplicación exógena de un precursor de herbicida u otra sustancia no fitotóxica. En el contexto de la presente invención, tal “planta masculino-estéril” o “planta condicionalmente masculino-estéril” permanece femenino-fértil y capaz de producir semillas viables cuando se poliniza con polen funcional o viable.

15 “Región promotora”, según se usa aquí, es una región de ADN que comprende al menos un promotor funcional y, opcionalmente, algunas o todas de sus secuencias reguladoras aguas arriba, incluyendo secuencias activadoras y/o secuencias asociadas aguas abajo, que incluyen algunas o todas las regiones no traducidas en 5' del gen endógeno al promotor.

20 “Plantación intercalada”, según se usa aquí, se refiere a un método de plantación de semillas o plantas en un terreno que asegura la polinización cruzada adecuada de plantas masculino-estériles o condicionalmente masculino-estériles por las plantas masculino-fértiles. Esto se puede conseguir, bien mezclando al azar de semillas genitoras femeninas y masculinas en mezclas diferentes (80/20; 90; 10; etc.) antes de la plantación, o plantando en patrones de terreno específicos, con lo que se alternan las diferentes semillas. Cuando se requiere el cosechado separado de plantas diferentes, se prefiere la plantación en bloques o filas alternantes.

25 En el método según la invención, dicha sustancia no fitotóxica se puede aplicar mezclada junto con al menos una sustancia adicional, que se puede seleccionar del grupo formado por aminoácidos, protectores, gemetocidas, inductores de glutatión-S-transferasa, inductores de citocromo P450, fertilizantes, herbicidas, nematocidas, sinergistas, insecticidas, fungicidas, hormonas, reguladores del crecimiento vegetal e inhibidores del citocromo P450. En realizaciones particulares, dichas sustancia no fitotóxica se puede aplicar mezclada con butóxido de piperonilo o malatión. En realizaciones particulares, dicha sustancia no fitotóxica se puede aplicar mezclada con la misma sustancia fitotóxica de la que dicha sustancia no fitotóxica es precursora.

35 Dicha enzima puede ser una D-aminoácido oxidasa y la sustancia no fitotóxica puede ser entonces un D-aminoácido y, en particular, puede ser el enantiómero D de fosfinotricina, el enantiómero D de bialafos o seleccionarse del grupo formado por D-alanina, D-serina, D-isoleucina, D-metionina, D-leucina o D-valina. Según se usa aquí “D-aminoácido-oxidasa” significa cualquier enzima capaz de oxidar un D-aminoácido para producir un 2-ceto-ácido, e incluye enzimas con especificidad para el aspartato, conocidas como “D-aspartato-oxidasas”.

40 Los genes quiméricos que codifican enzimas capaces, solas o en combinación con otras, de reaccionar con una sustancia no fitotóxica para producir una fitotóxica se pueden seleccionar de genes que comprenden secuencias codificadoras de ADN que codifican una o más de las siguientes enzimas:

D-aminoácido-oxidasas capaces de catalizar la oxidación:

45 $D\text{-aminoácido} + O_2 + H_2O \rightarrow NH_3 + H_2O_2 + 2\text{-oxoácido}$

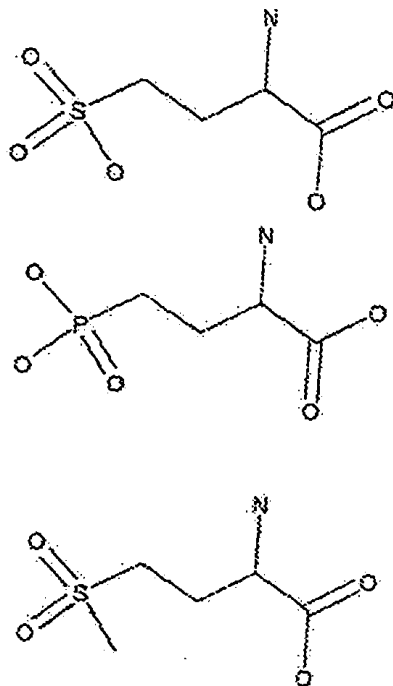
y, en ciertas realizaciones, particularmente la reacción:

$D\text{-fosfinotricina} + O_2 + H_2O \rightarrow NH_3 + H_2O_2 + 2\text{-oxo-4-metil-fosfinobutirato}$.

50 La enzima D-aminoácido-oxidasa (DAMOX) se puede seleccionar entre aquellas producidas por *Rhodosporidium* sp. (*Rhodotorula* sp.), *Trigonopsis* sp., *Fusarium* sp., *Candida* sp., *Shizosaccharomyces* sp. y *Verticillium* sp., y se puede seleccionar de proteínas que tienen secuencias correspondientes a los números de acceso de Swissprot P80324, Q99042, P00371, P24552 o números de SPTREMBL Q9HGY3 y Q9Y7N4. Las secuencias de ADN que codifican la D-aminoácido-oxidasa se pueden seleccionar de secuencias comprendidas en los números de acceso de EMBL A56901, RGU60066, Z50019, SSSA04, D00809, AB042032, RCDAAOX, A81420 y SPCC1450. Las D-aminoácido-oxidasas son flavoenzimas ubicuas.

60 Cuando la sustancia no fitotóxica es D-fosfinotricina o D-bialafos o D-aspartato o D-gitamato, entonces las D-aminoácido-oxidasas particularmente preferidas se obtienen de mutantes de *Rhodotorula gracilis* o es una D-aspartato-oxidasa. Tales mutantes, cualquiera que sea la sustancia fitotóxica, pueden comprender sustituciones de aminoácidos sencillas o dobles en las posiciones 213 y 238, cuando se comparan con la secuencia silvestre. Preferiblemente, en posición 213 la metionina silvestre se reemplaza por Arg, Lys, Ser, Cys, Asn o Ala, y la Tyr del tipo silvestre en posición 238 se reemplaza por His, Ser, Gys, Asn o Ala.

- 5 Sin embargo, la enzima puede comprender sustituciones además de, o en otras posiciones que las mencionadas en el párrafo anterior. En particular, la Phe en posición 58 en la secuencia silvestre se puede reemplazar por un residuo seleccionado del grupo que consiste en His, Ser, Lys, Ala, Arg y Asp, y, preferiblemente, es His, Ser o Ala. Además, o alternativamente, la Met en posición 213 en la secuencia silvestre se puede reemplazar por un residuo seleccionado del grupo que consiste en His, Ser, Lys, Ala, Arg y Asp y, preferiblemente, es Ser o Ala. Además, o alternativamente, la Tyr en posición 238 en la secuencia silvestre se puede reemplazar por un residuo seleccionado del grupo que consiste en His, Ser, Lys, Ala, Arg y Asp.
- 10 Una forma mutante particularmente preferida de la enzima comprende al menos dos de las mutaciones mencionadas anteriormente. Una primera realización de tal mutante doble tiene una His en posición 58 (mejor que Phe en la secuencia silvestre) y una Ser en posición 213 (mejor que Met). Una segunda realización de tal mutante doble tiene Ser en posición 58 (mejor que la Phe del tipo silvestre) y Arg en posición 213 (mejor que la Met del tipo silvestre).
- 15 Cuando la sustancia no fitotóxica es un D-aminoácido distinto de D-fosfinotricina o D-bialafos, entonces la enzima es una D-aminoácido-oxidasa. El D-aminoácido es, preferiblemente, no un metabolito endógeno de la planta, y se selecciona y se selecciona para que sea uno móvil en el floema, metabólicamente estable en la planta (preferiblemente que tenga un $t_{1/2}$ en la planta superior a ~ 1 semana) y un sustrato eficiente de dicha oxidasa. La oxidación del D-aminoácido por la enzima es concomitante con la reducción del oxígeno a peróxido y/o aniones superóxido fitotóxicos.
- 20 En una realización preferida, la enzima oxidasa se dirige hacia una localización subcelular distinta del peroxisoma. Esto se consigue, por ejemplo, modificando en gen, de forma que se deleccionan o modifican tres aminoácidos C-terminales (p.ej., SKL en el caso de la D-aminoácido-oxidasa de *Rhodotorula gracilis*) y/o mediante adición de una secuencia para añadir un péptido de tránsito cloroplástico o mitocondrial al extremo N-terminal.
- 25 Otras D-aminoácido-oxidosas adecuadas se pueden obtener preferiblemente mediante fuentes de hongos, mediante procedimientos de mutación y selectivos conocidos por el experto en la materia y aumentarse mediante la presente descripción.
- 30 Otras enzimas D-aminoácido-oxidosas (o igualmente, fosfinotricina-racemasa) y secuencias codificadoras de ADN adecuadas para poner en práctica la invención se seleccionan entre aquellos organismos, opcionalmente sometidos a mutagénesis, en los que se encuentra que el crecimiento en un medio con N limitado, bajo condiciones en las que se induce la D-aminoácido-oxidasa (o fosfinotricina-racemasa) (por ejemplo crecimiento sobre D-alanina), dicha enzima se inhibe selectivamente en presencia de D-fosfinotricina. Los genes de D-aminoácido-oxidasa adecuados para la invención se obtienen entonces, por ejemplo, ensayando genotecas para tales organismos con sondas de ADN degeneradas adecuadas (por ejemplo basadas en el establecimiento de secuencias consenso de D-aminoácido-oxidasa, como PROSITE, PS00677) y subclonando. Alternativamente, se obtienen genes que codifican enzimas adecuadas escrutando librerías de expresión génica en una célula hospedadora adecuada como *E. coli* o una levadura (las cepas hospedadoras adecuadas carecen de una actividad de oxidasa endógena o deshidrogenasa frente a D-fosfinotricina) para transformación en un fenotipo con sensibilidad incrementada a la inhibición del crecimiento mediante D-fosfinotricina en un medio mínimo. Este método se basa en la capacidad de los clones de *E. coli* transformados para producir L-PPT a partir de D-PPT a través de la acción combinada de su actividad L-transaminasa endógena y la oxidasa heteróloga. Alternativamente, se seleccionan genes adecuados y mejorados basándose en el ensayo *in vitro* de la enzima expresada para la capacidad deseada de oxidar D-fosfinotricina. Hay muchos métodos para ensayar directamente las actividades de las D-aminoácido-oxidosas, como los basados en la detección de peróxido (Enzyme Microb. Technol., (2000), 27(8), 605-611), empobrecimiento de oxígeno usando un electrodo de oxígeno o basado en la detección directa de amoníaco.
- 35 40 45
- 50 En una realización de la invención, un gen DAMOX, preferiblemente derivado de hongos, se clona en un vector transportador bajo el control modulable de un promotor (p.ej., un promotor GAL) capaz de expresarse en el organismo hospedador en el que se realizará la selección (preferiblemente levadura). Este gen se somete luego a mutagénesis, por ejemplo mediante PCR envenenada con Mn_{2+} ; replicación de ADN plasmídico en una cepa que es defectiva en procesos de reparación/edición del ADN como la cepa de *E. coli* XL1 red; o mediante replicación del DNA plasmídico en una cepa hospedadora que se somete a mutagénesis usando, por ejemplo, rayos X, luz ultravioleta, adición de mutágeno químico y transformación en un organismo hospedador (preferiblemente levadura). Se selecciona el ADN deseado que codifica una DAMOX con la propiedad deseada de una capacidad incrementada para oxidar D-PPT (a continuación de una etapa de selección inicial opcional para transformantes basada en marcadores seleccionables presentes en el vector transportador permitiendo, por ejemplo, la selección vía restauración de prototrofia o crecimiento en presencia de higromicina, etc.), vía, por ejemplo:
- 55 60 a) Selección de células transformadas con capacidad de utilizar aminoácidos que son químicamente similares a D-fosfinotricina, como única fuente de nitrógeno. Por ejemplo, se seleccionan las colonias de levadura transformadas que son capaces de crecer sobre análogos de D-PPT (y sus ésteres), en los que el resto de ácido fosfónico se reemplaza con un resto carboxilato (es decir, D-glutamato), sulfonato, fosfonato, sulfona o sulfóxido (o ésteres del mismo), como única fuente de N. P. ej.:



- 5 b) Selección de células transformadas capaces de utilizar el propio D-PPT como única fuente de N. Para que esta selección funcione, la célula hospedadora tiene que transformarse así mismo con un gen capaz de invertir el efecto inhibitor de la L-fosfinotricina sobre la glutamina-sintetasa. Por ejemplo, el vector transportador puede comprender también un gen que codifica una enzima como PAT, que inactiva L-PPT.
- 10 Los ciclos de mutación y selección se pueden repetir. Las D-aminoácido-oxidasas se pueden clonar, expresar, purificar parcialmente y caracterizarse cinéticamente a fin de identificar genes y DAMOX con las propiedades más adecuadas (p.ej., estabilidad enzimática, elevado valor k_{cat}/k_m para oxidación de D-PPT, oxidación mínima de cualquier sustrato vegetal endógeno, pH óptimo, etc.).
- 15 Cuando la sustancia no fitotóxica es D-fosfinotricina (PPT), se puede obtener de una mezcla de D- y L-PPT. Por ejemplo, se puede añadir DL-PPT a un medio de cultivo (preferiblemente mínimo) de células de *E. coli* (opcionalmente, un mutante *arg E* para minimizar el nivel de fondo de actividad N-acetil-PPT-desacetilasa) transformado e inducido a expresar un gen PAT (que codifica una enzima que transfiere un grupo acetilo de acetil CoA a L-PPT), a niveles elevados. Tras dejar un tiempo adecuado para que se N-acetile sustancialmente todo el componente L- (valorado, por ejemplo, mediante monitorización de la conversión usando ^{31}P NMR), se recupera D-PPT y se purifica a partir del medio exento de células, usando sucesivas etapas, por ejemplo, de extracción con disolvente a pH elevado y bajo, cromatografía de intercambio de aniones y cationes, cristalización selectiva con cationes quirales como quincocina u otros procedimientos conocidos en la técnica, como extracciones líquido/líquido con dos fases acuosas no miscibles, como el sistema de fases (p.ej. métodos en la patente US 5.153.355). Típicamente, una última etapa es la cromatografía de intercambio catiónico, de la cual se recupera D-PPT en forma de sal de amonio.
- 20
- 25 Alternativamente, se puede obtener D-PPT mediante un método enzimático en el que se convierte DL PPT + 2-cetoglutarato primeramente en una mezcla de D PP5, 2-oxo PPT (y sus productos de descarboxilación) y GABA, mediante las acciones combinadas de (I) L-aminotransferasa (p.ej. de *E. coli*) y (II) glutamato-descarboxilasa. El D-PPT puro deseado se obtiene de la mezcla de reacción usando métodos conocidos en el estado de la técnica, según se esbozó anteriormente.
- 30 El D-PPT se puede obtener también usando un método enzimático en el que DL- PPT + 2-cetoglutarato + NAD se convierte primeramente en una mezcla de D-PPT, 2-oxo PPT (y sus productos de descarboxilación, NADH y amoníaco, mediante las acciones combinadas de (I) L-aminotransferasa y (II) glutamato-deshidrogenasa. El D-PPT deseado se purifica de la mezcla de reacción.
- 35

En un método adicional de obtención de D-PPT, se trata DL-PPT con una L-aminoácido-oxidasa, de forma que el aminoácido restante está en la forma D- deseada. Este D-PPT se recupera luego de la mezcla de reacción.

Otro método adicional implica (I) conversión de DL-PPT en N-acetil-DL-PPT /usando anhídrido acético u otros reactivos y métodos acetilantes conocidos en la técnica) y (II) tratamiento de N-acetil DL PPT con D-amino-acilasa, de forma que sólo se desacetila el N-acetil D-PPT. El D-PPT resultante se purifica de la mezcla de reacción. Por ejemplo, el D-PPT se recupera de N-acetil-L-PPT, mediante unión a una resina de intercambio aniónico Dowex y elución con ácido fórmico 40 mM. Bajo condiciones de carga adecuadas, este ácido eluye el D-PPT, dejando el N-acetil-L-PPT unido a la columna.

Otro método adicional implica el tratamiento de DL-PPT con L-aminoacilasa y un acilante en un disolvente no acuoso, de forma que sólo el D-PPT deseado queda en forma no acetilada.

Otro método adicional para preparar D-PPT puro implica la cristalización enantioselectiva de DL PPT usando una base quiral, como quincocina y adición de un cristal simiente de la base quiral con D-PPT puro.

Otro método adicional para preparar D-PPT puro a partir de DL-PPT es mediante cromatografía quiral directa, usando una columna base quiral.

En uno de los ejemplos más adelante, se proporciona un método detallado para la producción de D-PPT puro.

Las secuencias de ADN que codifican las enzimas usadas en la presente invención pueden, opcionalmente, mutarse y seleccionarse más, a fin de generar más enzimas útiles, con una utilidad mejorada. Muchas características de las enzimas pueden, por tanto, mejorarse, incluyendo la actividad catalítica (kcat/km) frente al sustrato deseado, la estabilidad frente a la temperatura y el pH óptimo. Los métodos para generar, escrutar y seleccionar tales variantes mejoradas son bien conocidos. Por ejemplo, se generan secuencias de variantes de ADN adecuadas mediante un procedimiento de mutagénesis (p.ej. haciendo pases del ADN a través de cepas bacterianas o de levaduras con replicación de ADN propensa a errores, como *E. coli* XL1 red, mediante mutagénesis química o PCR dirigida a oligonucleótido). En particular, tales genes se producen mediante cualquier procedimiento alternativo de mezclado de ADN o "PCR sexual" como se resume, por ejemplo en WO-0061740, páginas 28-41, todas las cuales se incluyen aquí mediante referencia. Muchos métodos son adecuados para seleccionar tales genes mejorados. Los genes se pueden expresar adecuadamente en una célula hospedadora adecuada, como *E. coli* o levadura, y se seleccionan para la mejora usando ensayos adecuados como, por ejemplo, los aquí descritos.

Los genes quiméricos que codifican enzimas para uso en la invención que son capaces, solas o en combinación con otras, de convertir una sustancia no fitotóxica en una fitotóxica, pueden cada uno comprender una secuencia de ADN que codifica una de dichas enzimas unida operativamente a una región promotora en 5', la cual, preferiblemente, dirige la expresión a las estructuras reproductivas, bien masculinas o femeninas. Esta especificidad de expresión asegura que el efecto de la enzima o enzimas expresadas se ejercerá sólo en la localización de los tejidos y células necesarios para la formación de semilla o polen viable, y no será deletéreo para la planta, más allá de su efecto sobre la fertilidad en presencia de una sustancia no fitotóxica adecuada, quizás un precursor de herbicida. Además de regiones promotoras, los genes quiméricos según la presente invención comprenden también una secuencia terminadora transcripcional en 3'. Ésta es responsable de la terminación de la transcripción y de la correcta poliadenilación del ARNm. Muchas de estas secuencias terminadoras transcripcionales en 3' se conocen en la técnica y son adecuadas para su uso en los genes quiméricos de la presente invención. En realizaciones particulares, la secuencia terminadora transcripcional en 3' se selecciona del terminador CMV 35S, el terminador tm1, el terminador de nopalina-sintasa (nos) y el terminador *rbcS* EO de guisante.

Las regiones promotoras en 5', adecuadas para uso en ciertas realizaciones de dichos genes quiméricos, incluyen regiones 5' de genes que se expresan preferiblemente en tejidos florales femeninos. En ciertas realizaciones, la región promotora en 5' se selecciona del grupo formado por el promotor stig 1 de tabaco (Goldman et al., (1994) EMBO J., 13, 2976-2984), un promotor modificado S13 (Dzellcalns et al (1993) Plant Cell, 5, 8555), el promotor AGL5 (Savidge et al. (1995) Plant Cell, 7, 721-733 y la región promotora en 5' del gen ZAG2 específico del carpelo de maíz (Thiessen et al. (1995) Gene, 156, 155-166). Opcionalmente, se obtienen otras regiones promotoras adecuadas de regiones aguas arriba de las secuencias codificadoras del ADN genómico, correspondientes a secuencias de ADNc, que es conocido en la técnica que se expresan preferiblemente en las estructuras reproductivas femeninas. En ciertas realizaciones, tales sondas de DNac se seleccionan del grupo que consiste en los genes de Arabidopsis Fbp7 y Fbp11 (Angenent et al., (1995) Plant Cell, 7, 1569-1582) y los ADNc específicos de orquídea O40, O108, O39, O126 y O141 (Nadeau et al., (1996) Plant Cell, 8, 213-239). En realizaciones preferidas, las regiones promotoras en 5' que comprenden ADN genómico asociado con expresión preferencial en estructuras reproductivas femeninas, se seleccionan de regiones de ADN comprendidas en el grupo que consiste en el clon de ADN genómico pSH64, con número de acceso NRRL B-21920, clon genómico pCIB10302 que hibrida con el ADNc P26-A4 con número de acceso NRRL B 21655 y el clon de ADN genómico X2-1, que hibrida con el clon de ADNc P19-QA, con número de acceso NRRL B-21919. En realizaciones particulares adicionales, estas regiones promotoras comprenden los nucleótidos 1 a 1390 de SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 2 y nucleótidos 1 a 1093 de SEQ ID N° 4 en WO 98/39462. En realizaciones adicionales se aíslan y clonan otras regiones promotoras en 5', adecuadas para uso en los genes quiméricos de la invención, mediante métodos que son habituales para un experto en la técnica. Por ejemplo, se identifican nuevos transcritos expresados en estructuras

- 5 reproductivas femeninas aislando ARN de tejidos como maíz, géneros de seda o pistilos de trigo, seguido por escrutinio diferencial usando técnicas como visualización diferencial, sustracción de ADNc seleccionado por PCR y construcción de bibliotecas de ADNc sustractivas. Se aíslan clones de ADNc que se expresan preferentemente en los tejidos femeninos y no en otras partes de la planta, como las hojas, raíces y pendones. La especificidad tisular de la expresión se confirma, opcionalmente, mediante transferencia de Northern. Los clones de ADNc se usan como sondas para el escrutinio de bibliotecas genómicas. Se obtienen regiones promotoras en 5' y, opcionalmente regiones de ADN no traducidas en 3', asociadas con expresión preferencial de tejidos, de los clones de ADN genómico y se usan en la construcción de genes quiméricos para expresión preferente en estructuras reproductivas femeninas.
- 10 Las regiones promotoras en 5' adecuadas para uso en ciertas realizaciones de dichos genes quiméricos, incluyen regiones en 5' de genes que se expresan preferentemente en estructuras florales masculinas. Éstas incluyen regiones promotoras para expresión en polen, tapete, u otras estructuras de la antera. En ciertas realizaciones, estas regiones promotoras en 5' se seleccionan del grupo que consiste en el promotor LAT52 (Twell et al. (1989) Dev., 190, 705-713), el promotor A127 de tomate (Dotson et al., (1996) Plant J., 10, 383-393), el promotor de maíz Zmg (Hamilton et al., (1989) Sex. Plant Reprod. 2, 208-212), el promotor CDPK de maíz (Guerro et al., (1990) Mol. Gen. Genet., 224, 161-168) y los promotores específicos de antera ant32 y ant43D, descritos en US 5477002, incorporada aquí como referencia en su totalidad. En ciertas realizaciones adicionales, la región promotora en 5' se selecciona del grupo que consiste en el promotor específico del tapete CA55 de maíz ("Pea55" descrito en WO 92/13956), el promotor específico del tapete E1 de arroz (descrito en US 5.639.948), el promotor específico de la antera RA8 de arroz (número de acceso de EMBL/Genbank AF042275; Jean Js et al., (1999) PMB, 39, 35-44), el promotor específico de antera Tap1 (Spena et al (1992) Thero. Appl. Genet. 84, 520-527) y el promotor específico del polen ZmC5 de maíz (número de acceso de EMBL/Genbank Y13285; Wakeley et al, (1998) PMB, 37, 187-192). Opcionalmente, se obtienen regiones promotoras adicionales adecuadas a partir de regiones aguas arriba respecto a las secuencias codificadoras de ADN genómico correspondiente a secuencias de ADNc que se sabe del estado de la técnica que se expresan preferentemente en estructuras reproductivas masculinas. En ciertas realizaciones, tales sondas de ADNc se seleccionan del grupo que consiste en el gen del citocromo P450, específico del tubo de polen de la orquídea (Nadeau et al., (1996) Plant Cell, 8, 213-239), el gen Bcp1 de Arabidopsis (Xu et al (1995) P.N.A.S, 92, 2106-2110) y el gen MFS14 específico de la flor masculina de maíz (Wright S Y et al., (1993) Plant J 3, 41-49). En realizaciones adicionales, se aíslan y clonan otras regiones promotoras en 5', adecuadas para su uso en los genes quiméricos de la invención, mediante métodos que son conocidos para el experto en la técnica. Por ejemplo, se identifican nuevos transcritos expresados en estructuras reproductivas masculinas, aislando ARN de tejidos como pendones, tubos de polen, anteras o tapete, seguido de escrutinio diferencial mediante técnicas como visualización diferencial, sustracción de ADNc seleccionado por PCR y construcción de bibliotecas de ADNc sustractivas. Se aíslan clones de ADNc que se expresan preferentemente en los tejidos masculinos y no en otras partes de la planta, como las hojas, raíces y estigma. La especificidad de tejido de la expresión se confirma, opcionalmente, mediante transferencia de Northern. Los clones de ADNc se usan como sondas para el escrutinio de bibliotecas genómicas. Se obtienen regiones promotoras en 5' y, opcionalmente, regiones de ADN no traducidas en 3', asociadas con expresión preferente de tejidos, de los clones de ADN genómico y se usan en la construcción de genes quiméricos para expresión preferente en estructuras reproductivas masculinas.
- 40 Otras regiones promotoras útiles en los genes quiméricos de la invención incluyen las regiones aguas arriba del gen 13 de Osmads de arroz, el gen OSG de antera de arroz y el gen YY2 de arroz. Generalmente, se seleccionan como más adecuadas las regiones promotoras que producen expresión elevada, temprana, prolongada y preferente en estructuras reproductivas masculinas o femeninas. Las regiones promotoras pueden comprender también adicionalmente combinaciones quiméricas entre sí y con regiones activadoras adicionales.
- 45 Los genes quiméricos pueden comprender adicionalmente una región, que precede inmediatamente a la secuencia de ADN que codifica la enzima implicada en la conversión de la sustancia no fitotóxica en fitotoxina, que codifica una secuencia peptídica capaz de dirigir dicha enzima a organelos subcelulares como el cloroplasto, peroxisoma (en un caso distinto a aquel en que la fitotoxina es un anión peróxido o superóxido) o mitocondria, y dicha proteína direccionante puede tener la secuencia de (i) un péptido de tránsito cloroplástico o (ii) una porción N-terminal de un péptido de tránsito cloroplástico de una proteína cloroplástica o péptido de tránsito cloroplástico. Esto puede ser especialmente ventajoso cuando, por ejemplo, dicha secuencia de ADN codifica una enzima D-aminoácido-deshidrogenasa, que se esperaría que funcionase mejor en un compartimento como la mitocondria o el cloroplasto que comprende una cadena de transporte de electrones de membrana o cuando, por ejemplo, la secuencia de ADN codifica una enzima que cataliza sólo una etapa parcial en la transformación global deseada y donde la reacción total requiere la combinación con metabolitos compartimentados y actividades endógenas. En particular, para dirigirse a la mitocondria, dicha región de ADN que precede inmediatamente a la secuencia de ADN que codifica la enzima, codifica una secuencia de péptido de tránsito mitocondrial. En ciertas realizaciones, la secuencia del péptido de tránsito se puede seleccionar del grupo que consiste en las secuencias del péptido de tránsito endógeno de la subunidad beta de la ATP-sintasa mitocondrial de *Nicotinia plumbaginifolia*, isocitrato-deshidrogenasa NADP-dependiente específica de mitocondria, subunidad que se une a NADPH del complejo de la cadena respiratoria I y triptofanil-tARN-sintetasa mitocondrial de levadura (WO 6121513).
- 60

Los polinucleótidos para uso en el presente método inventivo pueden comprender uno o más genes quiméricos que codifican enzimas que catalizan reacciones implicadas en la generación de fitotoxinas a partir de sustancias no fitotóxicas. Opcionalmente, dichos polinucleótidos comprenden genes y genes quiméricos adicionales, como un gen marcador quimérico. Un gen marcador quimérico, según se usa aquí, comprende un ADN marcador bajo el control de expresión de un promotor que es activo en células vegetales. El ADN marcador codifica un ARN, proteína o polipéptido, que, cuando se expresa en una planta, tejido vegetal o célula vegetal, permite que tal material vegetal se distinga del material vegetal que no expresa el ADN marcador. Ejemplos de tales genes marcadores son genes que proporcionan un color específico a una célula, como el gen A1 (Meyer et al., (1987) Nature 330, 667), o genes que vuelven a las células vegetales resistentes a selección con antibióticos, letal en otras circunstancias (p.ej., el gen aac(6') que codifica resistencia a gentamicina, WO 94/01560, o genes de higromicina-transferasa, que proporcionan resistencia a higromicina), o herbicidas como glifosato (p.ej., genes EPSPS, como en los documentos US 5510471 o WO 00/66748), fenmedifam (p.ej. gen pmph US 5347047; US 5543306), bromoxinilo (p.ej. genes descritos en el documento US 4810648), sulfonilureas (p.ej., genes descritos en EP 0360750), dalapon (genes descritos en WO 99/48023), cianamida (genes descritos en WO 98/48023; WO 98/56238) y genes que codifican resistencia a inhibidores de glutamina-sintetasa, como L-fosfinotricina (como, por ejemplo, los genes de N-acetil-transferasa descritos en EP 0242246, EP 0242246 Y EP 0257542). En una realización preferida del polinucleótido de la presente invención, que comprende un gen de resistencia a herbicida como gen marcador, dicho herbicida es un herbicida que es útil para el control de las malas hierbas en el cultivo y, adicionalmente, el gen de resistencia a herbicida se expresa suficientemente para proporcionar una fuerte tolerancia a las proporciones de dicho herbicida en el terreno. En una realización adicional preferida de la invención, el herbicida es glifosato y el gen de resistencia a herbicida es una EPSP-sintasa. Sin embargo, el gen marcador puede ser un gen que proporciona selección positiva en la que el gen marcador codifica una enzima que proporciona una ventaja metabólica positiva a las células vegetales transformadas, en el contexto de un medio particular. El documento US 5767378 describe diversos sistemas y genes de selección positiva adecuados.

Cuando el polinucleótido de la presente invención comprende un gen de resistencia a herbicida, el herbicida se aplica exógenamente a plantas cultivadas, que se plantan intercaladamente a una densidad suficiente para eliminar la producción de semilla no híbrida que se origina de plantas parentales auto-fértiles. En una realización preferida, el herbicida es glifosato o una de sus sales agrónomicamente útiles, y dicho gen marcador de resistencia a herbicida se selecciona entre aquellos genes que confieren resistencia a herbicida descritos en WO 00/66748.

Cuando un gen marcador está presente, también se pueden proporcionar medios para la eliminación de dicho gen marcador. Esto es deseable cuando, por ejemplo, se decide combinar rasgos. Además, también es deseable eliminar genes de resistencia a herbicidas que podrían interferir con el funcionamiento del mecanismo de fertilidad condicional dependiente de precursor de herbicida de la presente invención. Por ejemplo, podría ser deseable eliminar un gen marcador de resistencia al herbicida N-acetil transferasa (PAT) de un polinucleótido que comprende también un gen quimérico, útil para proporcionar esterilidad masculina o femenina condicional, dependiente de la aplicación exógena del precursor de herbicida D-fosfinotricina. La presencia del gen PAT podría interferir potencialmente con la esterilidad condicional exitosa, inactivando la fitotoxina L-fosfinotricina. Por tanto, los polinucleótidos que comprenden genes marcadores pueden comprender opcionalmente sitios de reconocimiento específicos para recombinasas específicas en posiciones que flanquean el gen marcador y que permiten eliminar la secuencia. El cruzamiento de una planta que lleva el gen marcador flanqueado de esa forma con una planta que lleva un gen marcador que codifica la recombinasa específica correspondiente, produce una progenie de plantas de las que se escinde específicamente el marcador. Ejemplos de tales sistemas de recombinación homóloga específicos de sitio son el sistema flp/frt (Lyznik et al., (1996), Nucleic Acids Res. 24, 3784-3789) y el sistema Cre/Lox (Bayley, C.C. et al., (1992) PMB, 18, 353-361).

Los polinucleótidos usados en el presente método inventivo pueden comprender opcionalmente uno o más activadores de la traducción, localizados en las regiones no traducidas en 5' de las regiones codificadoras de proteínas. El experto en la técnica es conocedor de la identidad de tales activadores de traducción adecuados, como las secuencias cebadoras Omega y Omega prima derivadas de TMV y las derivadas del virus del grabado del tabaco, y de cómo se pueden introducir dichos activadores de la traducción en el polinucleótido, para proporcionar el resultado deseado de expresión incrementada de proteínas.

Ejemplos adicionales incluyen activadores de la traducción derivados del virus del moteado clorótico del maíz y del virus del mosaico de la alfalfa (Gallie et al., (1987) Nucl. Acids Res., 15, 8693-8711; Skuzeski et al., (1990) PMB., 15, 65-79). Para optimizar adicionalmente la expresión de proteínas a partir de genes quiméricos y de genes marcadores quiméricos, dichos polinucleótidos pueden comprender adicionalmente elementos como activadores, regiones de unión a estructura (SAR o MARS) e intrones. Se ha demostrado que varias secuencias de intrones, como el intrón adh 1 de maíz, activan la expresión cuando se incluyen en la región no traducida en 5' de los genes y, opcionalmente, se usan en los genes quiméricos de la presente invención.

Las plantas que se han transformados según la invención para presentar las características de esterilidad masculina/femenina deseadas, se pueden haber transformado también con un polinucleótido que comprende regiones que codifican proteínas capaces de conferir al material vegetal que las contiene, al menos una de las siguientes

características agrónomicamente deseables: resistencia a insectos, hongos, virus, bacterias, nemátodos, estrés, desecación y herbicidas.

5 Los genes que confieren resistencia a herbicidas se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que codifica las siguientes proteínas: glifosato-oxidasa (GOX), EPSP-sintasa, fosfotricina-acetil-transferasa (PAT), hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (HPPD), glutatión-S-transferasa (GST), citocromo P450, acetil-CoA-carboxilasa (ACCase), acetolactato-sintasa (ALS), protoporfirinógeno-oxidasa (PPG), dihidropteroato-sintasa, proteínas de transporte de poliaminas, superóxido-dismutasa (SOD), bromoxinil-nitrilasa, fitoeno-desaturasa (PDS), el producto del gen *ftdA* obtenible de *Alcaligenes eutrophus*, y variantes conocidas, mutagenizadas o modificadas de otras formas, de dichas proteínas. El experto en la técnica reconocerá la necesidad de elegir tales genes, y los promotores que dirigen su expresión, cuidadosamente, teniendo en cuenta la naturaleza de la enzima utilizada para convertir la sustancia no fitotóxica. En caso de que el polinucleótido proporcione resistencia a múltiples herbicidas, tales herbicidas se pueden seleccionar del grupo que consiste en un herbicida de tipo dinitroanilina, triazolo-pirimidinas, uracilo, fenilurea, tricetona, un ixoxazol, acetanilida, oxadiazol, triazinona, sulfonanilida, amida, anilida, isoxaflutol, fluorocloridona, norflurazón y triazolinona y el herbicida post-emergencia se selecciona del grupo que consiste en glifosato y sus sales, glufosinato, asulam, bentazón, bialafos, bromacilo, setoxidim u otra ciclohexanodiona, dicamba, fosamina, flupoxam, fenoxi-propionato, quizalofop u otro ariloxi-fenoxi-propanoato, picloram, fluormetrón, butafenacilo, atrazina u otra triazina, metribuzina, clorimurón, clorosulfurón, flumetsulam, halosulfurón, sulfometrón, imazaquina, imazetrapir, isoxabén, imazamox, metosulam, piritrobaq, rimsulfurón, bensulfurón, nicsulfurón, fomesafén, fluroglicofén, KIH9201, ET751, carfentrazona, mesotriona, sulcotriona, paraquat, diquat, bromoxinilo y fenoxaprop.

En el caso de que el polinucleótido comprenda secuencias que codifiquen proteínas insecticidas, estas proteínas se pueden seleccionar del grupo que consiste en toxinas cristalinas derivadas de Bt, incluyendo toxinas Bt secretadas, como aquellas conocidas como "VIP", inhibidores de proteasa, lectinas y toxinas de *Xenorhabdus/Photorhabdus*. Los genes que confieren resistencia a hongos pueden seleccionarse del grupo que consiste en los que codifican AFPs, defensinas, quitinasas, glucosidas y Avr-Cf9 conocidas. CryIAC, cryIAb, cry3A, Vip 1^a, Vip 1B, Vip 3^a, Vip 3B, inhibidores de cisteína-proteasa y lectinas en copo de nieve son proteínas insecticidas particularmente preferidas. En el caso de que el polinucleótido comprenda genes que confieren resistencia a bacterias, éstos se pueden seleccionar del grupo formado por aquellos que codifican cecropinas y tequipesina y sus análogos. Los genes que confieren resistencia a virus se pueden seleccionar del grupo que consiste en aquellos que codifican proteínas de la envuelta, proteínas de movimiento, replicasas virales y secuencias antisentido y de ribozima virales, que se sabe que proporcionan resistencia a virus, mientras que los genes que confieren resistencia al estrés, sal y sequía se pueden seleccionar de aquéllos que codifican Glutatión-S-transferasa y peroxidada, la secuencia que constituye la secuencia reguladora CBF1 y genes que se sabe que permiten la acumulación de trehalosa.

Los polinucleótidos usados según la presente invención se pueden haber modificado para activar la expresión de las secuencias codificadoras de proteínas comprendidas por los mismos, de forma que los motivos y/o regiones de escisión fortuitas de inestabilidad del ARNm se pueden haber eliminado, o los codones preferidos del cultivo se pueden haber usado de forma que la expresión del polinucleótido así modificado en una planta, produzca una proteína sustancialmente similar que tenga una actividad/función sustancialmente similar a la obtenida mediante la expresión de las regiones codificadoras de la proteína del polinucleótido sin modificar, en el organismo en el que tales regiones del polinucleótido sin modificar son endógenas. El grado de identidad entre el polinucleótido modificado y un polinucleótido contenido endógenamente en dicha planta y que codifica sustancialmente la misma proteína, puede ser tal que evite la cosupresión entre las secuencias modificada y endógena. En este caso, el grado de identidad entre las secuencias debería de ser preferiblemente inferior a aproximadamente el 70%. Además, la secuencia alrededor de una posición de inicio de la traducción, se puede modificar de forma que sea "preferida por Kozack". Lo que significa esto es bien conocido por el experto en la técnica.

La invención incluye también plantas completas condicionalmente fértiles, morfológicamente normales, que resultan del cruzamiento de plantas que se han regenerado a partir de material que se ha transformado con el ácido nucleico según la presente invención y que, por tanto, proporciona tal rasgo. La invención incluye así mismo la progenie de las plantas resultantes, sus semillas y partes.

Las plantas de la invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en productos de cultivo, frutas y vegetales, tales como colza, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, remolacha forrajera, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresas, plátano, melón, patata, zanahoria, lechuga, col, cebolla, especies de soja, caña de azúcar, caña de azúcar, guisantes, habas pequeñas, álamos, uvas, cítricos, alfalfa, centeno, avena, césped y pastos de forraje, aceite de lino y semillas y plantas productoras de frutos secos, siempre que no se hayan mencionado específicamente, su progenie, semillas y partes.

Tales plantas específicamente preferidas incluyen trigo, cebada, avena, arroz, maíz, mijo y sorgo.

La invención proporciona también un método preferido de producción de semilla de trigo híbrido, que comprende las etapas de:

- (i) transformar material vegetal con un polinucleótido o vector que comprende un gen que confiere esterilidad masculina condicional, tras la aplicación exógena de un precursor de herbicida u otra sustancia no fitotóxica;
- 5 (ii) seleccionar el material así transformado; y
- (iii) regenerar el material así seleccionado en plantas completas condicionalmente masculino-estériles, morfológicamente normales;
- 10 (iv) obtener una línea parental femenina, condicionalmente masculino-estéril, homocigótica;
- (v) transformar el material vegetal con un polinucleótido o vector que comprende un gen que confiere esterilidad femenina condicional, tras la aplicación exógena del mismo precursor de herbicida o sustancia no fitotóxica que en (i);
- 15 (vi) seleccionar el material así transferido; y
- (vii) regenerar el material así seleccionado en plantas completas condicionalmente femenino-estériles, morfológicamente normales
- 20 (viii) obtener una línea parental masculina, condicionalmente femenino-estéril, homocigótica;
- (ix) plantar intercaladamente dichas líneas parentales masculina y femenina, condicionalmente estériles en una proporción tal que asegure la polinización eficiente;
- 25 (x) aplicar dicho precursor de herbicida u otra sustancia no fitotóxica a las líneas progenitoras plantadas intercaladamente, en una dosis y en una etapa del desarrollo tal que se minimice la autofertilización;
- (xi) Cosechar semilla de trigo híbrido de las plantas progenitoras plantadas intercaladamente.
- 30 La presente invención proporciona así mismo variantes del método anterior, en las que el progenitor masculino es femenino-estéril por cualquier método, el progenitor femenino es masculino-estéril por cualquier método, las líneas parentales masculina y femenina son condicionalmente estériles, dependiendo de la aplicación de sendos precursores de herbicidas distintos, aplicándose ambos, y el cultivo es diferente de trigo.
- 35 Respecto a la transformación del material vegetal, los expertos en la materia reconocerán que, aunque se especifiquen en los ejemplos más adelante tipos particulares de material diana (p.ej. cultivo en suspensión de células embriogénicas o embriones inmaduros que se están desdiferenciando) y métodos particulares de transformación (p.ej. usando *Agrobacterium* o bombardeo de partículas), la presente invención no está limitada a estas realizaciones particulares y tales materiales diana, y los métodos se pueden usar de forma intercambiable. Además, el término "células vegetales",
- 40 según se usa a lo largo de la descripción de la invención, se puede referir a células aisladas, incluyendo cultivos en suspensión, así como a células en tejidos intactos o parcialmente intactos, como embriones, escutelo, microspora, embrión derivado de la microspora o células somáticas de órganos vegetales. De forma similar, aunque los ejemplos específicos se limitan a maíz y trigo, la invención es igualmente aplicable a un amplio rango de cultivos agrícolas que se pueden transformar usando métodos adecuados de transformación de células vegetales.
- 45 La presente invención estará más clara a partir de los siguientes ejemplos no limitativos, tomados junto con el listado de secuencias y los dibujos asociados.
- 50 SEQ ID N°: 5 y 6 representan los cebadores de PCR usados para obtener la región promotora TA29
- SEQ ID N°: 7 representa una secuencia de ADN, aislada de *Rhodotorula gracilis*, que codifica una enzima con actividad de D-aminoácido-oxidasa.
- 55 SEQ ID N°: 8 y 9 representan oligos degenerados usados para proporcionar una variante de D-amino-oxidasa.
- SEQ ID N°: 10 y 11 representan motivos en los que aminoácidos alternativos se pueden sustituir a fin de proporcionar variantes de D-aminoácido-oxidasa.
- 60 La Figura 1 es una representación esquemática de una construcción para la transformación de tabaco, que tiene *Rhodotorula* D-aminoácido-oxidasa bajo el control modulable de la región promotora stig 1. Los componentes indicados son LB (secuencia del límite izquierdo), AOPRE1 (promotor AoPR1, PSTIG1 (n° de acceso de EMBL X77823), RGDAO (OPT) (SEQ ID N°: 7), PROMOTOR PC (n° de acceso de EMBL X16072), PAT (n° de acceso de EMBL A02774), NOS (terminador nos obtenido del n° de acceso de EMBL atu237588) y RB (secuencia del límite derecho).

La figura 2 es una representación esquemática de una construcción para la transformación de tabaco, en la que una secuencia codificadora de D-aminoácido-oxidasa de *Rhodotorula* se trunca mediante 3 codones en el extremo 3', y en el extremo 5' (RGDAO(OPT)-SKL) se fusiona a una región que codifica un péptido de tránsito optimizado (FR2673643).

5 Los métodos de biología molecular general se realizan según métodos bien establecidos.

En su mayor parte, los siguientes ejemplos comprenden cada uno de las múltiples de la presente invención. Cuando se usa el término "región promotora de un gen", se considera que éste denomina secuencias de ADN que comprenden el promotor, secuencias aguas arriba del promotor, y también, opcionalmente, toda o parte de la secuencia de ADN que codifica la región líder no traducida en 5' del ARNm.

Ejemplo 1. Plantas de tabaco que son condicionalmente femenino-estériles, dependientes de la aplicación exógena de D-fosfinotricina o D-alanina o D-leucina o D-metionina o D-asparagina o D-aspartato o D-glutamato

15 La secuencia de ADN que codifica la secuencia de la proteína D-aminoácido-oxidasa Q99042 (Swissprot) comprendida en la secuencia EMBL Z50019 se obtiene, bien mediante RT-PCR a partir de ARNm de *Trigonopsis variabilis*, o se obtiene sintéticamente. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la secuencia de la proteína D-aminoácido-oxidasa P80324 (Swissprot) incluida en la secuencia de EMBL A56901, se obtiene, bien mediante RT-PCR del ARNm de *Rhodospiridium toruloides* (*Rhodotorula gracilis*) o se obtiene sintéticamente (lo que hace más fácil controlar qué

20 sitios internos de enzimas de restricción están presentes y crear sitios flanqueantes para facilitar la clonación) como por ejemplo SEQ ID N° 7, que se diseña teniendo en cuenta el uso del codón de la planta (en este caso trigo), y para minimizar las características del ADN potencialmente desfavorables para la expresión. Alternativamente, la secuencia de ADN (p.ej. derivada de la de n° de acceso de EMBL X95310) codifica una "D-aspartato-oxidasa" como P31228 (Swiss Prot) y, de nuevo, se sintetiza teniendo en cuenta el uso del codón de la planta y para minimizar las

25 características desfavorables para la expresión. Alternativamente, las secuencias codificadoras de D-aminoácido-oxidasa obtenidas son las mismas que en el ejemplo 2. Las secuencias flanqueantes del cebador de PCR y las secuencias de ADN sintéticas se diseñan para establecer sitios de restricción únicos útiles para la clonación. Preferiblemente, y en el caso en que la secuencia codificadora de oxidasa no contenga sitios internos confusos, se coloca un sitio Nco1 o Nde 1 en el extremo 5', para facilitar la clonación de fusiones internas al marco de lectura con

30 secuencias añadidas al ORF en 5', como secuencias codificadoras del péptido de tránsito cloroplástico. En algunas variantes del ejemplo, el gen de la D-aminoácido-oxidasa (denominada en algunas variantes "D-aspartato-oxidasa") se clona de tal forma que los aminoácidos 3' terminales se truncan y la enzima codificada, por tanto, ya no es dirigida al peroxisoma. En una serie adicional de variantes del método, el gen se obtiene mediante ingeniería genética por PCR, para codificar la D-aminoácido óxidasa de *Rhodotorula gracilis* con aminoácidos alternativos en posiciones 213 y 238 y,

35 en particular con una arginina, serina, cisteína, lisina, asparagina o alanina reemplazando la metionina en posición 213 y/o una histidina, serina, cisteína, asparagina o alanina reemplazando la tirosina en posición 238. La metionina en posición "213" se identifica como M en el motivo de la secuencia de la proteína nativa RCTMDSS. La tirosina en posición 238 se identifica como "Y" en el motivo de la secuencia de la proteína nativa GGTYGVG. Estas variantes de la D-aminoácido-oxidasa de *Rhodotorula* o la "D-aspartato-oxidasa", se usan cuando la esterilidad femenina se tiene que

40 hacer condicional tras la aplicación de D-aspartato, D-glutamato o D-fosfinotricina.

Se pueden colocar sitios de restricción aguas arriba de los intrones del sitio de inicio de la traducción ATG, que concuerden con las secuencias consenso de traducción de la planta, como aquellas según Kozak.

45 El promotor "delta S13" es una región promotora útil para obtener expresión preferente en partes de la flor femeninas. Éste comprende una región -339 a -79 desde la región promotora SLG13, fusionada con la que va de -46 a + 8 del promotor nuclear CMV 35S (Dzelkains et al (1993) Plant Cell, 5, 833-863). Esta región promotora S13 se clona en el plásmido bluescript sk, el cual se somete nuevamente a restricción y se liga con fragmentos de restricción que comprenden la región terminadora transcripcional nos 3' y una u otra de las secuencias codificadoras de aminoácido-oxidasa, de forma que se cree una casete de expresión "delta S13-D-aminoácido-oxidasa-terminador Nos" dentro de un

50 plásmido bluescript sk. Éste se elimina entonces adecuadamente como, por ejemplo, en forma de fragmento EcoR1 y, como tal, se vuelve a ligar en un sitio adecuado de un vector como Pbin19 (Bevan (1984) Nucleic Acids Res.) o pCIB200 o pCIB2001 (WO 98/39462) a fin de usarlo para transformación usando *Agrobacterium*. Como se describe en WO 98/39462, pCIB200 contiene los siguientes sitios de restricción de policonector únicos: EcoR1, Sst1, Kpn1, BglIII, Xba1 y Sall. PCIB 2001 contiene una inserción en el policonector, que añade sitios de restricción únicos adicionales, que incluyen MluI, BclI, AvrII, Apal, HpaI y StuI. PCIB200 y pCIB2001 proporcionan también genes marcadores seleccionables para selección de plantas y bacterias sobre kanamicina, límites izquierdo y derecho de ADN-T, la función trfA derivada de RK2 para movilización entre *E. coli* y otros hospedadores y las funciones oriT y oriV de RK2. Alternativamente, se usa el vector binario Pcib10, que incorpora secuencias del plásmido Prk252 de amplio ámbito de

60 hospedadores (Rothstein et al (1987) Gene 53, 153-161) o uno de sus derivados, que incorpore genes de resistencia a kanamicina y el gen de higromicina-fosfotransferasa, como Pcib715 (Gritz et al (1983) Gene 25, 179-188).

Alternativamente, se usa la región promotora Stig 1 ~ 1,6 kb (derivada del n° de acceso de EMBL X77823). Por ejemplo, la región codificadora del gen GUS en la construcción stg1-GUS, descrita por Goldman et al (1994) en EMBO J., 13,

2976-2984, se reemplaza con la secuencia de ADN que codifica las secuencias codificadoras P30324 o Q99042, usando enzimas de restricción adecuadas, y la construcción de expresión stig1-D-aminoácido-oxidasa resultante, se clona en un vector adecuado como pCIB200, en una posición aguas arriba de una secuencia terminadora en 3', adyacente a un gen marcador adecuado y entre secuencias límite de ADN-T.

En un ejemplo particular adicional, el inserto de ADN-T comprendido en el vector binario se construye según la figura 1. Se clona una construcción que comprende la secuencia de ADN sintética (SEQ ID N° 7) que codifica la D-aminoácido-oxidasa de *Rhodotorula gracilis*, bajo el control modulable de la región promotora stig1 y también la secuencia de ADN (A02774), que codifica la L-fosfinotricina-N-acetil-transferasa (PAT), bajo el control modulable de la región promotora de plastocianina de guisante, en un sitio entre el gen LB/upt II y el RB del ADN-T del vector binario. En resumen, la secuencia ID N° 7 se clona en el plásmido pFse4-Stig1nos (descrito en WO9942598) detrás del promotor Stig1 y frente a la región terminadora nos (comprendida en EMBL ATU237588), como un fragmento NcoI/PstI. La región promotora de plastocianina de guisante (derivada del n° de acceso de EMBL X16082), se obtiene del ADN genómico de guisante mediante PCR y se clona frente al gen PAT/terminador nos. La casete PC-PAT-nos resultante se clona detrás del Stig1-RGDAMOX-nos, como un fragmento NotI, y esta construcción completa de dos genes se transfiere a un vector binario (Pvb6, un derivado de Bin19), como un fragmento FseI.

En una variante adicional del método, la construcción usada está de acuerdo con la representación esquemática de la figura 2. La secuencia codificadora de la D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula*, SEQ ID N° 7, opcionalmente mutada mediante mutación dirigida para codificar la forma M213R, se trunca mediante 3 codones en el extremo 3', y en el extremo 5' se clona para colocarla inmediatamente aguas abajo de una región que codifica un péptido de tránsito cloroplástico, de forma que se codifica una proteína de fusión de péptido de tránsito cloroplástico/D-aminoácido-oxidasa. La secuencia codificadora del péptido de tránsito cloroplástico deriva del gen de *Arabidopsis* que codifica la subunidad pequeña de la EPSP-sintasa (Klee et al, 1987 en Mol- Gen. Genet., 210, 437). Opcionalmente, ésta está modificada para incluir un sitio Sph1 en el sitio de procesamiento de CTP, reemplazando por tanto la Glu-Lys en este sitio por Cys-Met (SEQ EN Fig. 9 de WO 92044490). Correspondientemente, se puede incorporar mediante ingeniería genética un sitio en el extremo N-terminal de la secuencia codificadora de D-aminoácido-oxidasa (convirtiendo el aminoácido a continuación de la metionina en una Leu). Alternativamente, la secuencia codificadora del péptido de tránsito cloroplástico deriva del gen de *Petunia* que codifica EPSP-sintasa (Fig. 11 de WO 92044490). Alternativamente, la secuencia codificadora del péptido de tránsito cloroplástico es una de un gran número de posibilidades que incluyen aquéllas derivadas de genes que codifican la subunidad pequeña de Rubisco e incluyendo la así denominada secuencia del péptido de tránsito quimérica "optimizada" (FR 2673643). En todos los casos, más que basarse en la subclonación, la secuencia de ADN deseada total que codifica el polipéptido de fusión de péptido de tránsito cloroplástico/D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula*, se puede obtener sintéticamente de forma sencilla. Esta secuencia se clona en un sitio aguas abajo de la región promotora stig1 y aguas arriba de una secuencia terminadora (p.ej. nos), dentro de un vector adecuado (p.ej., reemplazando la secuencia codificadora de GUS en el vector que contiene la construcción stig1 → GUS, descrito por Goldman et al. (1994) en EMBO J., 13, 2976-2984). La construcción de expresión génica total se clona entonces en un sitio adecuado entre los límites derecho e izquierdo del ADN-T de un vector PVB6.

Se transforman discos de hoja de tabaco con los vectores binarios recombinantes, usando métodos similares a los descritos en Horsch et al (1985) Science, 227, 1229-1231. Se pueden usar muchas variaciones del método. El vector binario se puede transformar, por ejemplo, en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 usando el método de transformación de congelación-descongelación. La transformación del tabaco y la regeneración de la planta total se realiza usando *Nicotiana tabacum* var. Samsun, según los protocolos descritos por Draper et al. (Plant Genetic Transformation, Blackwell Sci. Pub. 1989). Los eventos de transformación se seleccionan en medio MS que contiene kanamicina u otro antibiótico adecuado. La presencia de transgenes integrados se confirma mediante PCR. Las plantas se regeneran y se dejan alcanzar la madurez y se deja que produzcan semillas por sí mismas. Se usa análisis de Northern y/o Western para confirmar la expresión tisular específica de los genes de D-aminoácido-oxidasa. Las plantas son autofértiles pero presentan la característica de esterilidad femenina condicional. Se plantan las semillas de la generación T1. Una vez que las plántulas han crecido hasta un tamaño suficiente, se ensayan mediante PCR para la presencia del transgén. Las plantas positivas para la PCR se transfieren al invernadero. Estas plantas son totalmente fértiles en ausencia de precursor de herbicida aplicado exógenamente. Un subgrupo de estas plantas condicionalmente estériles (putativamente), se tratan con D-fosfinotricina o D-alanina o D-leucina o D-asparragina o D-metionina o D-aspartato o D-glutamato, en varias cantidades y en fases del crecimiento variables. Tales tratamientos se realizan sobre las plantas T1 confirmadas como PCR positivas para el gen de D-aminoácido-oxidasa o, igualmente, tales tratamientos se realizan directamente sobre plantas de la generación T₀ (que se clonan vegetativamente de forma que los clones no tratados de cada evento se pueden apartar para producción de semillas). La fertilidad observada se usa luego como base para seleccionar líneas de plantas adecuadas que presenten el fenotipo de esterilidad condicional más claro. Por ejemplo, esos aminoácidos son enantiómeros D puros o, alternativamente, racematos DL. Por ejemplo, se aplican como un pulverizador foliar, previamente o durante las etapas tempranas de formación de la flor, en proporciones usualmente entre 0,25 y 20 kg/ha. Los aminoácidos que pueden eliminarse por cristalización de la solución sobre las hojas, tras la aplicación foliar, se pueden volver a disolver y volverse a movilizar para la absorción por las hojas mediante nuevas aplicaciones de agua en forma de una nebulización de pulverizador. Los aminoácidos se aplican también, por ejemplo, como empape de raíces y, opcionalmente se pueden aplicar además como ~ 50 ml de una solución 10-200 mM que

inunda directamente los capullos de las florecillas emergentes. Se recoge el polen de la planta tratada y se ensaya su viabilidad. Se obtienen plantas que producen relativamente poca o ninguna semilla tras el tratamiento con D-fosfinotricina o D-alanina o D-leucina o D-asparagina o D-metionina o D-aspartato o D-glutamato, pero que, sin embargo, bajo las mismas condiciones de tratamiento, producen niveles cercanos a los normales de polen viable. Las plantas control son transgénicas y no transgénicas, y se cultivan bajo condiciones idénticas y bajo un régimen idéntico de tratamientos físicos, excepto porque las soluciones de tratamiento son agua o una concentración equivalente de L-aminoácido puro.

En una variante del método, el aminoácido aplicado es DL-fosfinotricina racémica. En este caso, la construcción de ADN usada para la transformación comprende, además de la secuencia de ADN que codifica una D-aminoácido-oxidasa bajo el control de expresión modulable de una región promotora floral femenina específica como "stig 1", también una secuencia de ADN (embl a02774) un gen "PAT" bajo el control modulable de una región promotora como la región 5' del inicio de la traducción del gen de plastocianina de *Pisum sativum* (nº de acceso EMBL X16082). Por ejemplo, la construcción es la misma que se representa en Fig. 1, excepto porque la secuencia de ADN que codifica la D-aminoácido-oxidasa está mutada de forma dirigida, de manera que se codifica la forma M213R de la enzima. La región promotora de plastocianina proporciona la expresión preferente en los tejidos verdes de la planta. Se descubre, inesperadamente, que tal promotor, que, a diferencia por ejemplo de la región promotora 35S, se expresa sustancialmente sólo en ciertos tejidos de la planta y más marcadamente en tejidos verdes, proporciona sin embargo, cuando se usa en combinación con el gen PAT, una tolerancia reproductiva completa al herbicida DLPPT, incluso en proporciones en exceso de 2 kg/ha. Además, en ausencia de cualquier D-aminoácido-oxidasa heteróloga adecuada, o actividad convertidora de D a L similar coexpresada en los tejidos florales, la combinación plastocianina/gen PAT proporciona una tolerancia reproductiva esencialmente completa, sin ninguna pérdida de rendimiento significativa, a pesar de que el nivel de expresión de PAT sea bajo o inexistente en muchos de los tejidos florales críticos, cuando se expresa bajo el control de esta región promotora. Por tanto, en esta variante del ejemplo, la sustancia no fitotóxica D-fosfinotricina se aplica en su forma menos costosa y más fácilmente disponible, como el herbicida comercial racemato de DL-fosfinotricina. En proporciones e intervalos de tiempo de pulverización adecuados entre 250 g/ha y 5 kg/ha de DL-fosfinotricina, las plantas tratadas no se dañan visiblemente pero se vuelven condicionalmente femenino-estériles, mientras que permanecen normales o próximas a la normalidad para la fertilidad masculina.

Ejemplo 2. Plantas de tabaco que son condicionalmente masculino-estériles, dependiendo de la aplicación exógena de D-fosfinotricina o D-alanina o D-leucina o D-metionina o D-asparagina o D-aspartato o D-glutamato

La secuencia de ADN que codifica la secuencia de la proteína D-aminoácido-oxidada Q9HGY3 (Sptrembl) incluida en la secuencia de EMBL AB042032 se obtiene, bien por RT-PCR de ARNm de *Candida boidini*, o se obtiene sintéticamente. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la secuencia de la proteína D-aminoácido-oxidasa P24552 (Swissprot), incluida en la secuencia de EMBL D00809 se obtiene, bien por RT-PCR del ARNm de *Fusarium solani*, o se obtiene sintéticamente. Las secuencias flanqueantes del cebador de PCR o sintéticas se diseñan para localizar sitios de restricción únicos útiles para la clonación. Preferiblemente, y en el caso en el que la secuencia codificadora de oxidasa no contenga sitios internos confusos, se coloca un sitio Nco1 o Nde1 en el extremo 5', para facilitar la clonación de fusiones dentro del marco de lectura con secuencias añadidas al ORF en 5'. Alternativamente, cuando los sitios de restricción se colocan aguas arriba del sitio de inicio de la traducción ATG, se diseñan los intrones para que estén de acuerdo con secuencias consenso de traducción de plantas según Kozak. Alternativamente, las secuencias que codifican D-aminoácido-oxidasa obtenidas son las mismas que en el ejemplo 1. De nuevo, como en el ejemplo previo, cuando la esterilidad se tiene que hacer dependiente de la aplicación de D-aspartato, D-glutamato o D-fosfinotricina, entonces, preferiblemente, las D-aminoácido-oxidases son variantes en las posiciones de los aminoácidos 23 y/o 238.

La región promotora TA29 (Kriete et al (1996) Plant J., 9, 808-818) se clona a partir de ADN genómico de tabaco mediante PCR, usando los cebadores 5'- AACTGCAGCTTTTTGGTTAGCGAATGC-3' (SEQ ID Nº 5) y 5'- CAGACTAGTTTTAGCTAATTTCTTTAAGTAAAAAC-3' (SEQ ID Nº 6). A través de una serie de etapas de restricción y subclonación, el fragmento de PCR así obtenido se coloca aguas arriba de la secuencia codificadora de D-aminoácido-oxidasa y se añade un terminador transcripcional nos en 3' respecto de la secuencia codificadora. La casete de expresión resultante TA29-D-aminoácido-oxidasa-terminador nos se clona luego, se obtiene como un fragmento de restricción adecuado y se clona en un vector binario como en el ejemplo 1. Como en el ejemplo 1, cuando la esterilidad tiene que hacerse condicional tras la aplicación de D-aspartato, D-glutamato o D-fosfinotricina, se prefiere el uso de variantes de D-aminoácido-oxidasa de *Rhodotorula gracilis* con mutaciones en posiciones 213 y/o 238.

Alternativamente, cualquiera de las regiones de las secuencias codificadoras de D-aminoácido-oxidasa se clonan como fragmentos de restricción adecuados (por ejemplo BamH1, Bgl/II, en los que las variantes sintéticas de las secuencias codificadoras se diseñan para eliminar los sitios de restricción internos) y se fusionan con el promotor CaMv 35S y las regiones terminadoras de nopalina-sintasa, mediante inserción (por ejemplo) en el sitio BamH1 del vector binario pROKI (Baulcombe Et al (1986) Nature, 321, 446-449) en una configuración en sentido directo. A continuación, se escinde el fragmento EcoR1-BamH1 que porta la región promotora 35S y se reemplaza con un fragmento EcoR1-BamH1 de pAP30 (Kriete et al. (1996) The Plant Journal 9, 809-818) que lleva el fragmento de la región promotora TA29s (-810 a

+54). Los vectores resultantes se pueden denominar pGKTA29_Q99042, pGKTA29_P80324, pGKTA29_Q9HGY3 y pGKTA29_P24552, etc., según la secuencia de proteína codificada.

5 El material vegetal de tabaco se transforma, vía *Agrobacterium* con el vector y se regeneran plantas transgénicas de forma similar a la descrita en el ejemplo previo. Las plantas producidas son autofértiles pero son condicionalmente masculino-estériles. Se plantan en el terreno semillas de la generación T1. Una vez que las plántulas han crecido hasta un tamaño suficiente, se ensayan mediante PCR para la presencia del transgén. Las plantas positivas para PCR se transfieren al invernadero. Estas plantas son totalmente fértiles en ausencia de precursor de herbicida aplicado exógenamente. Un subconjunto de estas plantas T1, que son, putativamente, condicionalmente estériles, o, 10 alternativamente, plántulas de los eventos T0 (regenerantes directos de transformación) se tratan con D-fosfinotricina, D-alanina, D-leucina, D-metionina, D-asparagina, D-aspartato o D-glutamato en diversas cantidades y en fases del crecimiento variables. Cuando se tratan las plantas T0, se clonan vegetativamente, de forma que los hermanos sin tratar de los eventos se apartan para la producción de semillas. La fertilidad observada se usa entonces como base para seleccionar líneas de plantas adecuadas que presenten el fenotipo de esterilidad condicional más claro. Por ejemplo, 15 estos aminoácidos son D-enantiómeros o, alternativamente, racematos DL. Por ejemplo, se aplican como un pulverizador foliar, previamente o durante las etapas tempranas de formación de la flor, en proporciones usualmente entre 0,25 y 20 kg/ha. Los aminoácidos que pueden eliminarse por cristalización de la solución sobre las hojas, tras la aplicación foliar, se pueden volver a disolver y volverse a movilizar para la absorción por las hojas mediante nuevas aplicaciones de agua en forma de una nebulización de pulverizador. Los aminoácidos se aplican también, por ejemplo, 20 como empape de raíces y, opcionalmente se pueden aplicar además como ~ 50 ml de una solución 10-200 mM que inunda directamente los capullos de las florecillas emergentes.

Se recoge el polen de las plantas tratadas y se ensaya su viabilidad. Se obtienen plantas que producen relativamente poco o ningún polen y/o polen que no es viable. El polen recogido de algunas de las plantas tratadas se ensaya y se encuentra que tiene malformaciones o no es viable. Sin embargo, tales plantas masculino-estériles permanecen 25 femenino-fértiles y producen semilla (híbrida) cuando se polinizan con polen recogido de otras plantas de tabaco sin tratar no transgénicas o condicionalmente femenino-estériles. Las plantas control son transgénicas y no transgénicas, y se cultivan bajo condiciones idénticas a los tratamientos físicos, excepto porque las soluciones de tratamiento son agua, o una concentración equivalente de L-aminoácido puro.

30 De forma análoga al ejemplo 1, en una variante del ejemplo, el aminoácido aplicado es DL-fosfinotricina racémica. En este caso, la construcción de ADN usada para la transformación comprende, además de la secuencia de ADN que codifica la D-aminoácido-oxidasa bajo control de expresión modulable de una región promotora floral masculina específica de tejido, como "TA29", también una secuencia de ADN que codifica un gen de fosfinotricina-N-acetil- 35 transferasa, como el gen "PAT", bajo el control modulable de una región promotora, como la del gen de plastocianina (en este caso la región del gen de plastocianina de *Pisum sativum*). A tiempos y proporciones de pulverización apropiados entre 250 g/ha y 5 kg/ha de DL-fosfinotricina, las plantas tratadas no se dañan visiblemente, pero se vuelven condicionalmente masculino-estériles, mientras que permanecen normales, o cercanas a la normalidad en cuanto a la fertilidad femenina.

40 **Ejemplo 3. Genes quiméricos expresados preferentemente en estructuras reproductivas femeninas y que codifican enzimas capaces de oxidar D-fosfinotricina y/o D-alanina y/o D-leucina y/o D-metionina y/o D-asparagina y/o D-aspartato y/o D-glutamato**

45 Se obtienen secuencias de ADN que codifican la proteína D-aminoácido-oxidasa, según se describe en los ejemplos 1 y 2.

50 El clon genómico pSH64 se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest el 27/02/1998 con NRRL y se le asignó el número NRRL B-21920. Se detectó como un clon genómico que hibridaba con el clon de ADNc específico de la seda B200i4-2 (WO 98/39462). Se construyen genes quiméricos que se expresan preferentemente en estructuras reproductivas femeninas como sigue. Se construyó un plásmido derivado de Bluescript ks, similar a pSH70 que tiene una casete de expresión "vacía", que comprende, de 5' a 3': la región promotora en 5' B200i, que consiste en los nucleótidos 1-3790 de SEQ ID N° 11 de WO 98/39462, un sitio BamH1 y la región terminadora no traducida B200i en 3', que comprende los nucleótidos 4427-6397 de la SEQ ID N° 11 de WO 98/39462, según se describe en WO 98/39462. 55 Usando una digestión parcial con BamH1 o, alternativamente, mediante nuevas etapas de subclonación, PCR y ligamiento, se ligan secuencias codificadoras alternativas de D-aminoácido-oxidasa en la posición del sitio BamH1 o adyacentes al mismo, de forma que están en posición inmediatamente 3' respecto de la región promotora B200i y 5' de la región terminadora B200i. Consecuentemente, se crean una serie de vectores Bluescript pBLB200_Q99042, pBLB200_P80324, pBLB200_Q9HGY3 y pBLB200_P24552, que codifican las casetes alternativas de expresión B200i-D-aminoácido-oxidasa-B200i. 60

Alternativamente, según se describe en WO 98/39462, se escinde un fragmento Pst I/Neo I de la región promotora en 5' del gen P19, del clon genómico X2-1, que se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest el 27/02/1998 en NRRL y al cual se asignó el número de acceso B-21919. El sitio Nco I en el nucleótido 1088 de SEQ ID N° 14 de WO

98/39462 corresponde al inicio de la traducción ATG del gen P19. Usando etapas apropiadas de subclonación, restricción, ligamiento y PCR, este fragmento se liga para formar una fusión en marco de lectura con una u otra de las secuencias de ADN que codifican D-aminoácido-oxidasa y se añade una secuencia terminadora nos en posición 3' respecto de la secuencia codificadora. Consecuentemente, se crea una serie de vectores Bluescript pBLP19_Q99042, pBLP19_P80324, pBLP19_Q9HGY3 y pBLP19_P24552, etc., que codifican las casetas alternativas de expresión P19-D-aminoácido-oxidasa. Alternativamente, usando métodos estándar alternativos, se obtienen plásmidos similares que tienen la región promotora en 5' (que comprende algunos o todos los nucleótidos 1-3987 de SEQ ID N° 2 de WO 98/39462) del gen P26 en lugar de la región promotora de P19. El clon P26-A4 genómico, pCIB10302, depositado bajo los términos del Tratado de Budapest el 21 de enero de 1997 con el n° de acceso NRRL B-21655 de la colección de cultivos de patentes del Agricultural Research Service, se subclona según se describe en WO 98/39462. Consecuentemente, se crea una serie de vectores Bluescript pBLP26_Q99042, pBLP26_P80324, pBLP26_Q9HGY3 y pBLP26_P24552, que codifican las casetas de expresión alternativas P19-D-aminoácido-oxidasa-nos.

Ejemplo 4. Genes quiméricos expresados preferentemente en estructuras reproductivas masculinas y que codifican enzimas capaces de oxidar D-fosfinotricina y/o D-alanina y/o D-leucina y/o D-metionina y/o D-asparragina y/o D-aspartato y/o D-glutamato

Se obtienen secuencias de la proteína D-aminoácido-oxidasa, según se describe en los ejemplos 1 y 2.

El plásmido pGK73 lleva la región promotora TA29s EcoR1-fragmento BamI-II de ~ 810 a +54 (Kriete et al. (1996), 9, 809-818). Este fragmento de restricción o un fragmento similar adecuado generado mediante PCR, se clona, preferiblemente como una fusión en marco, en una posición aguas arriba de la secuencia de ADN que codifica la D-aminoácido-oxidasa, en Bluescript sk. Usando una serie adecuada de etapas de restricción, ligamiento y subclonación, se añade un terminador transcripcional nos en posición 3' respecto de la región codificadora para generar, según la secuencia codificadora, casetas de expresión alternativa del tipo TA29-D-aminoácido-oxidasa-nos, en plásmidos Bluescript sk.

En un ejemplo adicional, se usa la región promotora SGB6 específica de la antera, SEQ ID N° 1 del documento US 5470359. Por ejemplo, pSGBNE1, que contiene un fragmento de EcoR1-Nhe1 genómico subclonado de pSGB6g1 (US 5470359) se subclona nuevamente para colocar un fragmento Apall/Xba1 de 1558 pb con extremos romos en Bluescript ks, en el sitio SmaI. Como anteriormente, mediante nuevas etapas de restricción y clonación, este fragmento se fusiona en marco, aguas arriba de la secuencia codificadora de D-aminoácido-oxidasa. Nuevamente, se añade un terminador nos en 3' respecto de la secuencia codificadora para crear plásmidos Bluescript sk alternativos, que comprenden las casetas de expresión alternativas SGB6-D-aminoácido-oxidasa-nos.

En un grupo similar de ejemplos, la región promotora específica de antera de arroz, RAS (n° de acceso de EMBL/Genbank AP042275; Jean Js et al. (1999) PMB, 39, 35-44) se fusiona también de manera similar en un sitio en marco y aguas arriba de una u otra de las secuencias de ADN que codifican D-aminoácido-oxidasa y un terminador nos en 3', para comprender casetas de expresión alternativos RA8-D-aminoácido-oxidasa-nos en una serie de vectores Bluescript sk.

Ejemplo 5. Un par de construcciones complementarias útiles en un método para proporcionar (a) una línea parental consanguínea femenina, que es condicionalmente masculino-estéril, dependiendo de la aplicación de DL-fosfinotricina y (b) una línea parental consanguínea masculina complementaria, que es condicionalmente femenino-estéril, dependiendo de la aplicación de DL-fosfinotricina.

La primera construcción de ADN adecuada para proporcionar una línea parental consanguínea femenina de plantas de arroz o cereal, que es condicionalmente masculino-estéril, dependiendo de la aplicación de DL-fosfinotricina, comprende tres genes A), B) y C). A) consiste en una secuencia de ADN que codifica una enzima PAT, capaz de N-acetilizar L-fosfinotricina bajo el control modulable de la región promotora de ~ 1 kb del gen de plastocianina de cebada (EMBL Z28347) y una región terminadora adecuada como la del gen nos o 35S, B) consiste en una secuencia codificadora de PAT similar a la primera, pero esta vez bajo el control modulable de una región promotora floral femenina específica de tejido (como P19 o P26, según se describe en el ejemplo 4), más un terminador adecuado; y C) consiste en una secuencia codificadora de DAMOX adecuada, según se describe en los ejemplos 1, 2, 9 y 10, por ejemplo, un mutante de la D-aminoácido-oxidasa de *Rhodotorula gracilis* que tiene una arginina, serina, cisteína, lisina, asparragina o alanina reemplazando la metionina en posición 213 y/o una histidina, serina, cisteína, asparragina o alanina reemplazando la tirosina en posición 238, bajo el control modulable de una región promotora floral masculina específico de tejido (como SGB6 O RA8, según se describió en el ejemplo 5), y una región terminadora adecuada. Esta construcción se ensambla usando métodos que son estándar en la técnica y se describen en los ejemplos previos.

La segunda construcción de ADN adecuada para proporcionar una línea parental consanguínea masculina de plantas de cereal o arroz, que es condicionalmente femenino-estéril dependiendo de la aplicación de DL-fosfinotricina, comprende tres genes A), D) y F). A) consiste en una secuencia de ADN que codifica una enzima PAT capaz de N-acetilizar L-fosfinotricina bajo el control modulable de la región promotora del gen de plastocianina de cebada y una región

terminadora adecuada, como la del gen nos o 35S; D) consiste en una secuencia PAT, similar a la primera, pero esta vez bajo el control modulable de la misma región promotora floral masculina específica de tejido (como SGB6 o RA8, según se usan en el ejemplo 4), que la usada en la construcción 1, más un terminador adecuado; y F) consiste en un gen DAMOX adecuado, según se describió en los ejemplos 1, 2, 9 y 10, y, por ejemplo, que codifica una forma mutante de la D-aminoácido-oxidasa de *Rhodotorula gracilis* que tiene una arginina, serina, cisteína, lisina, asparragina o alanina reemplazando la metionina en posición 213 y/o una histidina, serina, cisteína, asparragina o alanina reemplazando la tirosina en posición 238, bajo el control modulable de una región promotora floral femenina (como P19 o P26, según se describió en el ejemplo 3), según se usa en la construcción 1, y una región terminadora adecuada. Esta construcción se ensambla usando métodos que son estándar en la técnica y se describen en los ejemplos previos.

Un par de construcciones de ADN de este ejemplo contienen, por ejemplo, los siguientes elementos:

Construcción 1

A = región promotora de plastocianina de cebada → secuencia codificadora de PAT, terminador Nos;

B = región promotora P19 → secuencia codificadora de PAT, terminador 35S;

C = región promotora RA8 → aminoácido-oxidasa de *Rhodotorula* (mutante M213R), terminador Nos.

Construcción 2

A = región promotora de plastocianina de cebada → región codificadora de PAT, terminador Nos

B = región promotora RA8 → región codificadora de PAT, terminador 35S;

E = región promotora P19 → región codificadora de D-aminoácido-oxidasa de *Rhodotorula* (mutante M213R), terminador Nos.

Ejemplo 6. Vectores polinucleotídicos para transformación de trigo.

Los ejemplos 3, 4 y 5 describen la construcción de varios genes quiméricos en casetes de expresión que se clonan usualmente en Bluescript sk (por ejemplo, pBLRA8_Q01470, pBLRA8_P37967, pBLRA8_P40363, pBLB200_Q99042, pBLB200_P80324, pBLB200_Q9HGY3 y pBLB200_P24552, etc.). Opcionalmente, estos vectores se preparan a granel para la transformación de ADN directa para uso con un marcador seleccionable bombardeado conjuntamente, como pSOG35 (DHFR/metotrexato) o pUbi-Hyg (higromicina-fosfotransferasa/higromicina), según se describe en WO 98/39462. Preferiblemente, tras la preparación a granel, los vectores se linealizan usando una enzima de restricción adecuada para eliminar el gen de resistencia a ampicilina de Bluescript.

Opcionalmente, mejor que usar bombardeo conjunto, dichos vectores Bluescript se transforman adicionalmente mediante ingeniería genética mediante métodos estándar, de forma que comprendan adicionalmente un gen marcador seleccionable como el gen de resistencia a kanamicina, resistencia a higromicina, resistencia a metotrexato o resistencia a glifosato, y se usan directamente. En algunos de los ejemplos previos, un gen PAT es integral al diseño del vector y, en estos casos, se puede usar opcionalmente DL-fosfinotricina para selección en alguna etapa tras la transformación.

Alternativamente, los casetes de expresión se eliminan en fragmentos de restricción adecuados y se clonan en vectores derivados de pIGPD9 (descrito en la Figura 12 de WO 00/66748). El uso de este vector para transformación evita la transferencia de genes marcadores de antibióticos a la planta, ya que su mantenimiento en la bacteria se basa en la complementación de un mutante de *E. coli* his B auxotrófico. El vector comprende un gen que expresa IGPD (el producto de HisB) y se transforma nuevamente mediante ingeniería genética para que comprenda un gen marcador seleccionable de planta, como un gen EPSPS, clonado en el sitio Xma I como, por ejemplo en pZEN16i y pZEN18i de WO 00/66748. Alternativamente, se usa un gen marcador que proporciona una selección positiva sobre manosa o xilosa (US 5767378).

En ejemplos particulares de uso de vectores pIGPD9, se construyen plásmidos para transformación de trigo. Ejemplos ilustrativos son pZEN18_BLB200_Q99042 y pZEN18_BLRA8_Q01470. Estos son vectores derivados de pIGPD9 que comprenden el gen pZEN18 EPSPS (WO 00/66748) y, en este caso, los casetes de expresión B200i-(Q99042)D-aminoácido-oxidasa-B200i o RA8-(Q01470)carboxilesterasa-nos, respectivamente.

Se obtienen preparaciones de ADN a gran escala para uso en transformación de plantas, usando el procedimiento Maxi-prep (Qiagen), usando los protocolos proporcionados por el fabricante.

Ejemplo 7. Transformación/regeneración de trigo con polinucleótidos que comprenden genes quiméricos expresados preferentemente en estructuras reproductivas masculinas o femeninas, y que codifican enzimas capaces de oxidar D-fosfinotricina y/o D-alanina y/o D-leucina y/o D-metionina y/o D-asparagina y/o D-aspartato y/o D-glutamato

En un ejemplo, se siembran en placa embriones inmaduros (0,75-1,0 mm de longitud) de genotipo UC703, sobre medio MS que contiene 3 mg/l de 2,4-D y sacarosa al 3%. Tras aproximadamente 4 h, los embriones se siembran en placa en medio MS que contiene maltosa al 15%, sacarosa al 3% y 3 mg/l de 2,4-D, cubierto con una capa de agarosa soportada sobre papel de filtro, que contiene los mismos componentes. Los embriones se dejan plasmolizar durante 2-3 h antes del bombardeo.

El ADN preparado según se describe en el ejemplo 6 y en los ejemplos posteriores, se precipita sobre partículas de oro de tamaño micrométrico, usando procedimientos estándar. Cuatro placas diana con 16 embriones por diana se bombardean dos veces con un dispositivo de helio de DuPont Biolistics, usando una presión de estallido de 1100 psi. Las placas se bombardean con una pantalla de trama 80 colocada entre la fase de portador y la diana. Tras el bombardeo, las dianas se colocan en la oscuridad a 25°C durante 24 h antes de que las capas con los embriones se depositen sobre placas de medio MS que contiene sacarosa al 3% y 3 mg/l de 2,4-D. Los embriones individuales se eliminan de las láminas y se colocan directamente en medio recién preparado de la misma composición tras otras 48 h. Aproximadamente 6 semanas después del suministro de genes, el tejido se coloca sobre medio MS con 3 mg/l de 2,4-D, sacarosa al 3% y 0,2 mg/l de metotrexato, durante un período de 3 semanas. El tejido se coloca luego en medio de regeneración que comprende medio MS que contiene 1 mg/l de ribósido de zeatina y 1 mg/l de metotrexato. Tras 2 semanas de regeneración, las plántulas se colocan en contenedores estériles con medio MS de fuerza media que contiene sacarosa al 2%, 1 mg/l de ácido naftil-acético y 4 mg/l de metotrexato.

En particular, se bombardean conjuntamente variantes del ejemplo de los vectores que comprenden genes quiméricos expresados preferentemente en estructuras reproductivas masculinas con genes marcadores seleccionables alternativos. Así, por ejemplo, se prepara ADN de plásmidos como pBLRA8_P24552 (que expresa una D-aminoácido-oxidasa) bajo el control modulable de la región promotora RA8 y se reviste sobre partículas de oro junto con pUbiHyg (un plásmido que codifica higromicina-fosfotransferasa bajo el control modulable del promotor de poliubiquitina de maíz). En este caso, la transformación y regeneración se realiza según se describió anteriormente excepto porque, a continuación del bombardeo, el medio de regeneración contiene concentraciones crecientes de higromicina entre 2 y 20 mg/l.

En un ejemplo adicional, el trigo se transforma con pZEN18_BLB200_Q99042, seleccionado usando glifosato y regenerado según se describe en el ejemplo 15 de WO 00/66748.

Se extrae ADN de tejidos de hojas de plantas derivados de transformación y se realiza la PCR para la presencia del gen marcador seleccionable y del gen que codifica la D-aminoácido-oxidasa. Las plantas positivas para PCR se propagan. Durante la floración, se recogen los pistilos y anteras y se prepara ARN. La expresión de ADN se confirma mediante análisis de Northern. Además, los genes de D-aminoácido-oxidasa se expresan usando vectores pET en *E. coli* y se purifican parcialmente. Las bandas proteicas de la proteína expresada se obtienen por corte de un gel SDS y se usan para generar anticuerpos policlonales. Estos anticuerpos se usan para detectar la expresión en tejidos florales y otros tejidos mediante análisis de Western.

Ejemplo 8. Se aplica un método de producción eficiente de cultivos de cereal híbrido en los que se aplica DL-fosfinotricina para control de malas hierbas y, al mismo tiempo, como sustancia química hibridante, y en el que la generación híbrida F1 de plantas resultante de semilla híbrida así producida es sustancialmente tolerante, tanto vegetativa como reproductivamente, a la aplicación de DL-fosfinotricina.

Las sustancias hibridantes químicas son caras. Sería deseable usar una sustancia relativamente barata, como un herbicida comercial, como hibridante químico. Esto lograría también mayor eficiencia, ya que el control de las malas hierbas se podría combinar con la hibridación química. Sin embargo, existen diversos problemas a solventar a fin de lograr este propósito. Primeramente, se necesitaría establecer líneas parentales masculina y femenina que sean tolerantes al herbicida en cuestión. Además, a fin de lograr la fertilidad "condicional" deseada en respuesta a la aplicación del herbicida, se necesitaría que las dos líneas se transformen por ingeniería genética de tal forma que la tolerancia al herbicida no se extienda a todos los tejidos, sino que se exprese en un tejido de forma específica, de manera que cada uno de los tejidos florales requeridos permanezca susceptible selectivamente. Por tanto, en una línea (la línea parental femenina), el grueso de la planta más el tejido femenino se tiene que volver tolerante, mientras que alguna parte crítica del tejido floral femenino tiene que permanecer susceptible a la aplicación, mientras que en la otra (la línea parental masculina), se precisa lo contrario, permaneciendo susceptible sólo alguna parte crítica del tejido formador de gametos femeninos. Incluso aunque esto se pudiese conseguir, queda un problema adicional por solventar respecto a la semilla híbrida y a la producción de F1. Dado que esta generación del cultivo contendría, necesariamente, al menos dos genes capaces de conferir resistencia al herbicida, sería deseable que este mismo herbicida pudiese usarse para el control de las malas hierbas en el cultivo. Sin embargo, es muy difícil concebir una combinación de

herbicidas, regiones promotoras específicas de tejido y genes de tolerancia que permita este uso del mismo herbicida en la generación F1. Sería probable que el cultivo híbrido presentase tolerancia vegetativa, pero poco o ningún rendimiento de grano, tras la aplicación de herbicida a la generación F1. Por ejemplo, para el herbicida glifosato, el mecanismo usual de resistencia es la expresión de una forma resistente de EPSP-sintasa. Es difícil identificar una región promotora o combinación de regiones promotoras que permita una expresión suficiente de un R-EPSPS en todos los tejidos y momentos distintos de, digamos, una etapa crítica en el desarrollo de los estambres o estigmas. La forma más directa a este respecto sería usar un enfoque antisentido o similar, en el que la expresión del R-EPSPS esté dirigida por un promotor inespecífico de tejido/constitutivo y suprimido sólo local y transitoriamente, por ejemplo, en los estambres, debido a la expresión de un gen EPSPS antisentido (véase por ejemplo WO 9946396). Sin embargo, en este caso la supresión de expresión en el estambre (o estigma) estaría dirigida por un gen dominante. Está claro que, para cualquier mecanismo de este tipo, la aplicación del herbicida a la generación F1 produciría un cultivo estéril, no productivo, debido a los efectos aditivos de los genes de esterilidad condicional dominantes masculinos y femeninos.

La presente invención proporciona un método para solventar el problema de permitir el uso de un herbicida comercial barato, DL-fosfinotricina, como control de malas hierbas y sustancia hibridante en la producción de cereales híbridos y, proporcionando tal método además, cereales o arroz híbridos resultantes, en el que se puede usar DL-fosfinotricina (o L-fosfinotricina) de forma segura para el control de malas hierbas sin pérdida sustancial de rendimiento. Como ventaja adicional, la semilla homogénea de la generación F1, que puede crecer más tarde como planta de regeneración natural en cultivos posteriores, será más fácil de manejar ya que, será por sí misma generalmente estéril si se pulveriza con cantidades controladas de DL-fosfinotricina. Lo mismo ocurrirá con la progenie del polen entrecruzado de las plantas F1 para malas hierbas (p.ej. arroz rojo) u otros cereales. La presente invención proporciona genes y enzimas que convierten un componente no fitotóxico, D-fosfinotricina, de una formulación de DL-fosfinotricina de herbicida comercial, en la forma L activa. El gen PAT, que convierte L-fosfinotricina en N-acetil-L-fosfinotricina es conocido y se usa comercialmente para proporcionar tolerancia a DL-fosfinotricina en cultivos. Una observación adicional crítica que guarda relación con el presente ejemplo es que, sorprendentemente, se descubrió que el trigo que contenía el gen PAT bajo el control de expresión modulable de la región promotora de plastocianina de cebada, es sustancialmente tolerante reproductivamente a la aplicación de DL-fosfinotricina en proporciones de al menos 2 kg/ha. Por tanto, una característica crítica de las construcciones descritas en el ejemplo 5, que se usan para proporcionar las plantas del presente ejemplo, es que el gen PAT, que proporciona la característica de resistencia, se expresa bajo el control modulable de una región promotora que proporciona la expresión sustancialmente sólo en los tejidos verdes. Una característica de tal región promotora útil es que debería expresar PAT de tal forma que proteja adecuadamente todos los tejidos florales no verdes de la DL-fosfinotricina aplicada foliarmente, mientras que proporcione, al mismo tiempo, sólo un nivel mínimo de expresión de PAT en el tejido floral propiamente dicho, y especialmente baja en aquellas partes a las que se dirige la esterilidad condicional. Con PAT expresado bajo el control de la región promotora de plastocianina de cebada, esta condición parece cumplirse, ya que sustancialmente toda la L-fosfinotricina que se pulveriza entra vía las hojas, se intercepta y se convierte en N-acetil-L-fosfinotricina no tóxica, antes de ser translocada a los tejidos florales en desarrollo. Por tanto, en la presente invención, la L-fosfinotricina que produce los efectos de esterilidad selectiva de tejido en las líneas parentales, se genera sólo transitoria y localmente de D-fosfinotricina no fitotóxica móvil a través del floema, vía D-aminoácido-oxidasa. Asociando exactamente los elementos de control florales que dirigen la expresión de PAT con aquellos elementos que dirigen la expresión de la D-aminoácido-oxidasa en el par complementario de construcciones (ejemplo 5), se asegura que, en el híbrido de F1, la explosión transitoria de L-fosfinotricina en el tejido floral diana sea rápidamente neutralizada por una explosión correspondiente de la expresión de PAT al mismo tiempo y en el mismo tejido local. Por tanto, la aplicación del herbicida induce un efecto de no esterilidad en el híbrido. Sin embargo, en las generaciones siguientes, el PAT y la D-aminoácido-oxidasa floralmente correspondientes del híbrido, se segregarán y por tanto, una vez más, las plantas resultantes serán masculino- o femenino-estériles tras la aplicación de cantidades controladoras de DL-fosfinotricina.

Usando los métodos descritos en los ejemplos 6 y 7, las construcciones descritas en el ejemplo 5 se transforman en trigo o (usando métodos de vectores superbinarios estándar) arroz, que se selecciona y regenera en plántulas. Usando métodos esencialmente como los descritos en los ejemplos 1 y 2, se seleccionan los eventos transformantes de T0 (usando propagación clonal de retoños para mantener las líneas sin tratar) y eventos adecuados para reproducir, alternativamente, líneas parentales consanguíneas masculinas que son condicionalmente femenino-estériles, dependientes de la aplicación de DL-fosfinotricina o líneas consanguíneas femeninas que son condicionalmente masculino-estériles, dependientes de la aplicación de DL-fosfinotricina. Las mejores líneas presentan la mejor tolerancia a herbicida, mínima pérdida de rendimiento, el fenotipo más claro de esterilidad condicional, etc. Se seleccionan las líneas parentales alternativas masculina y femenina y, opcionalmente, se retrocruzan en líneas de élite adecuadas durante varias generaciones. Los insertos genéticos en estos eventos seleccionados finalmente están totalmente caracterizados como lo está la genética de la herencia de las características de fertilidad condicional y resistencia a herbicida, y las características de los productos génicos expresados.

Las líneas parentales femenina y masculina así seleccionadas, se plantan entonces juntas de forma intercalada, en proporciones adecuadas en un terreno, y se pulverizan con DL-fosfinotricina en una proporción adecuada entre 0,05 y 5 kg/ha y a un ritmo hasta el período de floración temprana, seleccionado para optimizar la producción de semilla híbrida. La semilla así producida tiene la ventaja de que originará plantas que no se benefician sólo del vigor de los híbridos,

sino que son también tolerantes a las formulaciones herbicidas que contienen DL-fosfotricina, que pueden usar, por tanto, para el control de las malas hierbas. La semilla híbrida tiene también la ventaja de que el rasgo de tolerancia a herbicida que expresa sólo se transmitirá de forma incompleta a las generaciones homogéneas futuras o exocruzadas con malas hierbas relacionadas. Por tanto, por ejemplo, el arroz híbrido resultante de esta invención se puede cultivar usando DL-fosfotricina como sustancia de control de malas hierbas, sin pérdida significativa de rendimiento. Sin embargo, las generaciones futuras de plantas de arroz rojo que se generen como la progenie procedente del exocruzamiento de arroz híbrido con genitores femeninos de arroz rojo, serán tolerantes vegetativamente al tratamiento con DL-fosfotricina, pero tienen autofertilidad reducida (debido a la expresión de una D-aminoácido-oxidasa en el tejido floral) y, por tanto, producen poco grano. Por tanto, usando el arroz híbrido de la presente invención, se puede usar DL-fosfotricina para el control de las malas hierbas con un riesgo futuro muy reducido de contaminación del grano con arroz rojo, como resultado de que el rasgo de resistencia a herbicida se haya exocruzado hacia el arroz rojo, estrechamente relacionado. De forma similar, las plantas de regeneración natural de la segunda generación, que se generan del cultivo híbrido, no producirán grano, en su mayor parte, tras pulverización con DL-fosfotricina.

Ejemplo 9. Mutagénesis dirigida para generar genes que codifican D-aminoácido-oxidasas que oxidan D-fosfotricina.

Este ejemplo se refiere a la producción de genes que codifican variantes de D-aminoácido-oxidasa de *R. gracilis* que tienen una capacidad mejorada para oxidar D-fosfotricina. Estos genes se usan en realizaciones preferidas de la invención, descritas en los otros ejemplos, en las que la esterilidad se hace condicional tras la aplicación de D-fosfotricina. En el presente ejemplo, estos genes codifican enzimas que tienen un único cambio de aminoácido en la posición "213" y/o en la posición "238". La metionina en posición "213" se identifica como M en el motivo de la secuencia de la proteína nativa RCTMDSS. La tirosina en posición 238 se identifica como la "Y" en el motivo de la secuencia de la proteína nativa GGTYGVG. Hay muchos enfoques conocidos en la técnica para proporcionar una serie de genes que codifican una serie de variantes de D-aminoácido-oxidasa con cambios de aminoácido en una o ambas de estas posiciones. La elección del ADN molde para la mutagénesis depende también del uso. Así, por ejemplo, cuando el uso al que se destina el gen mutante es para expresión en plantas, entonces un punto de partida adecuado es un ADN sintético que codifica una D-aminoácido-oxidasa de *R. gracilis*, como SEQ ID N° 7. Por otra parte, cuando el uso inmediato al que se destina el gen mutante es para rondas posteriores de mutagénesis y mejora en un sistema de selección basado en levaduras (como en el ejemplo 10), entonces la secuencia de ADN nativa (opcionalmente mejorada para expresión en *S. cerevisiae*) es más adecuada.

Un método preferido para proporcionar variantes adecuadas de D-aminoácido-oxidasa de *R. gracilis* es a través del uso de oligonucleótidos degenerados, usando el kit de mutagénesis Quickchange de Stratagene. Los métodos se usan según las instrucciones del fabricante.

Por ejemplo, (en el caso en el que la secuencia de ADN nativa de *R. gracilis* que codifica D-aminoácido-oxidasa sea el molde de ADN para mutagénesis), parejas de oligonucleótidos degenerados "inicial" (RGMUTTOP) y "final" (RGMUTBOT) pueden tener de forma adecuada 50-250 nucleótidos de longitud y estar diseñadas para comprender en su seno, regiones de secuencia como sigue:

RGMUTTOP comprende una secuencia (SEQ ID N° 8)

tcccatgcaagcgatgcacgNNNgactcgccgaccccgctctcccgcctacatcattccccgaccaggigcggaagtcctcgcggggacgNNNggcgtgggagactgggactg.

RGMUTBOT comprende una secuencia (SEQ ID N° 9)

caagtcccagtcctccacgccNNNcgtcccgcgcagatgacttcgccactggtcggggaatgatgtaggcgggagaagcggggctcgacgagtcNNNcgtgcatcgtcatgggga.

Además, estos dos oligonucleótidos RGMUTTOP y RGMUTBOT comprenden en cada extremo secuencias que, una vez que los dos oligonucleótidos están hibridados entre sí, constituyen extremos 5' y 3' que se corresponderán exactamente con los extremos creados cuando el molde de ADN se corta en un par adecuado de sitios de restricción únicos (es decir, diseñados de forma que los oligonucleótidos hibridados pueden reemplazar un fragmento de restricción único cortado del ADN molde que codifica la D-aminoácido-oxidasa).

Se transfieren 0,5 a 1,0 µg de cada oligonucleótido a un tubo de centrifuga de Eppendorf de 0,5 ml y se calienta a una temperatura adecuada (p.ej., 94 °C, dependiendo de los puntos de fusión calculados), durante 5 minutos, y se hibrida lentamente enfriando hasta temperatura ambiente. El ADN molde (por ejemplo el vector transportador de levadura pYES6/CT) se corta entonces con dos enzimas de restricción (según los dos únicos sitios de restricción en el ADN molde que abarcan la región que incluye los dos codones a reemplazar y que caracterizan los extremos del ADN hibridado), se purifica en gel, se liga con el oligonucleótido hibridado y se transforma en levadura como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 19, de forma que las D-aminoácido-oxidasas alternativas, creadas por mutagénesis, se expresan

5 en levadura. Luego, según se describe, se seleccionan los clones de levadura que producen el mejor rendimiento en análogos de D-fosfinotricina (como ácido D-homocistéico) o en D-fosfinotricina (cuando se coexpresa el gen PAT) como única fuente de nitrógeno, como aquéllos que contienen las secuencias que codifican una variante de D-aminoácido-oxidasa con las propiedades deseadas. Alternativamente, la expresión de D-aminoácido-oxidasa se realiza en algún microorganismo distinto de levadura y, por ejemplo, bajo el control de expresión del promotor t7 de un vector pET en un lisógeno de *E. coli*. En este caso, tras la transformación, se pueden recoger colonias individuales, sembrar réplicas en placa, cultivar, inducir, lisar y seleccionar para la actividad de sustrato deseada frente a D-fosfinotricina, usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, una selección fluorimétrica para generación de peróxido o un ensayo colorimétrico para generación de amoníaco). Los clones de levadura u otros microorganismos así seleccionados se cultivan, se prepara ADN y se clona la secuencia de ADN completa de D-aminoácido-oxidasa vía corrección de pruebas por PCR y clonación en pCRBluntII, usando el kit Zero Blunt TOPO de Invitrogen. Se determinan las secuencias codificadoras de D-aminoácido-oxidasa que caracterizan los clones seleccionados. Estas secuencias codificadoras de D-aminoácido-oxidasa se subclonan nuevamente para expresión en un vector pET (p.ej. Novagen pET 24a), y se transforman en *E. coli* BL21 DE3. Las células se cultivan en un fermentador en medio LCM50 que contiene 100 µg/ml de kanamicina, se inducen con IPTG, se recogen, se rompen y el extracto se purifica parcialmente y se ensaya para actividad D-aminoácido-oxidasa (según se detalla más adelante). Se seleccionan genes de D-aminoácido-oxidasa que codifican enzimas D-aminoácido-oxidadas que producen una estabilidad aceptable y la actividad más elevada (kcat/Km) por mg de proteína pura frente a D-fosfinotricina a pH 7,0.

20 Adicionalmente, se genera una serie de secuencias de ADN particulares, que codifican enzimas D-aminoácido-oxidasa particularmente dirigidas a diana. En particular, genes que codifican D-aminoácido-oxidasa de *Rhodotorula gracilis* con una arginina, serina, cisteína, lisina, asparragina o alanina reemplazando la metionina en posición 213 y/o una histidina, serina, cisteína, asparragina o alanina reemplazando la tirosina en posición 238. Los métodos usados son los mismos que los descritos anteriormente, excepto porque, más que una mezcla de oligonucleótidos, se diseñan pares individuales de oligonucleótidos, y se usan para efectuar cada cambio sencillo o doble de aminoácidos. Cada secuencia codificadora de D-aminoácido-oxidasa mutante resultante se clona para expresión (no etiquetada) detrás del promotor T7 en Pet 24A de Novagen, y se transforman en *E. coli* BL21 DE3. Las células se cultivan en un fermentador de 1,0 l, en medio LCM50 complementado con 100 µg/ml de kanamicina, se inducen para expresión con IPTG 1 Mm y se recogen mediante centrifugación a baja velocidad.

30 El medio LCM5 contiene (en 1 litro)

35 KH₂PO₄ (3 g), Na₂HPO₄ (6 g), NaCl (0,5 g), hidrolizado de caseína (Oxoid) (2 g), (NH₄)₂SO₄ (10 g), extracto de levadura (Difco (10 g), glicerol (35 g) (estos ingredientes se obtienen en solución y se esterilizan en autoclave). Los siguientes ingredientes adicionales se esterilizan por filtración en forma de soluciones y se añaden a los medios: MgSO₄ (2,5 ml de solución 246,5 mg/ml), Tiamina.HCl (1 ml de solución 8 mg/ml); CaCl₂.2H₂O (0,2 ml de solución 147 g/l); *FeSO₄.7H₂O/ácido cítrico de reserva (2 ml); **elementos traza en solución (5 ml), y se completa hasta 1 litro.

40 *FeSO₄.7H₂O/solución de reserva de ácido cítrico por 100 ml consiste en FeSO₄.7H₂O (0,415 mg), ácido cítrico (0,202 mg).

45 ** La composición de la solución de elementos traza por 1 ml es AlCl₃.6 H₂O (20 mg), CoCl₂.6 H₂O (8 mg), KCo(SO₄)₂.12 H₂O (2 mg), CuCl₂.H₂O (2 mg), H₃BO₃ (1 mg), KI (20 mg), MnSO₄.H₂O (0,8 mg), Na₂MoO₄.2H₂O (4 mg), ZnSO₄.7H₂O (4 mg).

50 Se lavan en agua aproximadamente 7 g de peso húmedo de células. Las células se vuelven a suspender en un volumen igual de tampón KOH/Mops 50 mM a pH 7,0, que contiene EDTA 2 mM, DTT 2 mM y FAD 0,01 mM. Las células se ponen en suspensión uniformemente usando un homogeneizador de vidrio y luego se disgregan usando una cabeza golpeadora del disgregador Basic Z cell de Constant Systems (BudBrooke Rd., Warwick, U.K.), a 93.079 KPa. El extracto bruto se mantiene frío (~ 4 °C), se centrifuga a 30.000 gav durante 1 h y se desecha el pellet. Algo de la proteína extraída se corre sobre un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie y, mediante comparación lado a lado con extractos de células preparados de forma similar que contienen sólo vector pET "vacío" se estima que 2-50% de la proteína soluble total en el extracto es D-aminoácido-oxidasa. Algo de la proteína extraída se intercambia en tampón Mops/KOH 50 mM a pH 7,0 que contiene FAD 0,01 mM. Ésta se diluye con el mismo tampón en una célula de electrodo de oxígeno estándar (calibrada a 25 °C entre cero y una concentración de oxígeno saturada). Opcionalmente, la D-aminoácido-oxidasa se purifica nuevamente usando intercambio de iones, fenil-sefarosa, precipitación fraccionada en sulfato amónico y filtración en gel. Los ensayos, a 25 °C, se inician mediante adición de una solución 200 mM de la sal de amonio de DL-fosfinotricina a la enzima diluida. El volumen de reacción final en la célula del electrodo de oxígeno es 2 ml. Se miden las proporciones de consumo de oxígeno (tras eliminación de cualquier deriva en la línea de bases). La forma mutante M213R (sustitución de arginina por metionina) de la D-aminoácido-oxidasa de *R. gracilis* oxida la DL-fosfinotricina en una proporción de ~14 nmol/min/mg de proteína del extracto bruto (siendo la pureza estimada de la D-aminoácido-oxidasa en el extracto de 35 +/- 15% de la proteína total). La forma mutante M213S (sustitución de arginina por metionina) de la D-aminoácido-oxidasa de *R. gracilis* oxida la DL-fosfinotricina en una proporción de ~4 nmol/min/mg de proteína del extracto bruto (siendo la pureza estimada de la D-aminoácido-oxidasa en el extracto de 35 +/- 15% de la

proteína total). En experimentos de control, la forma L pura no se oxida nada y, dependiendo de la concentración, la forma D pura se oxida hasta dos veces la proporción en que se oxida la forma DL. Bajo condiciones similares, la D-aminoácido-oxidasa de *R. gracilis* nativa (sin mutar), no presenta ninguna capacidad significativa (<0,4 nmol/min/mg) de oxidar DL- o D-fosfinotricina.

Ejemplo 10. Mutación y selección para generar genes de D-aminoácido-oxidasa que codifican enzimas con especificidad mejorada (kcat/Km) para la oxidación de D-fosfinotricina.

La secuencia que codifica D-aminoácido-oxidasa nativa de *Rhodotorula gracilis* se clona en el vector portador pYES6/CT de Invitrogen, como un fragmentos HindIII/PmeI, aguas abajo del promotor GAL1. de forma similar, la secuencia que codifica la D-aminácido-oxidasa nativa de *Rhodotorula*, se clona en el vector portador de expresión de proteína pAUR123 (Panvera) como un fragmento XbaI, aguas abajo del promotor constitutivo ADH1. La construcción de estos vectores se realiza en *E. coli*, seguida de transformación en *Saccharomyces cerevisiae* S288C. Cuando sea apropiado, el gen PAT se usa para reemplazar los genes de resistencia a antibióticos blastidina o aureobasidina en los vectores pYES6/CT/pAUR123, respectivamente, y la DL-fosfinotricina, mejor que el antibiótico, se usa para mantener la selección. Además, las secuencias que codifican los genes M213R o M213S, o M213S, Y238S o las formas mutantes de D-aminoácido-oxidasa de *Rhodotorula*, se clonan en lugar de la secuencia que codifica la forma silvestre.

Se crean variantes mutantes adicionales de D-aminoácido-oxidasa, usando varios métodos de mutagénesis. Por ejemplo, se generan múltiples variantes de la secuencia que codifica D-aminoácido-oxidasa, mediante PCR envenenada con Mn²⁺, la población mixta se clona frente a los promotores GAL1 o ADH1 de los dos vectores portadores, se transforma en levadura y se realiza la selección basada en la capacidad de la nueva secuencia para conferir a la levadura la capacidad de crecer en ácido D-homocistéico como única fuente de nitrógeno. Alternativamente, la mutación y selección se realiza directamente sobre la levadura transformada. Por ejemplo, se cultivan levaduras transformadas con los plásmidos anteriores en un fermentador, en presencia de un mutágeno químico como EMS, en un medio de cultivo con nitrógeno limitado, que contiene ácido D-homocistéico 10-50 mM o (en caso de que se exprese el gen PAT), DL-fosfinotricina 20-100 mM, y se inducen para expresión de D-aminoácido-oxidasa (p.ej., cultivando sobre galactosa como fuente de carbono). Tras sucesivos subcultivos, se identifican los subcultivos que crecen en ácido D-homocistéico o fosfinotricina como única fuente de N, se siembran en placa, y las secuencias que codifican D-aminoácido-oxidasa se subclonan, se secuencian y se expresan en *E. coli* para su caracterización posterior.

En un método preferido adicional, se realiza mutagénesis en los dos vectores portadores usando amplificación y paso a través de la cepa XL-1-red de *E. coli*. Esta cepa es deficiente en tres vías de reparación principales de ADN, mut S, mut D y mut T. Esto produce un incremento de ~ 5000 veces en la proporción de mutación durante la replicación del ADN. El protocolo usado es de Stratagene. Por ejemplo, se transforman 10 ng de vector portador en la cepa XL1-red de *E. coli*, las células se cultivan y luego se siembran en placa sobre caldo de cultivo de L-agar que contiene ampicilina, durante 24 h. De cada placa se reúnen lotes de colonias de >200 transformantes, eliminando por raspado las colonias de la placa en el caldo de cultivo L y, luego, se cultivan en diluciones 1/100 y 1/1000, y se subcultivan sucesivamente en caldo L/ampicilina a 37°C, durante 1-2 semanas, de forma que se haya producido un gran número de divisiones celulares. Se realiza un procedimiento similar partiendo de diversas placas. Se preparan minipreparaciones de ADN del vector portador a partir de células cultivadas durante la noche y transformadas de nuevo en levadura. Las levaduras transformadas se cultivan y se seleccionan las colonias que contienen D-aminoácido-oxidasas mejoradas, según se describió anteriormente.

Alternativamente, se realiza la expresión y selección de D-aminoácido-oxidasa en algunos microorganismos distintos de la levadura y, por ejemplo, bajo el control de expresión del promotor t7 de un vector pET en un lisógeno de *E. coli*. En este caso, la secuencia que codifica la D-aminoácido-oxidasa (opcionalmente mutagenizada mediante PCR) se clona en un vector pET, se transforma en *E. coli* XL1red y, tras el paso por varias generaciones, se transforma de nuevo en un lisógeno de *E. coli*, como *E. coli* BL212 DE3. Las colonias individuales se pueden recoger a continuación, sembrarse réplicas en placa, cultivarse, inducirse con IPTG, lisarse y escrutarse para la actividad de sustrato deseada frente a D-fosfinotricina, usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, un cribado fluorimétrico para generación de peróxido o un ensayo colorimétrico para generación de amoníaco).

Alternativamente, se realiza la mutagénesis y selección para las secuencias que codifican D-aminoácido-oxidasa mejorada, directamente en *Rhodotorula gracilis*. Se cultiva *R. gracilis* en medio mínimo con D-alanina o D-glutamato como única fuente de nitrógeno, se somete a sucesivas series de mutagénesis con EMS y selección mediante cultivo en medios de condiciones de rigor creciente, en los que la única fuente de nitrógeno varía de D-glutamato hasta ácido D-homocistéico. En una variante de este ejemplo, la *Rhodotorula gracilis* se transforma con uno de los vectores de levadura descritos anteriormente, de forma que expresa PAT (bien cuando se cultiva en galactosa o constitutivamente), y la etapa final de selección rigurosa se realiza sobre DL-fosfinotricina o D-fosfinotricina como única fuente de nitrógeno.

Opcionalmente, los medios usados para selección de levadura contienen una baja concentración de disolvente (p.ej., DMSO al 0,1%).

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Syngenta Limited
 <120> Método para producir selectivamente plantas estériles masculinas o femeninas.
 <130> PPD50695

10 <160> 11
 <170> PatentIn versión 3.1

15 <400> 1
 <400> 2

20 <210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Cebador

<400> 5
 aactgcagct ttttggttag cgaatgc 27

30 <210> 6
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 cagactagtt ttagctaatt tctttaagta aaaac 35

40 <210> 7
 <211> 1107
 <212> DNA
 <213> Rhodotorula gracilis

<400> 7

atgggatccc aaaagagggg tgtgggtgctg ggttccggcg tgataggact cagctccgcg 60
 ettataacttg cccggaaggg gtactccgtc cacatcctgg cccgggacct cccagaggat 120
 gttagctcac agaccttcgc gtccccttgg gctggagcca actggacccc ttttatgacc 180
 ctcaactgacg gcccgaggca ggcaaagtgg gaggagtcta cattcaagaa gtgggtggaa 240
 cttgtgceaa cggggcatgc catgtggttg aagggaacca ggcgtttcgc ccaaaatgag 300
 gacggactgc tcggtcactg gtacaaagat atcaccocca attatagacc cttgccctct 360
 tccgaatgtc caccaggcgc tattggcgtg acttatgaca cattgtcagt gcacgctcca 420
 aagtactgcc aatacctcgc aaggagctc cagaagctgg gggcgacatt cgagcgccgc 480
 accgttactt ccctcgagca agcttttgat ggggctgacc tcgtcgtaa cgcgacgggg 540
 ctgggtgcca agtccatcgc tggcatcgat gaccaggcgg ccgagcctat tcgcggtcaa 600
 acggtgctcg tcaagtgcc ctgcaaaagg tgtactatgg acagctcgga cccggcatca 660
 ccggcgtaca tcatcccgcg gccaggaggc gaagtgattt gcggcggtac gtacggggtc 720
 ggagactggg atctctcggg caaccagag accgtccagc gcatcctcaa aactgcctg 780
 cgcctggatc cgactatttc ttcggacggc acaatcgaag gcatcgaggt gctgoggcat 840
 aacgtcggac tcagaccggc gaggagggga ggccctcgcg ttgaagccga gaggattggt 900
 cttccacttg acagaacgaa gagccccctc tcaactgggccc gtgggagcgc tcgtgcggcc 960
 aaggagaagg aggtgacttt ggtgcatgcc tacggtttct ccagcgtggt ctatcaacag 1020
 tcttggggcg cagccgaaga cgtcgcacaa ttggtcgatg aggcgtttca gaggatcat 1080
 ggggccgccc gcgagtctaa gctctga 1107

5 <210> 8
 <211> 120
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

15 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (22)..(22)
 <223> Donde n = a, t, c o g.

20 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (23)..(23)
 <223> donde n = a, t, c o g.

<220>

<221> característica miscelánea
 <222> (24)..(24)
 <223> Donde n = a, t, c o g.
 <220>
 5 <221> característica miscelánea
 <222> (97)..(97)
 <223> Donde n = a, t, c o g.
 <220>
 10 <221> característica miscelánea
 <222> (98)..(98)
 <223> Donde n = a, t, c o g.
 <220>
 15 <221> característica miscelánea
 <222> (99)..(99)
 <223> Donde n = a, t, c o g.
 <400> 8
 tccccatgca agcgatgcac gnnngactcg tccgaccccg cttctcccgc ctacatcatt 60
 ccccgaccag gtggcgaagt catctgcggc gggacgnnng gcgtgggaga ctgggacttg 120
 <210> 9
 <211> 120
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 30 <221> característica miscelánea
 <222> (22)..(22)
 <223> Donde n = a, t, c o g.
 <220>
 35 <221> característica miscelánea
 <222> (23)..(23)
 <223> Donde n = a, t, c o g.
 <220>
 40 <221> característica miscelánea
 <222> (24)..(24)
 <223> Donde n = a, t, c o g.
 <220>
 45 <221> característica miscelánea
 <222> (97)..(97)
 <223> Donde n = a, t, c o g.
 <220>
 50 <221> característica miscelánea
 <222> (98)..(98)
 <223> Donde n = a, t, c o g.
 <220>
 55 <221> característica miscelánea
 <222> (99)..(99)
 <223> Donde n = a, t, c o g.
 <400> 9

caagtcaccag tctcccacgc cnnnegtccc gccgcagatg acttcgccac ctggtcgggg 60

aatgatgtag gcgggagaag cggggtcgga cgagtcnnc gtgeatcgct tgcattggga 120

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Motivo

Arg Cys Thr Met Asp Ser Ser

1 5

10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Motivo

<400> 11

20

<400> 11

Gly Gly Thr Tyr Gly Val Gly

1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de producción de plantas masculino- o femenino-estériles, que comprende la etapa de transformar material vegetal con un polinucleótido que codifica al menos una enzima que reacciona con una sustancia no fitotóxica para producir una fitotóxica, y regenerar el material así transformado en una planta, en el que dicha sustancia no fitotóxica se aplica a la planta hasta el momento de la formación y/o maduración del gameto masculino o femenino, de forma que la sustancia no fitotóxica origina la producción de una fitotóxica que evita selectivamente la formación de los gametos, o bien los vuelve no funcionales, en el que la enzima se expresa en estructuras reproductivas masculinas o femeninas, caracterizado por que: (i) la sustancia no fitotóxica es un D-alfa-aminoácido y (ii) la enzima es una D-aminoácido-oxidasa.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha sustancia no fitotóxica se aplica mezclada junto con otra sustancia adicional, que se selecciona del grupo que consiste en protectores, gametocidas, inductores de glutatión-S-transferasa, inductores de citocromo P450, herbicidas, fertilizantes, nematocidas, sinergistas, fungicidas, hormonas, reguladores del crecimiento vegetal e inhibidores del citocromo P450.
- 15 3. Método según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la sustancia no fitotóxica se aplica foliarmente y es un sustrato oxidable, metabólicamente estable, de la enzima, móvil a través del floema, en el que la enzima proporciona el producto fitotóxico, como producto directo o indirecto de la sustancia no fitotóxica.
- 20 4. Método según la reivindicación precedente, en el que el producto fitotóxico es un producto indirecto, producido en forma de anión peróxido y/o superóxido.
- 25 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que la sustancia no fitotóxica es un D-alfa-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-alanina, D-valina, D-metionina, D-serina, D-leucina y D-isoleucina, y dicha enzima es una D-aminoácido-oxidasa que oxida dicho aminoácido hasta un 2-ceto-ácido, con reducción concomitante de oxígeno hasta un anión peróxido.
- 30 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que la sustancia no fitotóxica es D-aspartato o D-glutamato y dicha enzima es una D-aminoácido-oxidasa que oxida dicho aminoácido hasta un 2-ceto-ácido, con reducción concomitante de oxígeno hasta anión peróxido.
- 35 7. Método según la reivindicación precedente, en el que la enzima es una D-aminoácido-oxidasa mutante, obtenible de *Rhodotorula gracilis*, la cual comprende sustituciones en las posiciones 213 y/o 238, cuando se compara con la secuencia de tipo silvestre, o es una D-aspartato-oxidasa.
- 40 8. Método según la reivindicación precedente, en el que la oxidasa obtenible de *Rhodotorula* tiene en posición 213 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys, ser, Cys, Asn y Ala, y/o en posición 238 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Ser, Cys, Asn y Ala.
- 45 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que la enzima se dirige a otro punto distinto del peroxisoma.
- 50 10. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la enzima es una D-aminoácido-oxidasa y la sustancia no fitotóxica es el enantiómero D de fosfotricina o el enantiómero D de bialafos.
- 55 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la sustancia no fitotóxica está comprendida en una mezcla, que contiene una sustancia no fitotóxica, y en el que la enzima es una D-aminoácido-oxidasa, que es capaz de oxidar un aminoácido hasta 2-ceto-ácido con reducción concomitante de oxígeno hasta anión peróxido.
- 60 12. Método según la reivindicación precedente, en el que la enzima es una D-aminoácido-oxidasa mutante, obtenible de *Rhodotorula gracilis*, comprendiendo dicha oxidasa sustituciones en las posiciones 213 y/o 238, cuando se compara con la secuencia de tipo silvestre, o es una D-aspartato-oxidasa.
13. Método según la reivindicación precedente, en el que la oxidasa obtenible de *Rhodotorula* tiene en posición 213 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys, Ser, Cys, Asn y Ala y/o, en posición 238, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Ser, Cys, Asn y Ala.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que la mezcla comprende D- y L-fosfotricina y el material vegetal expresa un gen PAT, sustancialmente sólo en tejidos verdes y en tejido floral femenino de la planta condicionalmente masculino-estéril y en tejido floral masculino de la planta condicionalmente femenino-estéril.
15. Una casete de expresión de ADN quimérico, que comprende al menos:
 a. un elemento promotor que funciona en plantas o células vegetales,
 b. una molécula de ADN que codifica una D-aminoácido-oxidasa,

c. un elemento terminador transcripcional, en el que el elemento promotor dirige la expresión de las estructuras reproductivas masculinas o femeninas.

- 5 16. Una casete de expresión quimérica según la reivindicación 15, en la que la molécula de ADN que codifica la D-aminoácido-oxidasa, se selecciona del grupo de moléculas de ADN aisladas de *Rhodosporidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Trigonopsis* sp., pig, *Fusarium* sp., *Candida* sp., *Schizosaccharomyces* sp. y *Verticilium* sp.
- 10 17. Un vector de expresión que comprende una casete de expresión quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16.
18. Una célula de planta transgénica o una planta transgénica que comprende un vector de expresión según se reivindica en la reivindicación 17, o una casete de expresión quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16.

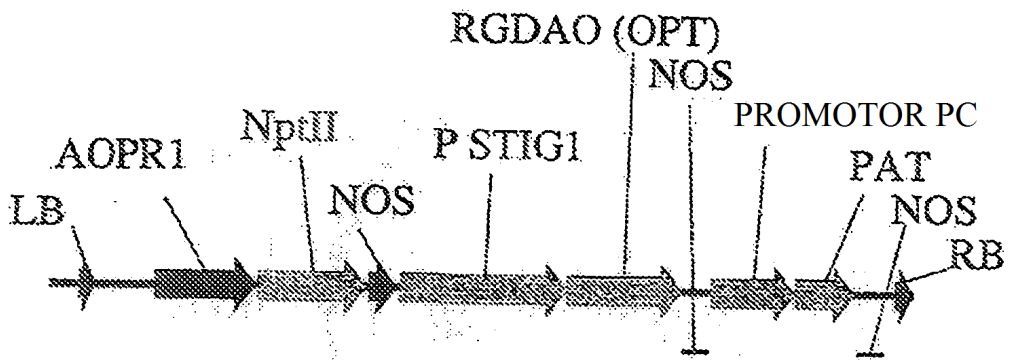


Figura 1

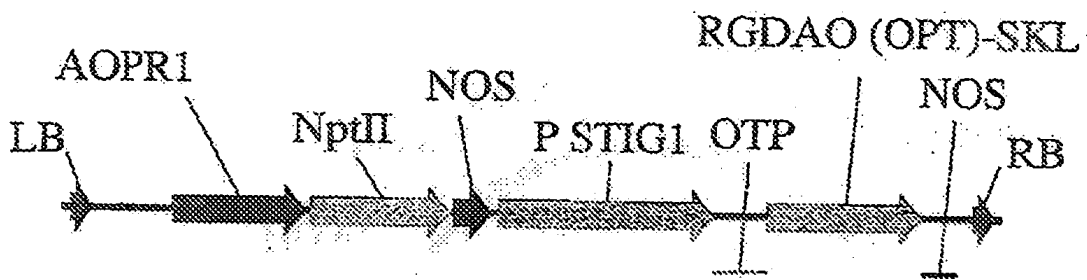


Figura 2