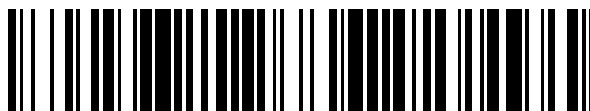


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 665**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04736419 .5**
96 Fecha de presentación: **09.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1646721**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.04.2006**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE FORMA SELECTIVA PLANTAS ESTÉRILES MASCULINAS O FEMENINAS.**

30 Prioridad:
08.07.2003 GB 0316040
28.01.2004 GB 0401839

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2012

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

72 Inventor/es:
DALE, Richard;
HAWKES, Timothy Robert;
THOMPSON, Paul Anthony y
VINER, Russell

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 376 665 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

Procedimiento de producción de forma selectiva plantas estériles masculinas o femeninas

5 La heterosis en plantas de cultivo puede tener un efecto notable en la mejora del rendimiento. En general, los híbridos muestran rendimientos aumentados en comparación con variedades no híbridas. Los híbridos habitualmente proporcionan una mayor unidad de retorno para factores de crecimiento tales como agua y fertilizantes. Los híbridos con frecuencia ofrecen superior tolerancia a tensión, uniformidad en producto y madurez y también proporcionan una oportunidad de reproducción sencilla para combinar características o rasgos que pueden ser difíciles de combinar de otras maneras. El vigor del híbrido en plantas es generalmente de suficiente magnitud para garantizar la explotación comercial. Los híbridos comerciales se usan de forma extensiva en muchos cultivos incluyendo maíz, sorgo, remolacha azucarera, girasol y colza. Sin embargo, debido principalmente a la falta de procedimientos de producción de semillas híbridas económicos, el trigo, cebada y arroz aún se cultivan principalmente como endogámicos.

15 Tradicionalmente, la producción de semillas híbridas implica plantar bloques separados de líneas parentales masculinas y femeninas recogiendo solamente la semilla de los parentales femeninos. Para asegurar que esta semilla es híbrida, deben minimizarse la autopolinización de la línea parental femenina haciendo a la línea masculina estéril. Los procedimientos para hacer a la línea femenina parental masculina estéril incluyen procedimientos mecánicos, químicos y genéticos. En plantas dioicas, tales como maíz, la esterilidad masculina puede conseguirse fácilmente de forma mecánica por despenachado de la inflorescencia masculina. Sin embargo la mayoría de los cultivos son monoicos y el tener órganos masculinos y femeninos dentro de la misma flor hace dicha emasculación física poco práctica. Por lo tanto se han usado en ocasiones enfoques genéticos.

25 Los rasgos de esterilidad masculina genética que aparecen normalmente se controlan por genes nucleares en los que los alelos asociados con el fenotipo estéril generalmente se expresan de forma recesiva con respecto a lo alelos correspondientes asociados con fertilidad. Cuando se produce esterilidad masculina genética normalmente está asociada con un gen recesivo sencillo que debe ser homocigoto para que se exprese la esterilidad masculina. Para hacer uso práctico de tales rasgos de esterilidad masculina genética, los obtentores habitualmente desarrollan una línea femenina fenotípicamente uniforme que segrega en plantas estériles masculinas y fértiles masculinas. Las plantas fértiles masculinas, una vez identificadas, necesitan depurarse lo que requiere mucho trabajo. Existe siempre un problema con el mantenimiento de la línea parental puesto que las plantas fértiles masculinas no pueden eliminarse de la población debido a que son esenciales para el mantenimiento de la población. En lugar de basarse en la existencia de alelos de esterilidad masculina naturales también es posible usar procedimientos biológicos moleculares. Pueden obtenerse por ingeniería genética plantas que expresen, por ejemplo, genes antisentido o de ribozimas que disminuyen o eliminan la expresión de genes clave necesarios para la formación de polen viable. Tales líneas transgénicas de plantas son estériles masculinas y se usan para la producción de semilla híbrida usando de forma cruzada polen de plantas fértiles masculinas. El problema principal con tales líneas es que solamente pueden mantenerse en un estado heterocigoto 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, puede ser posible depurar de forma selectiva las plantas fértiles masculinas esto aún necesita que las plantas se planten inicialmente a densidades muy altas.

40 El uso de esterilidad masculina citoplásmica para producción híbrida comercial requiere un citoplasma estéril masculino estable y una fuente de polen. El sistema genético citoplásmico de esterilidad masculina requiere la existencia de tres tipos de línea para producción híbrida, la línea A (estéril masculino citoplásmico), línea B (mantenedora fértil masculina) y línea R (fértil masculina con genes restauradores). Cruces de tres vías producidos con este sistema implican el mantenimiento y producción de cuatro líneas, una línea A y una B de un endogámico y endogámicos masculinos fértiles de las otras dos. La dependencia de una fuente sencilla de citoplasma estéril masculino puede minimizar la flexibilidad de cultivo y conducir a descendencia con susceptibilidad generalizada a enfermedades particulares.

50 La semilla híbrida también puede producirse a través del uso de agentes químicos que inhiben la formación de polen viable. Estos agentes químicos, llamados gametocidas, se usan para transmitir esterilidad masculina transitoria. Sea cual sea el gasto, la registrabilidad y fiabilidad de los gametocidas ha limitado su uso.

55 Un defecto de los sistemas de producción de semillas híbridas tradicionales es la necesidad de plantar filas o bloques separados de las líneas parentales masculinas y femeninas. Aquí la polinización de baja eficacia es un problema especialmente agudo en especies de cultivo, tales como trigo, que liberan cantidades pequeñas de polen que no viaja lejos con el viento. En tales cultivos necesitan dedicarse hasta dos tercios del campo productor de híbrido a plantas donadores de polen masculinas y después la producción de semilla híbrida se hace por lo tanto antieconómica.

Para conseguir producción de semilla más económica en trigo y otros cultivos es necesario mover las plantas masculinas y femeninas más cerca entre sí para una transferencia del polen más eficaz; de forma más eficaz plantando de forma intercalada machos y hembras a una distancia de centímetros entre sí en las mismas filas. En un

sistema tal no sería práctico recoger solamente la semilla de los parentales femeninos (masculinos estériles). La contaminación con semilla no híbrida que se origina del parental masculino puede minimizarse usando un porcentaje tan bajo de tales plantas parentales masculinas en la mezcla de plantación como sea posible y/o usando plantas masculinas que son estériles femeninas. Un procedimiento para construir una línea estéril femenina dominante se ha descrito (documento EP 412.006 A1 (1990); Goldman y col., (1994) EMBO. J., 13, 2976-2984) pero, como con las líneas estériles masculinas, la línea tiene que mantenerse como un heterocigoto.

En consecuencia sigue existiendo una necesidad de procedimientos económicos sencillos de producción de semilla híbrida. En particular, para producir de forma eficaz semilla híbrida sigue existiendo una necesidad de proporcionar tanto líneas femeninas parentales estériles masculinas como líneas masculinas parentales estériles femeninas que pueden mantenerse fácilmente como líneas homocigotas puras y que son útiles para producción de semilla híbrida eficaz. Los procedimientos que se describen en la técnica para conseguir esto incluyen procedimientos en los que se produce semilla híbrida a partir de líneas parentales masculinas y femeninas al menos una de las cuales comprende un gen quimérico heterólogo, preferentemente expresado en tejido floral, que hace a la línea condicionalmente estéril dependiendo de la aplicación exógena de una sustancia no fitotóxica que puede convertirse específica y localmente a una fitotoxina por una enzima que se codifica por el gen quimérico heterólogo y que se expresa preferentemente en las estructuras reproductoras masculina o femenina. La sustancia no fitotóxica puede ser un proherbicida. La ventaja de tener tales líneas parentales condicionalmente estériles es que permite que se mantengan como homocigotos con respecto al rasgo de esterilidad. La fertilidad se interrumpe sólo tras la aplicación exógena de la sustancia no fitotóxica. En un ejemplo tal de un sistema de esterilidad masculina condicional un gen que codifica una enzima desacetilasa se expresa preferentemente en células del tapete de tejido de flores masculinas en el que convierte el proherbicida N-acetil L fosfinotricina aplicado de forma exógena a la fitotoxina L fosfinotricina y de este modo evita la formación de polen viable. En ejemplos similares adicionales: (i) la expresión preferente en el tapete de un citocromo bacteriano P450 catalizada la conversión de proherbicida R7402 a una fitotoxina de sulfonilurea que evita la producción de polen viable y (ii) la expresión preferente en el tapete de una fosfonato monoéster hidrolasa cataliza la conversión de proherbicida de gliceril glifosfato a la fitotoxina glifosato que también evita la producción de polen viable. El documento WO 98/03838 describe ejemplos de un sistema de esterilidad femenina condicional en el que las enzimas capaces de convertir los proherbicidas a fitotoxinas se expresan preferentemente en estructuras reproductoras femeninas.

A pesar de la existencia de estos procedimientos para hacer líneas parentales masculinas y femeninas que sean condicionalmente estériles, la producción de semillas híbridas sigue estando lejos de la rutina en cultivos tales como trigo. Las actuales invenciones se refieren, entre otros, a mejoras en la técnica con respecto a la generación de líneas parentales femeninas que sean condicionales estériles masculinas y líneas parentales masculinas que sean condicionales estériles femeninas.

La presente invención se refiere a mejoras en procedimientos para la producción de semilla híbrida de cultivo. En particular la invención se refiere a un procedimiento de producción de semilla híbrida de líneas parentales masculinas y femeninas al menos una de las cuales es condicionalmente estéril femenina o masculina dependiendo de la aplicación exógena de una sustancia que no es fitotóxica para el cultivo y que incluye proherbicidas. La invención se refiere adicionalmente a un procedimiento en el que dicha sustancia no fitotóxica se aplica en un momento y en cantidad suficiente para que la autofertilización se minimice o se evite en la línea o líneas parentales condicionalmente estériles. La presente invención también se refiere a un procedimiento para generar plantas condicionalmente estériles masculinas o femeninas i) transformando el material vegetal con uno o más genes quiméricos que, individualmente o juntos, codifican una o más enzimas capaces de reaccionar con una sustancia no fitotóxica, preferentemente en forma de un proherbicida, para producir uno fitotóxico. Las enzimas se expresan bajo el control operativo de uno o más promotores que, en el caso de plantas condicionalmente estériles masculinas, provoca que la enzima o enzimas se expresen preferentemente en las estructuras reproductoras masculinas o que, en el caso de plantas condicionalmente estériles femeninas, provoca que dicha enzima o enzimas se expresen preferentemente en las estructuras reproductoras femeninas. El material vegetal se regenera en plantas fértiles morfológicamente normales que son condicionales estériles masculinas o femeninas. La invención también incluye el uso de plantas condicionalmente estériles masculinas en combinación con plantas condicionalmente estériles femeninas para producir semilla híbrida más eficazmente, el uso, como sustancias no fitotóxicas, de ciertos proherbicidas y el uso de genes quiméricos para producir más eficazmente semillas híbridas, genes quiméricos y enzimas útiles para la invención. La invención también proporciona plantas condicionalmente estériles masculinas, condicionalmente estériles femeninas, semillas de estas plantas y semillas híbridas producidas por el procedimiento. En realizaciones preferidas de la invención las plantas de cultivo a las que se aplica procedimiento para realizar semillas híbridas son maíz, arroz, sorgo, trigo, mijo, avena, colza y cebada.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento para producir plantas estériles masculinas o femeninas que comprenden las etapas de transformar el 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 la que dicha sustancia no fitotóxica se aplica a la planta hasta el momento de formación de gametos masculinos o femeninos y/o maduración, de modo que las sustancia no fitotóxica posibilita la producción de una fitotóxica que evita selectivamente la formación de o hace de otro modo a dichos gametos no funcionales, en el que la enzima se expresa preferentemente en estructuras reproductoras masculinas o femeninas, caracterizadas por que (i) la sustancia no fitotóxica se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos D-alfa,

derivados peptídicos de aminoácidos D-alfa no proteicos y (ii) la enzima es una forma mutante de una D-aminoácido oxidasa que tiene una lisina en la posición correspondiente a la fenilalanina en la posición 58 de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* de tipo silvestre.

5 Puesto que es un objetivo deseable maximizar el rendimiento de la semilla híbrida y por lo tanto minimizar cualquier
 daño al cultivo, en realizaciones preferidas, la sustancia no fitotóxica es un proherbicida seleccionado entre
 compuestos que son relativamente no fitotóxicos para el cultivo. Para poder tener un efecto contra tejidos florales
 también es deseable que los proherbicidas sean progenitores de fitotoxinas que son eficaces en tejidos “no verdes”.
 Por lo tanto, en realizaciones preferidas de la invención, se seleccionan proherbicidas de los que son progenitores
 10 de fitotoxinas que son directamente fitotóxicos para tejidos no verdes en lugar de los que tienen un sitio de acción
 principal en fotosíntesis o en la generación de pigmentos fotosintéticos. También es un objetivo deseable minimizar
 los costes de producción de semillas híbridas. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, se seleccionan proherbicidas
 entre las sustancias químicas para las que ya se ha concedido o está en trámite la aprobación de autoridades
 reguladoras apropiadas para su uso en cultivos.

Nomenclatura: Definiciones

15 “Gen” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier secuencia de ADN que comprende varios
 fragmentos de ADN ligados operativamente tal como un promotor y una región reguladora 5’, una secuencia
 codificante y una región 3’ no traducida que comprende un sitio de poliadenilación.

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

20 “Gen quimérico” como se usa en el presente documento se refiere a un gen en el 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.

“Casete de expresión” como se usa en el presente documento se refiere a una región transferible de ADN que
 comprende un gen quimérico que está flanqueado por uno o más sitios de restricción u otros que facilitan la escisión
 precisa de un locus de ADN e inserción en otro.

25 “Sustancias no fitotóxicas” son, en el contexto de la presente invención, sustancias que son relativamente no
 fitotóxicas para plantas, células o tejidos de cualquier cultivo particular al que se aplique el procedimiento de la
 invención. Las sustancias no fitotóxicas no necesitan ser no fitotóxicas en todos los tejidos vegetales de todas las
 plantas. Las sustancias no fitotóxicas incluye proherbicidas que son sustancias sin efecto tóxico directo apreciable
 30 en tejidos vegetales pero que son progenitoras de fitotoxinas activas. En especies vegetales susceptibles tales
 proherbicidas actúan de forma indirecta como herbicidas a través de la acción de enzimas endógenas que los
 convierten en la planta en una fitotoxina.

“Fitotoxinas” son, en el contexto de la presente invención, sustancias que son tóxicas para plantas, tejidos vegetales
 y células vegetales del cultivo particular para el que se aplica el procedimiento de la invención. Tales fitotoxinas no
 necesitan ser fitotoxinas para todos los tejidos vegetales de todas las especies vegetales.

35 “Estructura reproductora femenina” significa los gametos femeninos y las partes de la planta que se especializan en
 la producción, maduración y viabilidad de gametos femeninos. Normalmente esto comprende las partes de una
 planta que comprenden el carpelo o gineceo (“pistilo”). El carpelo de una planta incluye pero sin limitación, un
 estigma, estilo, ovario y células o tejidos que están comprendidos por el estigma, estilo y ovario.

40 “Estructura reproductora masculina” significa los gametos masculinos y las partes de la planta que están
 especializadas en la producción, maduración y viabilidad de gametos masculinos. Esto comprende las partes de una
 planta que comprende, por ejemplo, microsporas, estambres, tapete, anteras y el polen.

45 “Planta estéril femenina” como se usa en el presente documento es una planta que es incapaz de soportar la
 formación de semillas viables cuando se poliniza con polen funcional o viable. Tal esterilidad femenina puede ser el
 resultado de selección reproductiva o la presencia de un transgén. Una “planta condicionalmente estéril femenina”
 se refiere a una planta que en condiciones de crecimiento normales es fértil femenina y que puede hacerse estéril
 femenina en condiciones específicas. En el contexto de la presente invención dichas condiciones comprenden la
 aplicación exógena de un proherbicida u otra sustancia no fitotóxica. En el contexto de la presente invención dicha
 “planta estéril femenina” o “planta condicionalmente estéril femenina” sigue siendo fértil masculina y capaz de
 producir polen viable.

50 “Planta estéril masculina” como se usa en el presente documento es una planta que es incapaz de soportar la
 formación de polen viable. Dicha esterilidad masculina puede ser el resultado de selección reproductora o la
 presencia de un transgén. Una “planta condicionalmente estéril masculina” se refiere a una planta que en
 condiciones de crecimiento normales es fértil masculina y que puede hacerse estéril masculina en condiciones
 55 específicas. Por ejemplo las condiciones podrían comprender emasculación física o aplicación de un gametocida
 químico específico. En el contexto de la presente invención dichas condiciones particularmente comprenden la
 aplicación exógena de un proherbicida u otra sustancia no fitotóxica. En el contexto de la presente invención una

“planta estéril masculina” o “planta condicionalmente estéril masculina” tal sigue siendo fértil femenina y capaz de producir semillas viables cuando se poliniza con polen funcional o viable.

5 “Región promotora” como se usa en el presente documento es una región de ADN que comprende al menos un promotor funcional y, opcionalmente, alguna o todas sus secuencias reguladoras cadena arriba asociadas incluyendo secuencias potenciadoras y/o secuencias cadena abajo asociadas incluyendo parte de o toda la región 5’ no traducida del gen endógeno del promotor.

10 “Plantación intercalada” como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento de plantar semillas o plantas en un campo que asegura polinización cruzada adecuada de plantas estériles masculinas o condicionalmente estériles masculinas por las plantas fértiles masculinas. Esto puede conseguirse mediante mezcla aleatoria de semilla parental femenina y masculina en diferentes mezclas (80/20; 90/10; etc.) antes de plantar o plantando en patrones de campo específicos por los que se alternan semillas diferentes. Cuando se requiere recogida separada de diferentes plantas se prefiere la plantación en bloques o filas alternantes.

15 En el procedimiento de acuerdo con la invención dicha sustancia no fitotóxica puede aplicarse en mezcla junto con al menos una sustancia adicional que puede seleccionarse del grupo que consiste en aminoácidos, sanadores, gametocidas, inductores de glutatión-S-transferasa, inductores de citocromo P450, fertilizadores, herbicidas, nematocidas, sinergistas, insecticidas, fungicidas, hormonas, reguladores del crecimiento vegetal e inhibidores del citocromo P450. En realizaciones particulares dicha sustancia no fitotóxica puede aplicarse en una mezcla con la misma sustancia fitotóxica de la que es progenitora la sustancia no fitotóxica.

20 La sustancia no fitotóxica es un D aminoácido y, en particular, puede ser el D enantiómero de fosfinotricina, el D enantiómero de bialafos o seleccionarse del grupo que consiste en D aspartato y D glutamato.

25 Las D-aminoácido oxidasas son formas mutantes de la enzima de *Rhodotorula gracilis*. Tales mutantes siempre tienen una lisina en la posición 58 (es decir son mutantes F58K de la secuencia de tipo silvestre) y comprenden sustituciones de aminoácidos adicionales sencillas, dobles o triples en las posiciones 213, 223 y 238 en comparación con la secuencia de tipo silvestre. En la posición 213 la metionina de tipo silvestre se reemplaza con Thr, Gly, o Gln y/o la tirosina de tipo silvestre en la posición 223 se reemplaza con Thr, Gly, Gln, Cys o Asn y/o la tirosina de tipo silvestre en la posición 238 se reemplaza con Thr, Gly, o Gln. En una realización particularmente preferida la metionina en la posición 213 se reemplaza con treonina.

30 Cuando la sustancia no fitotóxica es un D aminoácido distinto de D-fosfinotricina o D-bialafos entonces el D aminoácido preferentemente no es un metabolito vegetal endógeno y se selecciona para ser móvil en el floema, metabólicamente estable en la planta (preferentemente que tenga una $t_{1/2}$ en la planta de más de ~ 1 semana) y un sustrato eficaz de la D-aminoácido oxidasa. La oxidación de D aminoácido por la enzima es conjunta con la reducción de oxígeno a aniones de peróxido fitotóxicos.

35 En una realización preferida la enzima oxidasa se dirige a una localización subcelular distinta del peroxisoma. Esto se consigue, por ejemplo, modificando el gen de modo que se supriman o modifiquen tres aminoácidos C terminales (por ejemplo SKL en el caso de la aminoácido oxidasa D derivada de *Rhodotorula gracilis*) y/o por adición de secuencia para añadir un cloroplasto o péptido de tránsito mitocondrial al extremo N terminal.

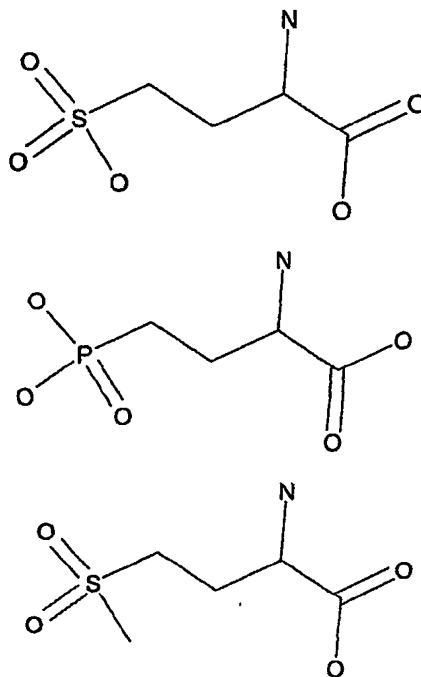
Pueden obtenerse D-aminoácido oxidasas adecuadas adicionales preferentemente de fuentes fúngicas, por la mutación y procedimientos selectivos conocidos por los expertos en la materia y aumentados por la presente divulgación.

40 Se obtienen enzimas D-aminoácido oxidasa mutantes y secuencias codificantes de ADN adicionales adecuadas para elaborar la invención expresando bibliotecas de D-aminoácido oxidasas mutantes candidatas en una célula huésped adecuada tal como *E. coli* o una levadura (las cepas huésped adecuadas carecen de una actividad oxidasa o deshidrogenasa endógena frente a D-fosfinotricina) para transformación a un fenotipo con sensibilidad aumentada a inhibición del crecimiento por D-fosfinotricina en un medio mínimo. Este procedimiento se basa en la capacidad de los clones de *E. coli* transformados para producir L-PPT a partir de D-PPT mediante la acción combinada de su actividad L transaminasa endógena y la oxidasa expresada de forma heteróloga. Como alternativa, se seleccionan genes adecuados y mejorados basándose en ensayo *in vitro* de la enzima expresada con respecto a la capacidad deseada para oxidar D-fosfinotricina. Existen muchos procedimientos para ensayar directamente las actividades de D-aminoácido oxidasas tales como basados en la detección de peróxido (Enzyme Microb. Technol., (2000), 27(8), 605-611), agotamiento de oxígeno usando un electrodo de oxígeno o basándose en detección directa de amoniaco o del producto ceto ácido.

55 Se desvela que se clona un gen de DAMOX derivado de hongo en un vector lanzadera bajo el control operativo de un promotor (por ejemplo promotor GAL) capaz de expresión en el organismo huésped en el que la selección se llevará a cabo (preferentemente levadura). Este gen se somete después a mutagénesis, por ejemplo por PCR envenenada por Mn²⁺; replicación de ADN plasmídico en una cepa que es defectuosa en procesos de reparación/edición del ADN tal como la cepa de *E. coli* XL1 red; o por replicación de ADN plasmídico en una cepa huésped que se somete a mutagénesis usando por ejemplo Rayos X, luz ultravioleta, adición de un mutágeno químico y se transforma en un organismo huésped (preferentemente levadura). El ADN deseado que codifica una

DAMOX que tiene la propiedad deseada de una capacidad potenciada para oxidar D-PPT se selecciona (siguiendo una etapa de selección inicial opcional para transformantes basada en marcadores seleccionables presentes en el vector lanzadera que permiten, por ejemplo, selección mediante restauración de prototrofia o crecimiento en presencia de higromicina etc.) mediante, por ejemplo

- 5 a) Selección de células transformadas que tienen la capacidad de utilizar aminoácidos que son químicamente similares a D-fosfinotricina como única fuente de nitrógeno. Por ejemplo, se seleccionan colonias de levadura transformadas que son capaces de crecer en análogos de D-PPT (y sus ésteres) en las que el resto de ácido fosfínico se reemplaza con un carboxilato (es decir D-glutamato), sulfonato, fosfonato, sulfona o restos de sulfóxido (o ésteres de estos) como única fuente de N. Por ejemplo,



- 15 b) Selección de células transformadas capaces de utilizar D-PPT en sí mismo como única fuente de N. Para esta selección la célula huésped también se transforma con un gen capaz de negar el efecto inhibitorio de L-fosfinotricina en glutamina sintetasa. Por ejemplo el vector lanzadera también comprende un gen que codifica una enzima tal como PAT que inactiva L-PPT.

20 Los ciclos de mutación y selección pueden repetirse. Las D-aminoácido oxidasas pueden adicionalmente clonarse, expresarse, purificarse parcialmente y caracterizarse cinéticamente para identificar genes y DAMOX con las propiedades más adecuadas (por ejemplo estabilidad enzimática, alto valor de kcat/Km para oxidación de D-PPT, oxidación mínima de cualquier sustrato vegetal endógeno, pH óptimo, etc.).

25 Cuando la sustancia no fitotóxica es D-fosfinotricina (PPT) esta puede obtenerse de una mezcla de D y L PPT. Por ejemplo, DL PPT puede añadirse a un medio de cultivo (preferentemente mínimo) de células *E. coli* (opcionalmente un mutante arg E para minimizar el nivel de fondo de actividad N-acetil PPT desacetilasa) cuando la *E. coli* se transforma para expresar un gen PAT (que codifica una enzima que transfiere un grupo acetilo de acetil CoA a L-PPT) a un alto nivel (por ejemplo de forma inducible, tras la adición de IPTG). Preferentemente, la *E. coli* también se modifica por ingeniería genética para expresar acetil CoA sintetasa. Después de permitir un tiempo adecuado para que el componente L de la fosfinotricina se N-acetile sustancialmente completo (juizado, por ejemplo, controlando la conversión usando ³¹P NMR) D-PPT se recupera y purifica del medio sin células usando etapas sucesivas de, por ejemplo, extracción de disolvente a pH alto y bajo, cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, cristalización selectiva con cationes quirales tales como quincocina u otros procedimientos conocidos en la técnica tales como extracción de líquido/líquido con dos fases acuosas no miscibles como el sistema de fase (consultense los procedimientos en el documento USP 5.153.355). Típicamente una etapa posterior es cromatografía de intercambio catiónico de la que se recupera D-PPT como la sal de amonio.

35 Como alternativa, puede obtenerse D-PPT por un procedimiento enzimático en el que DL PPT + 2-cetoglutarato se convierte a principalmente una mezcla de D-PPT, 2-oxo PPT (y sus productos de descarboxilación) y GABA por las acciones combinadas de (I) L-aminotransferasa (por ejemplo de *E. coli*) y (II) glutamato descarboxilasa. La D-PPT pura deseada se resuelve a partir de la mezcla de reacción usando procedimientos conocidos en la técnica y como se ha descrito anteriormente.

También puede obtenerse D-PPT usando un procedimiento enzimático en el que DL PPT + 2-cetoglutarato + NAD

se convierte a principalmente una mezcla de D-PPT, 2-oxo PPT (y sus productos de descarboxilación) NADH y amoniaco por las acciones combinadas de (I) L-aminotransferasa y (II) glutamato deshidrogenasa. La D-PPT deseada se purifica a partir de la mezcla de reacción.

5 En un procedimiento adicional más para preparar D-PPT, DL PPT se trata con una L-aminoácido oxidasa de modo que el único aminoácido restante es la forma D deseada. Esta D-PPT se purifica después de la mezcla de reacción.

10 Un procedimiento adicional más implica (I) conversión de DL PPT a N-acetil DL PPT (usando anhídrido acético u otros reactivos acetilantes y procedimientos bien conocidos en la técnica) y (II) tratamiento de N-acetil DL PPT con D-aminoacilasa de modo que sólo se desacetila N-acetil-D-PPT. La D-PPT resultante se purifica de la mezcla de reacción. Por ejemplo, D-PPT se resuelve a partir de N-acetil-L-PPT uniéndose a la resina de intercambio aniónico Dowex y elución con ácido fórmico 40 mM. En condiciones de carga adecuadas este ácido eluye la D-PPT dejando la N-acetil L-PPT unida a la columna.

Un procedimiento adicional más implica tratamiento de DL PPT con L-aminoacilasa y un agente acilante en un disolvente no acuoso de modo que solamente se deja la D-PPT deseada en una forma no acetilada.

15 Un procedimiento adicional más para preparar D-PPT pura implica cristalización enantioselectiva de DL PPT usando una base quiral tal como quincocina y adición de un núcleo de cristalización de la base quiral con D-PPT pura.

Un procedimiento adicional más para preparar D-PPT pura a partir de DL-PPT por cromatografía quiral directa usando una columna de base quiral.

Se proporciona un procedimiento detallado para la producción de D-PPT en uno de los Ejemplos posteriores.

20 Las secuencias de ADN que codifican las enzimas usadas en la presente invención pueden, opcionalmente, mutarse y seleccionarse adicionalmente para generar enzimas útiles adicionales que tienen utilidad mejorada. Muchas características de las enzimas se mejoran de este modo incluyendo actividad catalítica (kcat/Km) frente al sustrato deseado, estabilidad de temperatura y pH óptimo. Se conocen bien procedimientos para generar, explorar y seleccionar con respecto a tales variantes mejoradas. Por ejemplo, se generan secuencias de ADN variantes adecuadas por un procedimiento de mutagénesis (por ejemplo pasando ADN a través de cepas bacterianas o de levadura con replicación de ADN propensa a errores tales como *E. coli* XL1 red, por mutagénesis por PCR de oligonucleótidos diana, química o UV). En particular tales genes se producen por cualquiera de varios procedimientos alternativos de barajado de ADN o "PCR sexual" como, por ejemplo, se resumen el documento WO 00/61740 de las páginas 28-41. Muchos procedimientos son adecuados para seleccionar tales genes mejorados. Los genes pueden expresarse de forma adecuada en una célula huésped adecuada tal como *E. coli* o levadura y seleccionarse para mejora usando ensayos adecuados tales como, por ejemplo, los descritos en el presente documento.

35 Los genes quiméricos que codifican enzimas para su uso en la invención que son capaces, individualmente o en combinación con otros, de convertir una sustancia no fitotóxica a una fitotóxica, pueden comprender cada uno una secuencia de ADN que codifica una de dichas enzimas ligada operativamente a una región promotora 5' que dirige preferentemente la expresión a las estructuras reproductoras masculinas o femeninas. Esta especificidad de expresión asegura que el efecto de la enzima o enzimas expresadas se ejercerá solamente dentro de la localidad de los tejidos y células necesarios para la formación de semilla viable o polen viable y no será deletéreo para la planta más allá de su efecto en la fertilidad en presencia de una sustancia no fitotóxica adecuada, quizás un proherbicida. Además de genes quiméricos de regiones promotoras de acuerdo con la presente invención también comprende una secuencia terminadora de la transcripción 3'. Esta es responsable de la terminación de la transcripción y correcta poliadenilación de ARNm. Muchas secuencias terminadoras de la transcripción 3' tales 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 de la transcripción 3' se selecciona del terminador 35S de CMV, el terminador *tml*, el terminador de nopalina sintasa (nos) y el terminador *rbcS* E0 de guisante.

45 Las regiones promotoras 5' adecuadas para su uso en ciertas realizaciones de dichos genes quiméricos incluyen regiones 5' de genes que se expresan preferentemente en tejidos florales femeninos. En ciertas realizaciones la región promotora 5' se selecciona del grupo que consiste en el promotor stig 1 del tabaco (Goldman y col., (1994) EMBO J., 13, 2976-2984), un promotor S13 modificado (Dzelkalns y col (1993) Plant Cell, 5, 8555), el promotor AGL5 (Savidge y col (1995) Plant Cell, 7, 721-733 y la región promotora 5' del gen ZAG2 específico de carpelo de maíz (Thiessen y col (1995) Gene, 156, 155-166). Opcionalmente, se obtienen regiones promotoras adecuadas adicionales de regiones cadena arriba de las secuencias codificantes de ADN genómico que corresponden a secuencias de ADNc que se conoce en la técnica que se expresan preferentemente en estructuras reproductoras femeninas. En ciertas realizaciones tales ADNc sonda se seleccionan del grupo que consiste en genes Fbp7 y Fbp11 de *Arabidopsis* (Angenent y col., (1995) Plant Cell, 7, 1569-1582) y los ADNc específicos de orquídea O40, O108, O39, O126 y O141 (Nadeau y col., (1996) Plant Cell, 8, 213-239). En realizaciones particulares se seleccionan regiones promotoras 5' que comprenden ADN genómico asociado con expresión preferente en estructuras reproductoras femeninas de regiones de ADN comprendidas dentro del grupo que consiste en el clon de ADN genómico pSH64 que tiene el número de acceso NRRL B-21920, clon genómico, pCIB10302 que hibrida con el

ADNc P26-A4 que tiene el número de acceso NRRL B-21655 y clon de ADN genómico X2-1 que hibrida con el clon de ADNc P 19-QA que tiene el número de acceso NRRL B-21919. En realizaciones particulares adicionales esta región promotora comprende los nucleótidos 1 a 1390 de SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 2 y los nucleótidos 1 a 1093 de SEC ID N°: 4 en el documento WO 98/39462. En realizaciones adicionales, se aíslan y clonan regiones promotoras 5' adicionales adecuadas para su uso en los genes quiméricos de la invención por procedimientos que son familiares para los expertos en la materia. Por ejemplo, se identifican nuevos transcritos expresados en estructuras reproductoras femeninas aislando ARN de tejidos tales como sedas de maíz o pistilos de trigo seguido de exploración diferencial usando técnicas tales como presentación diferencial, sustracción de ADNc seleccionado por PCR y construcción de biblioteca de ADNc sustractiva. Se aíslan clones de ADNc que se expresan preferentemente en los tejidos femeninos y no en otras partes de la planta tales como las hojas, raíces y penachos. La especificidad de tejido de la expresión se confirma, opcionalmente, adicionalmente por transferencia de Northern. Los clones de ADNc se usan como sondas para exploración de biblioteca genómica. Se obtienen regiones promotoras 5' y, opcionalmente, regiones de ADN no traducido 3' asociadas con expresión preferente de tejido de los clones de ADN genómico y se usan en la construcción de genes quiméricos para expresión preferente en estructuras reproductoras femeninas.

Las regiones promotoras 5' adecuadas para su uso en ciertas realizaciones de dichos genes quiméricos incluyen regiones 5' de genes que se expresan preferentemente en tejidos florales masculinos. Estas incluyen regiones promotoras para expresión en polen, el tapete u otras estructuras en la antera. En ciertas realizaciones, estas regiones promotoras 5' se seleccionan del grupo que consiste en el promotor LAT52 (Twell y col., (1989) Dev., 109, 705-713), el promotor A127 del tomate (Dotson y col., (1996) Plant J., 10, 383-392), el promotor Zmg del maíz (Hamilton y col., (1989) Sex. Plant Reprod. 2, 208-212), el promotor CDPK del maíz (Guerro y col., (1990) Mol. Gen. Genet., 224, 161-168) y los promotores ant32 y ant43D específicos de anteras desvelados en el documento USP 5477002. En ciertas realizaciones adicionales la región promotora 5' se selecciona del grupo que consiste en el promotor específico de tapete CA55 del maíz ("Pca55" descrito en el documento WO 92/13956), el promotor específico de tapete E1 del arroz (descrito en el documento USP 5639948), el promotor específico del tapete T72 de arroz (descrito en el documento USP 5639948), el promotor específico de antera RA8 del arroz (número de acceso de Genbank/EMBL AF042275; Jeon y col., (1999) PMB, 39, 35-44; documento WO 00/26389) el promotor Tap1 específico de antera (Spena y col (1992) Theor Appl Genet 84, 520-527) y el promotor específico de polen ZmC5 del maíz (número de acceso de Genbank/EMBL Y13285; Wakeley y col., (1998) PMB, 37, 187-192). Opcionalmente, se obtienen regiones promotoras adecuadas adicionales de regiones cadena arriba de las secuencias codificantes de ADN genómico correspondientes a secuencias de ADNc, que se sabe en la técnica que se expresan preferentemente en estructuras reproductoras masculinas. En ciertas realizaciones tales ADNc sonda se seleccionan del grupo que consiste en el gen de citocromo P450 específico de tubo polínico de orquídea (Nadeau y col., (1996) Plant Cell, 8,213-239), el gen Bcp1 de *Arabidopsis* (Xu y col (1995) P.N.A.S., 92, 2106-2110) y el gen MFS14 específico de flor masculina de maíz (Wright y col., (1993) Plant J, 3, 41-49). En realizaciones adicionales, se aíslan y clonan regiones promotoras 5' adicionales adecuadas para su uso en los genes quiméricos de la invención por procedimientos que son familiares para los expertos en la materia. Por ejemplo, se identifican nuevos transcritos expresados en estructuras reproductoras masculinas aislando ARN de tejidos tales como penachos, tubos polínicos, antera o tapete seguido de exploración diferencial por técnicas tales como presentación diferencial, sustracción de ADNc seleccionado por PCR y construcción de biblioteca de ADNc sustractivo. Se aíslan clones de ADNc que se expresan preferentemente en los tejidos masculinos y no en otras partes de la planta tales como las hojas, raíces y estigma. La especificidad de tejido de la expresión se confirma, opcionalmente, por transferencia de Northern. Los clones de ADNc se usan como sondas para exploración de biblioteca genómica. Se obtienen regiones promotoras 5' y regiones de ADN no traducido 3' asociadas con expresión preferente de tejido de los clones de ADN genómico y se usan en la construcción de genes quiméricos para expresión preferente en estructuras reproductoras masculinas.

Las regiones promotoras adicionales útiles en los genes quiméricos de la invención incluyen las regiones cadena arriba del gen Osmads 13 del arroz, el gen OSG de antera del arroz y el gen YY2 del arroz. Generalmente, se seleccionan regiones promotoras que producen expresión alta, temprana, prolongada y preferente en estructuras reproductoras masculinas y femeninas como las más adecuadas. Las regiones promotoras también pueden comprender adicionalmente combinaciones quiméricas entre sí y con regiones potenciadoras adicionales.

Los genes quiméricos pueden comprender opcionalmente una región, inmediatamente precedente a la secuencia de ADN que codifica la enzima implicada en la conversión de sustancia no fitotóxica a fitotoxina, que codifican una secuencia peptídica capaz de dirigir dicha enzima a orgánulos subcelulares tales como el cloroplasto, peroxisoma (distinto de cuando la fitotoxina es un peróxido o anión superóxido) o mitocondrias y dicha proteína de dirección puede tener la secuencia de (i) un péptido de tránsito de cloroplastos o (ii) una parte N-terminal de péptido de tránsito de cloroplastos de una proteína de cloroplastos-péptido de tránsito de cloroplastos. En particular, para dirigir a la mitocondria, dicha región de ADN que precede inmediatamente a la secuencia de ADN codificante de enzima, codifica una secuencia peptídica de tránsito de mitocondrias. En ciertas realizaciones la secuencia peptídica de tránsito puede seleccionarse del grupo que consiste en las secuencias peptídicas de tránsito endógenas de la subunidad beta de ATP sintasa mitocondrial de *Nicotinia glauca*, isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP específica de mitocondrias, subunidad de unión a NADPH del complejo de cadena respiratoria I y triptofanil-ARNt-sintetasa mitocondrial de levadura.

Los polinucleótidos para su uso en el presente procedimiento de la invención pueden comprender uno o más genes

quiméricos que codifican enzimas que catalizan reacciones implicadas en la generación de fitotoxinas de sustancias no fitotóxicas. Opcionalmente tales polinucleótidos comprenden más genes adicionales y genes quiméricos, tales como un gen marcador quimérico. Un gen marcador quimérico como se usa en el presente documento comprende un ADN marcador bajo el control de la expresión de un promotor que está activo en las células vegetales. El ADN

5 marcador codifica una ARN, proteína o polipéptido que, cuando se expresa en una planta, tejido vegetal o célula vegetal permite que dicho material vegetal se distinga de material vegetal que no expresa el ADN marcador. Son ejemplos de genes marcadores genes que proporcionan un color específico a una célula tal como el gen A1 (Meyer y col. (1987) Nature 330, 667) o genes que hacen a las células vegetales resistentes a selección de otro modo letal con antibióticos (por ejemplo el gen *aac(6')* que codifica resistencia a gentamicina, documento WO 94/01560 o

10 genes de higromicina fosfotransferasa que proporcionan resistencia a higromicina) o herbicidas tales como glifosato (por ejemplo genes EPSPS tales como en el documento USP 5510471 o el documento WO 00/66748), fenmedifam (por ejemplo gen de *pmph* documento USP 5347047; documento USP 5543306), bromoxinilo (por ejemplo genes descritos en el documento USP 4810648) sulfonilureas (por ejemplo genes descritos en el documento EP 0360750), dalapon (genes descritos en el documento WO 99/48023), cianamida (genes descritos en los documentos WO

15 98/48023; WO 98/56238) y genes que codifican resistencia a inhibidores de glutamina sintetasa tales como L-fosfinotricina (tal como, por ejemplo, genes de N-acetil-transferasa descritos en los documentos 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 un gen marcador, dicho herbicida es un herbicida que es útil para control de malas hierbas en el cultivo y, adicionalmente, el gen de resistencia a herbicida se expresa de forma suficiente para

20 proporcionar tolerancia robusta a tasas de campo de dicho herbicida. En una realización preferida adicional 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 proporcione selección positiva en la que el gen marcador codifica una enzima que proporciona, en el contexto de un medio particular, a las células vegetales transformadas una ventaja metabólica positiva. El documento USP 5767378 describe varios genes y sistemas de selección positiva adecuados.

25 Cuando el polinucleótido de la presente invención comprende un gen de resistencia a herbicida, el herbicida se aplica de forma exógena a plantas de cultivo que se plantan de forma intercalada a una densidad suficiente para eliminar la producción de semilla no híbrida que se origina de plantas parentales autofértiles no transgénicas. En una realización preferida el herbicida es glifosato o una sal agrónomicamente útil del mismo y dicho gen marcador de resistencia a herbicida se selecciona entre los genes que confieren resistencia a glifosato descritos en el documento

30 WO 00166748.

Cuando está presente un gen marcador, también pueden proporcionarse medios para la retirada de dicho gen marcador. Esto es deseable cuando, por ejemplo, se decide combinar rasgos. Además también es deseable retirar genes marcadores de resistencia a herbicida que podrían interferir con el funcionamiento del mecanismo de fertilidad condicional dependiente de proherbicida de la presente invención. Por ejemplo, sería deseable retirar un gen

35 marcador de resistencia a herbicida de fosfinotricina N-acetil transferasa (PAT) de un polinucleótido que comprende también un gen quimérico, útil para proporcionar esterilidad condicional masculina o femenina dependiente de la aplicación exógena de proherbicida D-fosfinotricina. La presencia del gen PAT podría interferir potencialmente con esterilidad condicional exitosa inactivando la fitotoxina L-fosfinotricina. Por lo tanto, los polinucleótidos que comprenden genes marcadores pueden comprender opcionalmente sitios de reconocimiento específicos para

40 recombinasas específicas en posiciones que flanquean el gen marcador y que permiten que la secuencia se "expulse". El cruce de una planta que porta el gen marcador flanqueado de este modo con una planta que porta un gen que codifica la recombinasa específica correspondiente da como resultado plantas descendientes de las que se escinde específicamente el marcador. Son ejemplos de tales sistemas de recombinación homóloga específicos de sitio adecuados el sistema *flp/frt* (Lyznik y col., (1996), Nucleic Acids Res. 24, 3784-3789) y el sistema *Cre/Lox*

45 (Bayley, C. C. y col., (1992) PMB, 18, 353-361).

Los polinucleótidos usados en el presente procedimiento de la invención pueden comprender opcionalmente uno o más potenciadores traduccionales localizados dentro de las regiones no traducidas 5' de las secuencias codificantes de proteína. El experto en la materia es consciente de la identidad de tales potenciadores traduccionales adecuados

50 tales como las secuencias Omega y Omega prima derivadas de TMV y que derivaron del virus del grabado del tabaco y cómo tales potenciadores traduccionales pueden introducirse en el polinucleótido para proporcionar el resultado deseado de expresión proteica aumentada. Los ejemplos adicionales incluyen potenciadores traduccionales derivados del virus del moteado clorótico del maíz y virus del mosaico de la alfalfa (Gallie y col., (1987) Nucl. Acids Res., 15, 8693-8711; Skuzeski y col., (1990) PMB., 15, 65-79). Para optimizar adicionalmente la expresión de proteínas de genes quiméricos y genes marcadores quiméricos dichos polinucleótidos también pueden

55 comprender adicionalmente elementos tales como potenciadores, regiones de unión a armazón o matriz (SARS o MARS) e intrones. Se ha mostrado que diversas secuencias intrónicas tales como el intrón 1 de *adh1* del maíz potencian la expresión cuando se incluyen en la región no traducida 5' de genes y, opcionalmente, se usan en los genes quiméricos de la presente invención.

Las plantas que se han transformado de acuerdo con la invención para mostrar las características de esterilidad

60 femenina/masculina deseadas también se pueden haber transformado con un polinucleótido que comprende regiones que codifican proteínas capaces de conferir al material vegetal que lo contiene al menos uno de los siguientes rasgos agrónomicamente deseables: resistencia a insectos, hongos, virus, bacterias, nematodos, tensión, desecación y herbicidas.

Los genes que confieren resistencia a herbicidas pueden, por ejemplo, seleccionarse del grupo que codifica las siguientes proteínas: glifosato oxidasa (GOX), EPSP sintasa, fosfinotricina acetil transferasa (PAT), hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD), glutatión S-transferasa (GST), citocromo P450, Acetil-CoA carboxilasa (ACCase), Acetolactato sintasa (ALS), protoporfirinógeno oxidasa (PPO), dihidropteroato sintasa, proteínas de transporte de poliaminas, superóxido dismutasa (SOD), bromoxinil nitrilasa, fitoeno desaturasa (PDS), el producto del gen *tfdA* que puede obtenerse de *Alcaligenes eutrophus*, y variantes mutadas o modificadas de otro modo conocidas de dichas proteínas. El experto en la materia reconocerá la necesidad de elegir tales genes y los promotores que dirigen su expresión, cuidadosamente, teniendo en consideración la naturaleza de la enzima que usa para convertir la sustancia no fitotoxina. En el caso de que el polinucleótido proporcione resistencia a múltiples herbicidas tales herbicidas pueden seleccionarse del grupo que consiste en un herbicida de dinitroanilina, triazolo-pirimidinas, un herbicida de tipo uracilo, fenilurea, tricetona, isoxazol, acetanilida, oxadiazol, triazinona, sulfonilida, amida, anilida, isoxaflutol, flurocloridona, norflurazon y triazolinona y el herbicida posterior a la aparición se selecciona del grupo que consiste en glifosato y sales del mismo, glufosinato, asulam, bentazon, bialafos, bromacilo, setoxidim u otra ciclohexanodiona, dicamba, fosamina, flupoxam, fenoxi propionato, quizalofop u otro ariloxi-fenoxipropanoato, picloram, fluormetron, butafenacilo, atrazina y otra triazina, metribuzina, clorimurón, clorsulfurón, flumetsulam, halosulfurón, sulfometrón, imazaquina, imazetapir, isoxabeno, imazamox, metosulam, piritrobac, rimsulfurón, bensulfurón, nicosulfurón, fomesafeno, fluroglicofeno, KIH9201, ET751, carfentrazona, mesotriona, sulcotriona, paraquat, diquat, bromoxinilo y fenoxaprop.

En el caso de que el polinucleótido comprenda secuencias que codifican proteínas insecticidas, estas proteínas puede seleccionarse del grupo que consiste en toxinas cristalinas derivadas de Bt, incluyendo toxinas Bt secretadas tales como las conocidas como "VIP"; inhibidores de proteasa, lectinas y toxinas de Xenhorabdus/Photorhabdus. Los genes que confieren resistencia a hongos pueden seleccionarse del grupo que consiste en los que codifican AFP conocidas, defensinas, quitinasas, glucanasas y Avr-Cf9. Son proteínas insecticidas particularmente preferidas *cryIAc*, *cryIAb*, *cry3A*, *Vip 1A*, *Vip 1B*, *Vip3A*, *Vip3B*, inhibidores de cisteína proteasa y lectina de campanilla de invierno. En el caso de que el polinucleótido comprenda genes que confieren resistencia bacteriana estos pueden seleccionarse del grupo que consiste en los que codifican cecropinas y tequiplesina y análogos de las mismas. Los genes que confieren resistencia a virus pueden seleccionarse del grupo que consiste en los que codifican proteínas de revestimiento de virus, proteínas de movimiento, replicasas virales y secuencias antisentido y de ribozimas que se sabe que proporcionan resistencia a virus; mientras que los genes que confieren resistencia a tensión, sal y sequía pueden seleccionarse de los que codifican Glutatión-S-transferasa y peroxidasa, la secuencia que constituye la secuencia reguladora de CBF1 conocida y genes que se sabe que proporcionan acumulación de trehalosa.

Los polinucleótidos usados de acuerdo con la presente invención pueden haberse "modificado" para potenciar la expresión de las secuencias codificantes de proteínas comprendidas en ellos, por que los motivos de inestabilidad de ARNm y/o las regiones de corte y empalme casual pueden haberse retirado o pueden haberse usado codones preferidos para cultivo de modo que la expresión del polinucleótido modificado de este modo en una planta produce proteína sustancialmente similar que tiene una actividad/función sustancialmente similar a la obtenida por expresión de las regiones codificantes de proteínas del polinucleótido no modificado en el organismo en el que tales regiones del polinucleótido no modificado son endógenas. El grado de identidad entre el polinucleótido modificado y un polinucleótido contenido de forma endógena dentro de dicha planta y que codifican sustancialmente la misma proteína puede ser tal que prevenga la cosupresión entre las secuencias modificadas y endógenas. En este caso el grado de identidad entre las secuencias debería ser preferentemente menos de aproximadamente 70 %. Además la secuencia alrededor de una posición de inicio de la traducción puede modificarse de modo que sea "preferida de Kozack". El experto en la materia conoce bien lo que esto significa.

La invención incluye adicionalmente plantas completas condicionalmente fértiles morfológicamente normales que resultan del cruce de plantas que se han regenerado a partir de material que se ha transformado con el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y que por lo tanto proporciona un rasgo tal. La invención también incluye descendencia de las plantas resultantes, sus semillas y partes.

Pueden seleccionarse plantas de la invención del grupo que consiste en grandes cultivos, frutas y verduras tales como colza, girasol, tabaco, remolacha azucarera, algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, remolacha, tomate, mango, melocotón, manzana, pera, fresa, plátano, melón, patata, zanahoria, lechuga, repollo, cebolla, soja spp., caña de azúcar, guisante, habas, álamo, uva, cítricos, alfalfa, centeno, avena, hierbas de césped y forraje, lino y colza y plantas productoras de nueces en la medida en que no se han mencionado específicamente ya, sus descendientes, semillas y partes.

Las plantas tales particularmente preferidas incluyen trigo, cebada, avena, arroz, maíz, mijo y sorgo.

Un procedimiento preferido para producir semillas de trigo híbridas comprende las etapas de

- (i) transformar material vegetal con un polinucleótido o vector que comprenda un gen que confiera esterilidad masculina condicional tras aplicación exógena de un proherbicida u otra sustancia no fitotóxica;
- (ii) seleccionar el material transformado de este modo; y
- (iii) regenerar el material seleccionado de este modo en plantas completas condicionalmente estériles masculinas morfológicamente normales.

- (iv) cultivar una línea parental femenina condicionalmente estéril masculina homocigota
- (v) transformar material vegetal con un polinucleótido o vector que comprenda un gen que confiere esterilidad femenina condicional tras aplicación exógena del mismo proherbicida o sustancia no fitotóxica que en (i);
- 5 (vi) seleccionar el material transformado de este modo; y
- (vii) regenerar el material seleccionado de este modo en plantas completas condicionalmente estériles femeninas morfológicamente normales.
- (viii) cultivar una línea parental masculina condicionalmente estéril femenina homocigota
- 10 (ix) plantación intercalada de dichas líneas parentales masculinas y femeninas condicionalmente estériles a una relación tal que asegure la polinización eficaz
- (x) Aplicar dicha sustancia proherbicida u otra no fitotóxica a las líneas parentales plantadas de forma intercalada a una dosis y en una etapa del desarrollo tal que minimice la autofertilización
- (xi) Recoger las semillas de trigo híbridas de las plantas parentales de plantación intercalada.

15 También se desvela un kit de diagnóstico que comprende medios para detectar las proteínas o secuencias de ADN que las codifican, que están presentes en plantas producidas de acuerdo con el presente procedimiento de la invención y por lo tanto adecuadas para identificar tejidos o muestras que las contienen. Las secuencias de ADN pueden detectarse por amplificación por PCR como se conoce por el experto en la materia, basándose en cebadores que puedan derivarse fácilmente de las secuencias codificantes de enzima que se desvelan o mencionan en la presente solicitud. Las enzimas por sí mismas pueden detectarse mediante, por ejemplo, el uso de anticuerpos

20 que se han inducido contra ellas para distinguir de forma diagnóstica las regiones antigénicas que contienen.

Puede producirse D-Fosfinotricina (D-PPT) enantioméricamente pura por un procedimiento que comprende las etapas de:

- 25 (a) Proporcionar células que contienen una enzima capaz de N-acilar de forma selectiva PPT;
- (b) Dejar crecer dichas células en un medio que contenga D-L PTT para producir medio condicionado;
- (c) Separar las células del medio condicionado de (b);
- (d) Opcionalmente extraer el medio condicionado con un disolvente no acuoso, no miscible, a diversos pH, de modo que la fracción que contiene PPT se separa de la fracción que contiene moléculas más solubles en agua que PPT;
- 30 (e) Opcionalmente mezclar con el medio extraído condicionado o que contiene PPT de la etapa (d) una resina de intercambio catiónico en su forma protonada, en una cantidad, y a un pH, suficiente para absorber una proporción sustancial de los cationes, distintos de PTT, del medio;
- (f) Mezclar con el medio condicionado, medio extraído o medio que resulta de la etapa (e) una resina de intercambio catiónico en su forma protonada, en una cantidad, y a un pH, suficiente para unir el volumen de la PTT en el medio;
- 35 (g) Recoger la resina de intercambio de iones catiónicos de la etapa (f) a la que está unida la PPT y eluir de forma selectiva PPT de ella usando un medio de elución que tenga un pH y fuerza iónica suficientes, a condición de que el pH de dicho medio de elución no sea tan bajo que provoque racemización de la PPT eluida de este modo.

40 Con respecto a la transformación de material vegetal, los expertos en la materia reconocerán que aunque se especifican tipos particulares de material diana (por ejemplo cultivo de suspensión celular embriogénico o embriones inmaduros desdiferenciados) y procedimientos particulares de transformación (por ejemplo usando *Agrobacterium* o bombardeo de partículas) en los ejemplos posteriores, la presente invención no está limitada a estas realizaciones particulares y tales materiales y procedimientos diana pueden usarse de forma intercambiable. Además la expresión "células vegetales" como se usa a lo largo de la presente descripción de la invención puede referirse a células

45 aisladas, incluyendo cultivos en suspensión así como a células en un tejido intacto o parcialmente intacto tal como embrión, escudete, microspora, embrión derivado de 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 una amplia serie de cultivos agrícolas que pueden transformarse usando procedimientos adecuados de transformación de células vegetales.

50 Se desvelan formas mutantes de enzimas D-aminoácido oxidasa y genes que las codifican en las que una lisina está presente en la posición correspondiente a la fenilalanina en la posición 58 de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* de tipo silvestre. Se desvela una forma doble mutante de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* que tiene una lisina en la posición 58 (F58K) y una serina en la posición 213 (M213S). En una realización preferida la presente invención proporciona una forma de doble mutante de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* que

55 tiene una lisina en la posición 58 (F58K) y una treonina en la posición 213 (M213T). Estas enzimas son capaces de oxidar de forma eficaz D-fosfinotricina y otros aminoácidos D cargados negativamente similares tales como aspartato y glutamato.

Estas enzimas y los genes que las codifican se usan en más aplicaciones que la generación de cultivos híbridos y, por ejemplo,

- 60 1) Las enzimas pueden usarse en dispositivos de Detección para aminoácidos D tales como D-fosfinotricina

(por ejemplo como un medio para detectar restos de pesticida). Por ejemplo la reducción de oxígeno y generación de iones de peróxido puede acoplarse a una serie de procedimientos de detección químicos o electroquímicos y usarse en un dispositivo sensor.

5 2) Las enzimas pueden usarse en procedimientos biocatalíticos para la enantiorresolución de mezclas DL de aminoácidos ácidos. Por ejemplo, el herbicida, fosfinotricina normalmente se fabrica como el racemato DL mientras que sólo la forma L es el herbicida activo. Sería deseable convertir toda la forma D a la L para conseguir una formulación de herbicida más pura y dos veces más activa por peso del agente químico. Los genes y enzimas de la presente invención proporcionan un procedimiento para conseguir esto. Por ejemplo, se añade DL fosfinotricina racémica al medio de crecimiento de una célula huésped tal como *E. coli* o levadura, etc. transformada para expresar la D-aminoácido oxidasa de *R. gracilis* F58K, M213S o la F58K, M213T. Opcionalmente, las células huésped también se modifican por ingeniería genética para expresar altos niveles de L-glutamato aminoácido transferasa. El medio de crecimiento contiene preferentemente una fuente de glutamina de modo que las células aún puedan crecer a pesar de la inhibición de la glutamina sintasa por el componente L de la fosfinotricina. Después de un tiempo adecuado se descubre que la fosfinotricina racémica en el medio se ha convertido sustancialmente toda a la forma L. El medio se toma después para proporcionar L-fosfinotricina sustancialmente pura. Procedimientos análogos que resultarán evidentes para el experto en la materia pueden, opcionalmente, usar enzimas aisladas en lugar de procedimientos de cultivo celular y, opcionalmente, pueden usar cromatografía para aislar el producto 2-ceto ácido de L-fosfinotricina residual. Estos procedimientos pueden aplicarse igualmente a la enantiorresolución de una serie de aminoácidos ácidos.

La presente invención resultará evidente adicionalmente a partir de los siguientes ejemplos no limitantes tomados junto con la Lista de Secuencias y Dibujos asociados.

SEC ID N°: 1 y 2 representan los cebadores de PCR usados para obtener la región promotora TA29.

25 SEC ID N°: 3 representa una secuencia de ADN, aislada de *Rhodotorula gracilis* que codifica una enzima que tiene la actividad de una D-aminoácido oxidasa.

SEC ID N°: 4 y 5 representan oligos degenerados usados para proporcionar D-amino oxidasa variante.

SEC ID N°: 6 y 7 representan motivos en los que pueden sustituirse aminoácidos alternativos para proporcionar D-aminoácido oxidasa variantes.

30 La Figura 1 es una representación esquemática de una construcción para transformación de tabaco que tiene D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula* bajo el control operativo de la región promotora stig 1. Los componentes indicados son LB (secuencia del extremo izquierdo), AOPR1 (promotor AoPR1), PSTIG1 (n° de acceso de EMBL X77823), RGDAO (OPT) (SEC ID N°: 7), PROMOTOR PC (n° de acceso de EMBL X16082), PAT (n° de acceso de EMBL A02774), NOS (terminador nos obtenido de n° de acceso de EMBL ATU237588) y RB (secuencia del extremo derecho).

35 La Figura 2 es una representación esquemática de una construcción para transformación del tabaco en la que la secuencia codificante de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula* está truncada por 3 codones en el extremo 3' y, en el extremo 5' (RGDAO (OPT)-SKL), se fusiona con una región que codifica un péptido de tránsito optimizado (FR2673643).

Se llevan a cabo procedimientos de biología molecular generales de acuerdo con procedimientos bien establecidos.

40 En su mayor parte los siguientes ejemplos comprenden cada uno múltiples ejemplificaciones de la presente invención. Cuando se usa la expresión "región promotora de un gen" se entiende que esta significa secuencias de ADN que comprenden el promotor, secuencias cadena arriba de promotor y también, opcionalmente, toda o parte de la secuencia de ADN que codifica la región libre 5' no traducida del ARNm.

45 **Ejemplo 1. Plantas de tabaco que son condicionalmente estériles femeninas dependiendo de la aplicación exógena de D-fosfinotricina, D-aspartato o D-glutamato.**

La secuencia de ADN que codifica la secuencia proteica de D-aminoácido oxidasa P80324 (Swissprot) dentro de la secuencia de EMBL A56901 se obtiene por RT-PCR de ARNm de *Rhodospiridium toruloides* (*Rhodotorula gracilis*) o se obtiene una similar de forma sintética (que hace más fácil controlar qué sitios de enzima de restricción internos están presentes y crear sitios flanqueantes para facilitar la clonación) como, por ejemplo, SEC ID N°: 3 que se diseña para explicar el uso codónico de la planta (en este caso trigo) y minimizar los elementos de ADN potencialmente adversos a la expresión. La secuencia de ADN se altera por mutagénesis de PCR de modo que codifica una forma mutante de la D-aminoácido oxidasa que tiene una lisina en la posición 58 en lugar de una fenilalanina (F58K) y, opcionalmente, una serina o treonina en la posición 213 en lugar de una metionina (M213S o M213T). Las secuencias de ADN sintético y cebador de PCR flanqueantes se diseñan para situar sitios de restricción únicos útiles para subclonación. Preferentemente y en el caso en el que la secuencia codificante de oxidasa no contenga sitios internos de confusión, se sitúa un sitio Nco1 o Nde1 en el extremo 5' para facilitar la

clonación de fusiones en fase con secuencias añadidas 5' de la ORF tales como las secuencias codificantes del péptido de tránsito de cloroplastos. En algunas variantes del ejemplo el gen de D-aminoácido oxidasa se clona de tal modo que los tres aminoácidos terminales están truncados y la enzima codificada por lo tanto ya no es una diana peroxisómica. En una serie adicional de variantes del procedimiento el gen se modifica por ingeniería genética por PCR de modo que codifique la D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* con aminoácidos alternativos en las posiciones 213, 223 y 238 y, en particular, cuando, en la posición 213, la metionina de tipo silvestre se reemplaza por His, Thr, Gly, Pro, Gln, Ser, Cys, Asn o Ala, la tirosina de tipo silvestre en la posición 223 se reemplaza por His, Thr, Gly, Pro, Gln, Ser, Cys, Asn o Ala y/o la tirosina de tipo silvestre en la posición 238 se reemplaza por His, Thr, Gly, Pro, Gln, Ser, Cys, Asn o Ala. La metionina en la posición "213" se identifica como la M en el motivo de secuencia de proteína nativa RCTMDSS. La tirosina en la posición 238 se identifica como la "Y" dentro del motivo de secuencia de proteína nativa GGTYGVG.

Opcionalmente, se sitúan sitios de restricción cadena arriba de las secuencias intermedias del sitio de inicio de la traducción ATG para ajustarse a las secuencias consenso traduccionales de planta tales como de acuerdo con Kozack.

El promotor delta S 13 es una región promotora útil para obtener expresión preferente en partes de flores femeninas. Esta comprende una región -339 a -79 de la región promotora SLG13 fusionada con la -46 a +8 del promotor central 35S de CMV (Dzelkalns y col (1993) Plant Cell, 5, 833-863). Esta región promotora S13 se clona en bluescript sk restringiéndose adicionalmente después dicho plásmido y ligándose con fragmentos de restricción que comprenden la región terminadora de la transcripción 3' de Nos y una u otra de las secuencias codificantes de aminoácido oxidasa para crear un casete de expresión "delta S13-D-aminoácido oxidasa -terminador Nos" dentro de un plásmido bluescript sk. Este se restringe de forma adecuada después como, por ejemplo, un fragmento EcoR1 y, como tal, se liga de nuevo en un sitio adecuado en un vector tal como pBIN19 (Bevan (1984) Nucleic Acids Res.) o pCIB200 o pCIB2001 (documento WO 98/39462) para su uso para transformación usando *Agrobacterium*. Como se describe en el documento WO 98/39462 pCIB200 contiene los siguientes sitios de restricción de poliligador únicos: EcoR1, Sst1, Kpn1, BglIII, Xba1 y Sall. PCIB2001 contiene una inserción en el poliligador que añade sitios de restricción únicos adicionales incluyendo MluI, BclI, AvrII, ApaI, HpaI y StuI. pCIB200 y pCIB2001 también proporcionan genes marcadores seleccionables para selección vegetal y bacteriana en kanamicina, extremos de ADN T izquierdo y derecho, la función trfA derivada de RK2 para movilización entre *E. coli* y otros huéspedes y las funciones oriT y oriV de RK2. Como alternativa se usa el vector binario pCIB 10 que incorpora secuencias del plásmido de amplia serie de huéspedes, pRK252 (Rothstein y col (1987) Gene 53, 153-161) o se usa uno de sus derivados que incorpora tanto genes de resistencia a kanamicina como el gen de higromicina fosfotransferasa, tal como pCIB715 (Gritz y col (1983) Gene 25, 179-188).

Como alternativa se usa la región promotora de Stig 1 de ~ 1,6 kb (derivada de acceso de EMBL X77823). Por ejemplo la región codificante del gen GUS en la construcción stig1-GUS descrita por Goldman y col (1994) en EMBO J., 13, 2976-2984, se reemplaza con la secuencia de ADN que codifica las secuencias codificantes P80324 o Q99042 usando enzimas de restricción adecuadas y la construcción de expresión de D-aminoácido oxidasa-stig1 resultante se clona en un vector adecuado tal como pCIB200 en una posición cadena arriba de una secuencia terminadora 3' adyacente a un gen marcador adecuado y entre secuencias de los extremos de ADN T.

En un ejemplo particular adicional el inserto de ADN T dentro del vector binario se construye de acuerdo con la Figura 1. Una construcción que comprende la secuencia de ADN sintético (SEC ID N°: 3) que codifica D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* alterada por mutagénesis por PCR de modo que codifique una forma mutante de D-aminoácido oxidasa que tiene una lisina en la posición 58 en lugar de una fenilalanina (F58K) y, una serina o treonina en la posición 213 en lugar de una metionina (M213S o M213T) bajo el control operativo de la región promotora de stig1 y también la secuencia de ADN (A02774) que codifica L-fosfinotricina N-acetil transferasa (PAT) bajo el control operativo de la región promotora de plastocianina de guisante se clona en un sitio entre el gen LB/ npt II y el RB del ADN T del vector binario. En breve, la SEC ID N°: 3 alterada que codifica el mutante doble (F58K, M213S o F58K, M213T) se clona en plásmido pFse4-Stignos (descrito en el documento WO 99/42598) detrás del promotor Stig1 y delante de la región terminadora Nos (comprendida dentro de EMBL: ATU237588) como un fragmento NcoI/PstI. La región promotora de plastocianina de guisante (derivada de número de Acceso EMBL X16082) se obtiene de ADN genómico de guisante por PCR y se clona delante del terminador nos/gen PAT. El casete PC-PAT-nos resultante se clona detrás de 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 procedimiento la construcción usada está de acuerdo con la representación esquemática de la Figura 2. La secuencia codificante de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula*, SEC ID N°: 3, mutada de nuevo de forma dirigida para codificar la forma de doble mutante F58K, M213S o F58K, M213T de la enzima, se trunca por tres codones en el extremo 3' y, en el extremo 5', se clona para situarla inmediatamente cadena arriba de una región que codifica un péptido de tránsito de cloroplastos de modo que se codifica una proteína de fusión de D-aminoácido oxidasa/péptido de tránsito de cloroplastos. La secuencia que codifica el péptido de tránsito de cloroplastos deriva del gen de *Arabidopsis* que codifica la subunidad pequeña de EPSP sintasa (Klee y col 1987 in Mol.Gen.Genet., 210, 437). Opcionalmente esta se modifica para incluir el sitio Sph1 en el sitio de procesamiento de CTP reemplazando de este modo el Glu-Lys en esta localización con Cys-Met (SEC en la Figura 9 del documento WO 92/044490). En consecuencia, un sitio Sph 1 puede modificarse por ingeniería genética en el

extremo N terminal de la secuencia codificante de D-aminoácido oxidasa (convirtiendo el aminoácido después de la metionina a una leu). Como alternativa la secuencia codificante del péptido de tránsito de cloroplastos deriva del gen de petunia que codifica EPSP sintasa (Figura 11 del documento WO 92/044490). Como alternativa la secuencia codificante de cloroplasto es una cualquiera de una gran variedad de posibilidades incluyendo las derivadas de genes que codifican la subunidad pequeña de Rubisco e incluyendo la llamada secuencia de péptido de tránsito quimérico "optimizado" (FR 2673643). En todos los casos, en lugar de basarse en la subclonación, la secuencia de ADN deseada completa que codifica el polipéptido de fusión de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula* doble mutante/péptido de tránsito de cloroplasto puede simplemente obtenerse de forma sintética. Esta secuencia se clona en un sitio cadena abajo de la región promotora *stig1* y cadena arriba de una secuencia terminadora (por ejemplos nos) dentro de un vector adecuado (por ejemplo reemplazando la secuencia codificante de GUS en el vector que contiene la construcción *stig1*→ GUS descrita por Goldman y col (1994) en EMBO J., 13, 2976-2984). La construcción de expresión del gen completo se clona después en un sitio adecuado entre los extremos derecho e izquierdo del ADN T de un vector PVB6.

Se transforman discos de hojas de tabaco con los vectores binarios recombinantes usando procedimientos similares a los descritos en Horsch y col (1985) Science, 227, 1229-1231. Pueden usarse muchas variaciones del procedimiento. El vector binario puede transformarse en, por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 4404 usando el procedimiento de transformación de congelación y descongelación. Se realiza la transformación del tabaco y regeneración de planta completa usando *Nicotiana tabacum* variante Samsun de acuerdo con los protocolos descritos por Draper y col (Plant Genetic Transformation, Blackwell Sci. Pub. 1989). Se seleccionan acontecimientos de transformación en medio MS que contiene kanamicina u otro antibiótico adecuado. La presencia de transgenes integrados se confirma por PCR. Las plantas se regeneran y se permite que alcancen la madurez y se autosiembran para producir semillas. Se usa análisis de Northern y/o Western para confirmar expresión específica de tejido de los genes de D-aminoácido oxidasa. Las plantas seleccionadas son autofértiles pero tienen la condición de esterilidad femenina condicional. Se siembran semillas de la generación T1. Una vez que han crecido plántulas a un tamaño suficiente se ensayan por PCR con respecto a la presencia de transgén. Las plantas positivas para PCR se transfieren al invernadero. Estas plantas son completamente fértiles en ausencia de proherbicida aplicado de forma exógena. Un subconjunto de estas plantas condicionalmente estériles (potencialmente) se tratan con D-fosfinotricina, D-aspartato o D-glutamato en diversas cantidades y en diversas etapas del crecimiento. Tales tratamientos se llevan a cabo en las plantas T1 confirmadas como positivas por PCR para el gen de D-aminoácido oxidasa o, igualmente, tres tratamientos se llevan a cabo directamente en plantas de la generación T0 (que se clonan de forma vegetativa de modo que pueden separarse clones no tratados de cada acontecimiento para producción de semillas). La fertilidad observada se usa después como base para seleccionar líneas vegetales adecuadas que muestren el fenotipo de esterilidad condicional más evidente. Por ejemplo estos aminoácidos son D-enantiómeros puros o, como alternativa, son racematos DL. Por ejemplo, se aplican como una pulverización foliar, antes de o durante las etapas tempranas de formación de flores, a tasas habitualmente entre 0,25 y 20 kg/ha. Pueden redisolverse aminoácidos que pueden cristalizar fuera de la solución en las hojas después de aplicación foliar y volver a movilizarse para captación por las hojas por aplicaciones adicionales de agua como una bruma de pulverización. También se aplican aminoácidos, por ejemplo, como una poción de raíces y, opcionalmente, se aplica adicionalmente como 50 µl de una solución 10-200 mM derramada directamente en los capullos de florecillas emergentes. Se recoge polen de las plantas tratadas y se ensaya la viabilidad. Se obtienen plantas que producen relativamente poca o ninguna semilla después del tratamiento con D-fosfinotricina, D-aspartato o D-glutamato pero que, no obstante, en las mismas condiciones de tratamiento producen niveles casi normales de polen viable. Los controles incluyen plantas tanto transgénicas como no transgénicas y se cultivan en condiciones idénticas y en un régimen idéntico de tratamientos físicos excepto que las soluciones de tratamiento son agua o una concentración equivalente de aminoácido L puro.

En una variante del procedimiento, el aminoácido aplicado es fosfinotricina DL racémica. En este caso, la construcción de ADN usada para transformación comprende, además de la secuencia de ADN que codifica una D-aminoácido oxidasa bajo control de expresión operativo de una región promotora floral femenina específica de tejido tal como "stig 1", también una secuencia de ADN (EMBL: A02774) un gen "PAT" bajo el control operativo de una región promotora tal como la región 5' del inicio de traducción del gen de plastocianina del gen de plastocianina de *Pisum sativum* (número de acceso de EMBL X16082). Por ejemplo, la construcción es la misma que la representada en la Figura 1.

La región promotora de plastocianina posibilita la expresión preferente en los tejidos verdes de la planta. Se descubre, inesperadamente, que un promotor tal que, a diferencia de, por ejemplo, la región promotora 35S, se expresa sustancialmente solamente en ciertos tejidos de la planta y más notablemente en tejidos verdes, no obstante, cuando se usa en combinación con el gen PAT posibilita tolerancia reproductora sustancialmente completa al herbicida DL PPT incluso a tasas por encima de 2 kg/ha. Además, en ausencia de la D-aminoácido oxidasa heteróloga que se coexpresa en los tejidos florales, la combinación de gen PAT/plastocianina proporciona tolerancia reproductora esencialmente completa sin pérdida significativa de rendimiento a pesar de que el nivel de expresión de PAT sea bajo o no existente en muchos de los tejidos florales críticos cuando se expresa bajo control de esta región promotora. Por lo 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 momentos de pulverización apropiados y a tasas entre 250 g/ha y 5 kg/ha de DL fosfinotricina las plantas tratadas no

están visiblemente dañadas pero se hacen condicionalmente estériles femeninas permaneciendo con fertilidad masculina normal o casi normal.

Ejemplo 2. Plantas de tabaco que son condicionalmente estériles masculinas dependiendo de la aplicación exógena de D-fosfinotricina, D-aspartato o D-glutamato

- 5 Las secuencias proteicas de D-aminoácido oxidasa mutantes y las secuencias de ADN que las codifican son como en el ejemplo precedente, Ejemplo 1.

La región promotora TA29 (Kriete y col (1996) Plant J., 9, 808-818) se clona del ADN genómico del tabaco por PCR usando los cebadores 5'-AACTGCAGCTTTTGGTTAGCGAATGC-3' (SEC ID N°: 1) y 5'-CAGACTAGTTT-TAGCTAATTTCTTTAAGTAAAAAC-3' (SEC ID N°: 2). A través de una serie de etapas de restricción y subclonación el fragmento de PCR obtenido de este modo se coloca cadena arriba de la secuencia codificante de D-aminoácido oxidasa y un terminador transcripcional nos se añade 3' de la región codificante. El casete de expresión de terminador nos-D-aminoácido oxidasa-TA29 resultante se clona después, se obtiene como un fragmento de restricción adecuado y se clona en un vector binario como en el Ejemplo 1.

10 Como alternativa, se clona cualquiera de las regiones de secuencia codificantes de D-aminoácido oxidasa anteriores como un fragmento de restricción adecuado (por ejemplo BamH1, Bgl/II en el que se diseñan variantes sintéticas de secuencias codificantes para retirar sitios de restricción internos) y se fusionan con el promotor 35S de CaMV y las regiones terminadoras de nopalina sintasa por inserción en (por ejemplo) el sitio BamH1 del vector binario pROK1 (Baulcombe y col (1986) Nature, 321, 446-449) en una configuración sentido. El fragmento EcoR1-BamH1 que porta la región promotora 35S se escinde después y se reemplaza con un fragmento EcoR1-BamH1 de pAP30 (Kriete y col (1996) The Plant Journal 9, 809-818) que porta el fragmento de región promotora TA29s (-810 a + 54). Los vectores resultantes pueden denominarse pGKTA29_Q99042, pGKTA29_P80324, pGKTA29_Q9HGY3 y pGKTA29_P24552 etc. de acuerdo con la secuencia proteica codificada.

15 Se transforma material de planta del tabaco, mediante *Agrobacterium*, con vector y se regeneran plantas transgénicas de forma similar a la descrita en el ejemplo anterior. Las plantas producidas son autofértiles pero son condicionalmente estériles masculinas. Las semillas de la generación T1 se plantan pero en suelo. Una vez que las plántulas han crecido hasta un tamaño suficiente se ensayan por PCR con respecto a la presencia de transgén. Se transfieren plantas positivas para PCR al invernadero. Estas plantas son completamente fértiles en ausencia de proherbicida aplicado de forma exógena. Un subconjunto de estas plantas T1 potencialmente condicionalmente estériles o, como alternativa, plántulas de "acontecimientos" T0 (regenerantes directos de transformación) se tratan con D-fosfinotricina, D-aspartato o D-glutamato en diversas cantidades y en diversas etapas del crecimiento. Cuando se tratan plantas T0 estas se clonan de forma vegetativa de modo que se separan las hermanas no tratadas de los acontecimientos para producción de semillas. La fertilidad observada se usa después como base para seleccionar líneas vegetales adecuadas que muestran el fenotipo de esterilidad condicional más evidente. Por ejemplo estos aminoácidos son D enantiómeros puros o, como alternativa, son racematos DL. Por ejemplo, se aplican como una pulverización foliar, antes o durante las etapas tempranas de la formación de la flor, a tasas habitualmente entre 0,25 y 20 kg/ha. Los aminoácidos que pueden cristalizar a partir de solución en las hojas después de aplicación foliar pueden redisolverse y volver a movilizarse para captación por las hojas por aplicaciones adicionales de agua como una bruma de pulverización. También se aplican aminoácidos, por ejemplo, como una poción de raíz y, opcionalmente, se aplican adicionalmente como una solución 10-200 mM directamente en los capullos de florecillas emergentes.

20 Se recoge polen de las plantas tratadas y se ensaya su viabilidad. Se obtienen plantas que desprenden relativamente poco o ningún polen y/o polen que no es viable. Se ensaya polen recogido de algunas de las plantas tratadas y se descubre que está mal formado y no es viable. Sin embargo, tales plantas masculinas infértiles siguen siendo femeninas fértiles y producen semilla (híbrida) cuando se polinizan con polen recogido de otras plantas de tabaco no transgénicas no tratadas o condicionalmente estériles femeninas. Los controles incluyen plantas tanto transgénicas como no transgénicas y se dejan crecer en condiciones idénticas y en un régimen idéntico de tratamientos físicos excepto que las soluciones de tratamiento son agua o una concentración equivalente de aminoácido L puro.

25 En una realización alternativa la región promotora usada es una región de 2,2 kb (referencia EMBO X57295) de cadena arriba del gen tap 1 de *Antirrhinum* (Spena y col (1992), Theor. Appl. Genet., 84, 520-527).

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 transformación comprende, además de la secuencia de ADN que codifica una D-aminoácido oxidasa bajo el control de expresión operativo de una región promotora floral masculina específica de tejido tal como "TAP 1" o "TA 29", también una secuencia de ADN que codifica un gen de fosfinotricina N-acetil transferasa tal como el gen "PAT" bajo el control operativo de una región promotora tal como la del gen de plastocianina (en este caso la región del gen de plastocianina de *Pisum sativum*). En momentos de pulverización apropiados y tasas entre 250 g/ha y 5 kg/ha de DL fosfinotricina las plantas tratadas no están visiblemente dañadas pero se hacen condicionalmente estériles masculinas permaneciendo a la vez con fertilidad femenina normal o casi normal.

Ejemplo 3. Genes quiméricos capaces de expresarse preferentemente en las estructuras reproductoras masculinas de trigo y codificar enzimas capaces de oxidar D-fosfinotricina, D-glutamato o D-aspartato.

Las secuencias proteicas de D-aminoácido oxidasa mutantes y las secuencias de ADN que las codifican son como en el Ejemplo 1. El plásmido pGK73 porta el fragmento EcoR1-BamH1 de región promotora TA29s de -810 a +54 (Kriete y col (1996), 9, 809-818). Este fragmento de restricción o un fragmento generado por PCR adecuado similar se clona, preferentemente como una fusión en fase, en una posición cadena arriba de la secuencia de ADN que codifica, por ejemplo, la D-aminoácido oxidasa de *R. gracilis* doble mutante (F58K, M213S o F58K, M213T) en bluescript sk. Usando una serie adecuada de etapas de restricción, ligación y subclonación se añade un terminador de la transcripción nos 3' de la región codificante para generar, de acuerdo con la secuencia codificante, casetes de expresión alternativa del tipo TA29-carboxilesterasa-nos en plásmidos Bluescript sk, pBLTA_RGF58KM213T, pBLTA_RGF58KM213S etc.

En un ejemplo adicional, se usa la región promotora SGB6 específica de antera SEC ID N°: 1 del documento USP 5470359. Por ejemplo, pSGBNE1 que contiene un fragmento subclonado EcoR1-Nhe1 genómico de 3 kb de pSGB6g1 (documento USP 5470359) se subclona adicionalmente para situar un fragmento Apall/Xba1 de 1558 pb clonado como en bluescript ks en el sitio SmaI. Como antes, a través de etapas de restricción y clonación adicionales este fragmento se fusiona en fase cadena arriba de una secuencia codificante de ADN de D-aminoácido oxidasa mutante. De nuevo se añade un terminador nos 3' de la región codificante para crear, como alternativa, plásmidos Bluescript sk, pBLB6_RGF58K etc. que comprenden los casetes de expresión alternativos SGB6-DAMOX-nos.

En un conjunto similar de ejemplos la región promotora específica de antera RA8 de arroz (acceso de genbank/EMBL AF042275; Jeon y col (1999) PMB, 39, 35-44; documento WO 00/26389) se fusiona también de forma similar en un sitio en fase y cadena arriba de una u otra de las secuencias de ADN que codifican la D-aminoácido oxidasa mutante F58K y un terminador 3' nos para comprender casetes de expresión RA8-DAMOX-nos alternativos en una serie de vectores bluescript sk, pBLRA8_RGF58K,M213S etc.

Ejemplo 4. Genes quiméricos capaces de expresarse preferentemente en las estructuras reproductoras femeninas de trigo y codificar enzimas capaces de oxidar D-fosfinotricina, D-aspartato y/o D-glutamato

Se obtienen secuencias de ADN que codifican secuencias proteicas de D-aminoácido oxidasa como se ha descrito en el Ejemplo 1.

El clon genómico pSH64 se depositó según los términos del tratado de Budapest el 27/02/1998 en NRRL y se asignó el número NRRL B-21920. Se detectó como un clon genómico que hibrida con el clon de ADNc específico de seda B20014-2 (documento WO 98/39462). Se construyen genes quiméricos que se expresan preferentemente en estructuras reproductoras femeninas como sigue. Se construye un plásmido derivado de bluescript ks similar a pSH70 que tiene un casete de expresión "vacío" que comprende, de 5' a 3', la región promotora 5' B200i que consiste en los nucleótidos 1-3790 de SEC ID N°: 11 del documento WO 98/39462, un sitio BamH1 y la región terminadora no traducida 3' B200i que comprende los nucleótidos 4427-6397 de SEC ID N°: 11 del documento WO 98/39462 como se describe en el documento WO 98/39462. Usando una digestión por BamH1 parcial o, como alternativa por subclonación adicional, se ligan secuencias codificantes de D-aminoácido oxidasa alternativas de etapas de PCR y ligación en la posición en o adyacentes al sitio BamH1 de modo que estén inmediatamente 3' de la región promotora B200i y 5' de la región terminadora B200i. En consecuencia, se crea una serie de vectores bluescript pBLB200_RGF58K, pBLB200_RGF58KM213T, pBLB200_RGF58KM213S etc. que codifican casetes de expresión B200i-D-aminoácido oxidasa mutante alternativos.

Como alternativa, como se describe en el documento WO 98/39462, se escinde un fragmento Pst I/Nco I de la región promotora 5' del gen P19 del clon genómico X2-1 que se depositó según los términos del tratado de Budapest el 27/02/1998 en NRRL y se le asignó el número de acceso B-21919. El sitio Nco I en el nucleótido 1088 de SEC ID N°: 14 del documento WO 98/39462 corresponde al inicio de la traducción ATG del gen P 19. Usando etapas de subclonación, restricción, ligación y PCR apropiadas este fragmento se liga para formar una fusión en fase con una u otra de las secuencias de ADN que codifican D-aminoácido oxidasa y se añade una secuencia terminadora nos 3' de la secuencia codificante. En consecuencia, se crea una serie de vectores bluescript pBLP19_RGF58KM213S, pBLP19_RGF58KM213T etc. que codifican los casetes de expresión nos-D-aminoácido oxidasa-P19 alternativos. Como alternativa, usando procedimientos convencionales similares, se obtienen plásmidos similares que tienen la región promotora 5' (que comprende algunos o todos los nucleótidos 1-3987 de SEC ID N° 2 del documento WO 98/39462) del gen P26 en lugar de la región promotora P19. El clon genómico P26-A4, pCIB10302 depositado según los términos del tratado de Budapest el 21 de enero de 1997 en la colección de cultivo de patentes del Servicio de Investigación Agrícola (NRRL), número de acceso NRRL B-21655 se subclona como se describe en el documento WO 98/39462. En consecuencia, se crea una serie de vectores bluescript pBLP26_RGF58KM213T, pBLP26_RGF58KM213S etc. que codifican casetes de expresión nos-D-aminoácido oxidasa-P19 alternativos.

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

La primera construcción de ADN adecuada para proporcionar una línea vegetal de arroz o cereal parental endogámica femenina que es condicionalmente estéril masculina 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-acetil L-fosfinotricina bajo el control operativo de la región promotora de ~ 1 kb del gen de plastocianina de cebada (EMBL: Z28347) y una región terminadora adecuada tal como la del gen 35S o nos, B) consiste en una secuencia codificante de PAT similar a la primera pero en este caso bajo el control operativo de una región promotora floral femenina específica de tejido (tal como P19 o P26 como se ha descrito anteriormente) más un terminador adecuado y C) consiste en una secuencia codificante de DAMOX adecuada como se ha descrito en los Ejemplos 1, 10 y 11, que codifican, por ejemplo, un mutante doble o triple de la forma mutante F58K de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* que tiene cambios en las posiciones 213, 223 y 238 y, en particular, en la que, en la posición 213, la metionina de tipo silvestre se reemplaza por His, Thr, Gly, Pro, Gln, Ser, Cys, Asn o Ala, la tirosina de tipo silvestre en la posición 223 se reemplaza por His, Thr, Gly, Pro, Gln, Ser, Cys, Asn o Ala y/o la tirosina de tipo silvestre en la posición 238 se reemplaza por His, Thr, Gly, Pro, Gln, Ser, Cys, Asn o Ala bajo el control operativo de una región promotora floral masculina específica de tejido (tal como SGB6 o RA8 como se ha descrito anteriormente) y una región terminadora adecuada. En ejemplos preferidos la enzima DAMOX de *R. gracilis* codificada es una forma mutante doble F58K, M213S o F58K, M213T. Esta construcción se ensambla usando procedimientos que son convencionales en la técnica e informados por los ejemplos anteriores.

La segunda construcción de ADN adecuada para proporcionar una línea vegetal de arroz o cereal parental endogámica masculina que es condicionalmente estéril femenina 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-acetil L-fosfinotricina bajo el control operativo de la región promotora del gen de plastocianina de cebada y una región terminadora adecuada tal como la del gen 35S o nos, D) consiste en una secuencia PAT similar a la primera pero en este caso bajo el control operativo de la misma región promotora floral masculina específica de tejido (tal como SGB6 o RA8P19) que se usa en la construcción 1 más un terminador adecuado y F) consiste en un gen DAMOX adecuado como, por ejemplo, el usado en la construcción 1 y bajo el control operativo de la misma región promotora floral femenina específica de tejido (tal como P 19 o P26) que se usan en la construcción 1 y una región terminadora adecuada. Esta construcción se ensambla usando procedimientos que son convencionales en la técnica e informado por los ejemplos anteriores.

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

30 Construcción 1

A = Región promotora de plastocianina de cebada → secuencia codificante de PAT, terminador Nos;
 B = región promotora P26 → secuencia codificante de PAT, terminador 35S;
 C = región promotora RA8 → secuencia codificante de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula* (mutante F58K, M213T) terminador Nos

35 Construcción 2

A = Región promotora de plastocianina de cebada → secuencia codificante de PAT, terminador Nos;
 D = región promotora RA8 → secuencia codificante de PAT, terminador 35S;
 E = región promotora P26 → secuencia codificante de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula* (mutante F58K, M213T) terminador Nos

40 **Ejemplo 6. Vectores polinucleotídicos para transformación de trigo**

Los ejemplos 3, 4 y 5 describen la construcción de diversos genes quiméricos en casetes de expresión que habitualmente se clonan en bluescript sk. Opcionalmente estos vectores se preparan a granel para transformación de ADN directa para su uso con un marcador seleccionable bombardeado conjuntamente tal como pSOG35 (DHFR/metotrexato) o pUbi-Hyg (higromicina fosfotransferasa/higromicina) como se describe en el documento WO 98/39462. Preferentemente, después de la preparación a granel, los vectores se linealizan usando una enzima de restricción adecuada para retirar el gen de resistencia a ampicilina de bluescript.

Opcionalmente, en lugar de usar bombardeo conjunto dichos vectores bluescript se modifican adicionalmente por ingeniería genética mediante procedimientos convencionales de modo que comprenden adicionalmente un gen marcador seleccionable vegetal tal como gen de resistencia a kanamicina, resistencia a higromicina, resistencia a metotrexato o resistencia a glifosato y se usan directamente. En algunos de los ejemplos anteriores un gen de PAT es integral para el diseño del vector y, en estos casos, puede usarse opcionalmente DL fosfinotricina para la selección en alguna etapa después de la transformación.

Como alternativa, se escinden casetes de expresión dentro de un fragmento de restricción adecuado y se clonan en vectores derivados de pIGPD9 (descrito en la Figura 12 del documento WO 00/66748). El uso de este vector para transformación evita la transferencia de genes marcadores antibióticos a la planta puesto que su mantenimiento en bacterias se basa en complementación de un mutante autotrófico de *E. coli*. El vector comprende un gen que expresa IGPD (el producto de HisB) y se modifica por ingeniería genética adicionalmente para comprender un gen marcador seleccionable vegetal tal como un gen EPSPS clonado en el sitio Xma I como, por ejemplo, en pZEN16i y

pZEN18i del documento WO 00/66748. Como alternativa se usa un gen marcador que proporciona selección positiva en manosa o xilosa (documento USP 5767378).

5 En ejemplos particulares de uso de vectores pIGPD9, se construyen plásmidos para transformación de trigo. Son ejemplos ilustrativos pZEN18_BLB200_Q99042 y pZEN18_BLRAB_Q01470. Estos son vectores derivados de pIGPD9 que comprenden el gen EPSPS de pZEN18 (documento WO 00/66748) y, en este caso, los casetes de expresión B200i-D-aminoácido oxidasa-B200i o RA8-D-aminoácido oxidasa-nos, respectivamente.

Se obtienen preparaciones de ADN a gran escala para su uso en transformación de plantas usando el procedimiento de Maxiprep (Qiagen) usando protocolos proporcionados por el fabricante.

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

15 En un ejemplo, se siembran en placas embriones inmaduros (0,75-1,0 mm de longitud) de genotipo UC703 en medio MS que contiene 3 mg/l 2,4-D y sacarosa al 3 %. Después de aproximadamente 4 horas los embriones se siembran en placas en medio MS que contiene maltosa 15 %, sacarosa 3 % y 3 mg/l 2,4-D superpuesto con un bloque de agarosa soportado por papel de filtro que contiene los mismos componentes. Se permite que los embriones plasmolícen durante 2-3 horas antes del bombardeo.

20 Se precipita ADN preparado como se ha descrito en el Ejemplo 6 y en los ejemplos anteriores en partículas de oro de tamaño micrométrico usando procedimientos convencionales. Se disparan dos veces cuatro placas diana con 16 embriones por diana con un dispositivo de helio DuPont Biolistics usando una presión de explosión de 7,58 MPa. Se disparó a las placas con una pantalla de malla 80 situada entre la tapa de vehículo y la diana. Después de situarse dianas de bombardeo en oscuridad a 25 °C durante 24 horas antes de que los bloques con los embriones se sitúen en las placas de medio MS que contiene sacarosa 3 % y 2,4-D 3 mg/l. Los embriones individuales se retiran de los bloques y se sitúan directamente en medio fresco de la misma composición después de otras 48 horas. Aproximadamente 6 semanas después del suministro génico el tejido se sitúa en medio MS con 2,4-D 3 mg/l, sacarosa 3 % y metotrexato 0,2 mg/l durante un periodo de 3 semanas. El tejido se sitúa después en medio de regeneración comprendido por medio MS que contiene ribósido de zeatina 1 mg/l y metotrexato 1 mg/l. Después de 25 2 semanas se sitúan las plántulas en regeneración en recipientes estériles con medio MS a mitad de concentración que contiene sacarosa 2 %, ácido naftalínico 1 mg/l y metotrexato 4 mg/l.

30 En variantes particulares del ejemplo los vectores que comprenden genes quiméricos preferentemente expresados en estructuras reproductoras masculinas se bombardean conjuntamente con genes marcadores seleccionables alternativos. Por lo tanto, por ejemplo, se prepara ADN de plásmidos y se revisten con él partículas de oro junto con pUbiHyg (un plásmido que codifica higromicina fosfotransferasa bajo el control operativo del promotor de poliubiquitina de maíz). En este caso se lleva a cabo transformación y regeneración como se ha descrito anteriormente excepto que, después del bombardeo, el medio de regeneración contiene concentraciones crecientes de higromicina entre 2 y 20 mg/l.

En un ejemplo adicional se transforma trigo con pZEN18_BLB200_RGF58KM213S (D-aminoácido oxidasa), se selecciona usando glifosfato y se regenera como se ha descrito en el Ejemplo 15 del documento WO 00/66748.

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

45 **Ejemplo 8. Un procedimiento para producir de forma eficaz cultivos de cereales híbridos en los que se aplica DL fosfinotricina tanto para control de malas hierbas como al mismo tiempo como el agente de hibridación química y en el que la generación de híbrido F1 de plantas resultantes de la semilla híbrida producida de este modo es sustancialmente tolerante tanto de forma vegetativa como reproductiva a la aplicación de DL fosfinotricina.**

50 Los agentes químicos de hibridación son caros. Sería deseable usar una sustancia relativamente barata tal como un herbicida comercial como un agente de hibridación químico. Esto conseguiría además eficacia adicional puesto que podría combinarse el control de malas hierbas con hibridación química. Sin embargo existen varios problemas a superar para que esta proposición se realice. En primer lugar, se necesitaría establecer líneas parentales masculinas y femeninas que sean tolerantes al herbicida en cuestión. Además, para conseguir la fertilidad "condicional" deseada en respuesta a aplicación del herbicida las dos líneas necesitarían modificarse por ingeniería genética de tal modo que la tolerancia al herbicida no se extendiera a todos los tejidos sino que se expresara de una manera específica de tejido de modo que cada uno de los tejidos florales requeridos permaneciera selectivamente susceptible. Por lo tanto, en una línea (la línea parental femenina), el volumen de la planta más el tejido femenino

deben hacerse tolerantes a la vez que alguna parte crítica del tejido floral masculino debe permanecer susceptible a la aplicación mientras que en la otra (la línea parental masculina), se necesita lo inverso permaneciendo susceptible solamente cierta parte crítica del tejido formador de gametos femeninos. Incluso concediendo que esto puede conseguirse sigue existiendo un problema adicional a superar con respecto a la semilla híbrida y generación F1.

5 Dado que esta generación del cultivo contendría, necesariamente, al menos dos genes capaces de conferir resistencia al herbicida sería deseable que este mismo herbicida también pudiera usarse para control de 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 permitieran este uso del mismo herbicida en la generación F1. Sería probable que el cultivo híbrido presentara tolerancia vegetativa pero poco o ningún rendimiento de grano después de la aplicación del herbicida a la generación F1. Por ejemplo, para el herbicida glifosato el mecanismo habitual de resistencia es la expresión de una forma resistente de EPSP sintasa. Es difícil identificar una región promotora o combinación de regiones promotoras que permitieran suficiente expresión de una R-EPSPS en todos los tejidos y en todos los momentos distintos de, por ejemplo, en una etapa crítica en el desarrollo de estambres o estigmas. La forma más sencilla de evitar esto sería usar un enfoque antisentido o similar en el que la expresión de R-EPSPS esta dirigida por un promotor constitutivo/no específico de tejido y sólo suprimido localmente y transitoriamente en, por ejemplo, los estambres debido a la expresión de un gen de EPSPS antisentido (véase por ejemplo el documento WO 99/46396). Sin embargo, en ese caso la supresión de expresión en el estambre (o estigma) se dirigiría por un gen dominante. Resulta evidente que, para cualquier mecanismo tal, la aplicación del herbicida a la generación F1 daría como resultado un cultivo estéril no productivo debido a los efectos aditivos de los genes de esterilidad condicionales masculinos y femeninos dominantes.

La presente invención proporciona un procedimiento para superar el problema de permitir el uso de un herbicida comercial barato, DL fosfinotricina, tanto como control de malas hierbas como agente de hibridación en la producción de cereales híbridos y proporcionando dicho procedimiento, además, cereales o arroz híbridos resultantes en los que puede usarse de forma segura DL fosfinotricina (o L-fosfinotricina) para control de malas hierbas sin pérdida sustancial de rendimiento. Como un beneficio adicional más, las semillas autosembradas de la generación F1 que pueden surgir más tarde como voluntarias en cultivos posteriores serán más fáciles de controlar puesto que ellas, en sí mismas, generalmente serán estériles si se pulverizan con cantidades de control de DL fosfinotricina. Lo mismo se mantiene para la descendencia de polinización cruzada de polen de las plantas F1 a malas hierbas (por ejemplo arroz rojo) u otros cereales. La presente invención proporciona genes y enzimas que convierten un componente no fitotóxico, D-fosfinotricina, de una DL fosfinotricina de formulación en herbicida comercial, a la forma L activa. El gen PAT que convierte L fosfinotricina a N-acetil L-fosfinotricina ya se conoce y se usa comercialmente para evitar tolerancia a DL fosfinotricina en cultivos. Una observación crítica adicional que atañe al presente ejemplo es que, sorprendentemente, se ha descubierto que el trigo que contiene un gen de PAT bajo el control de la expresión operativo de la región promotora de plastocianina de cebada es sustancialmente reproductivamente tolerante a la aplicación de DL fosfinotricina a tasas de hasta al menos 2kg/ha. Por lo tanto una característica crítica de las construcciones descritas en el Ejemplo 6 que se usan para proporcionar las plantas del presente ejemplo es que el gen de PAT que proporciona el rasgo de resistencia se expresa bajo el control operativo de una región promotora que proporciona expresión sustancialmente solamente en los tejidos verdes. Una característica de una región promotor útil tal es que debería expresar PAT de una manera tal que proteja adecuadamente todos los tejidos florales no verdes de DL fosfinotricina aplicada de forma foliar mientras que, a la vez, proporciona solamente un nivel mínimo de expresión de PAT en el tejido floral en sí mismo y especialmente bajo en las partes diana para esterilidad condicional. Con PAT expresado bajo el control operativo de la región promotora de plastocianina de cebada parece cumplirse esta condición puesto que sustancialmente toda la L-fosfinotricina que se pulveriza entra a través de las hojas y se intercepta y convierte a N-acetil-L-fosfinotricina no fitotóxica antes de que se transloque a los tejidos florales en desarrollo. Por lo tanto, en la presente invención, la L-fosfinotricina que provoca los efectos de esterilidad selectiva de tejido en las líneas parentales se genera solamente de forma transitoria y localmente de D-fosfinotricina no fitotóxica móvil del floema mediante D-aminoácido oxidasa. Haciendo coincidir de forma exacta los elementos de control floral que dirigen la expresión de PAT con los elementos que dirigen la expresión de D-aminoácido oxidasa en el par complementario de construcciones (Ejemplo 5) se asegura que, en el híbrido F1, la explosión transitoria de L-fosfinotricina en el tejido floral diana se neutralizará rápidamente por una explosión correspondiente de expresión de PAT en el mismo momento y en el mismo tejido local. Por lo tanto la aplicación del herbicida no induce efecto de esterilidad en el híbrido. Sin embargo, en generaciones posteriores, la D-aminoácido oxidasa y PAT correspondientes floralmente del híbrido se segregarán y por lo tanto, una vez más, las plantas resultantes serán estériles masculinas o femeninas tras la aplicación de cantidades de control de DL fosfinotricina.

Usando los procedimientos descritos en los Ejemplos 6 y 7, las construcciones descritas en el Ejemplo 5 se transforman en levadura o (usando procedimientos de vector superbinario convencionales) en arroz que se selecciona y se regenera en plántulas. Se seleccionan acontecimientos transformantes T0 (usando propagación clonal de brotes para mantener líneas no tratadas) y acontecimientos adecuados para continuar el cultivo como, como alternativa, líneas parentales endogámicas masculinas que son condicionalmente estériles femeninas dependiendo de la aplicación de DL fosfinotricina o líneas endogámicas femeninas que son condicionalmente estériles masculinas dependiendo de la aplicación de DL fosfinotricina se seleccionan usando procedimientos esencialmente como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2. Las mejores líneas muestran la mejor tolerancia a herbicida, mínima pérdida de rendimiento, fenotipo de esterilidad condicional más evidente etc. Las líneas parentales

masculinas y parentales femeninas alternativas se seleccionan y, opcionalmente, se retrocruzan en líneas de elites adecuadas para varias generaciones. Los insertos genéticos en estos acontecimientos finalmente seleccionados se caracterizan completamente así como la genética de la herencia de los rasgos de fertilidad condicional y resistencia a herbicida y las características de productos génicos expresados.

5 Las líneas parentales femeninas y masculinas seleccionadas de este modo se plantan después de forma intercalada
 10 juntas en relaciones adecuadas en un campo y se pulverizan con DL fosfinotricina a una tasa adecuada entre 0,05 y
 5 kg/ha y seleccionando el momento hasta el periodo de floración temprana para optimizar la producción de semillas
 híbridas. Las semillas producidas de este modo tienen la ventaja de que darán lugar a plantas que no solamente se
 15 benefician de vigor híbrido sino que también son tolerantes a las formulaciones de herbicida que contienen DL
 fosfinotricina que pueden usarse por lo tanto para control de malas hierbas selectivo en el cultivo. Las semillas
 híbridas también tienen la ventaja de que el rasgo de tolerancia a herbicida que expresan se pasará sólo de forma
 20 incompleta a generaciones futuras autosembradas o por polinización cruzada a malas hierbas relacionadas. Por lo
 tanto, por ejemplo, el arroz híbrido resultante de la presente invención puede cultivarse usando DL fosfinotricina
 como agente de control de malas hierbas sin pérdida significativa de rendimiento. Sin embargo futuras generaciones
 de plantas de arroz rojo que surjan como la descendencia de polen del arroz híbrido con polinización cruzada con
 parentales femeninos de arroz rojo serán vegetativamente tolerantes al tratamiento con DL fosfinotricina pero
 tendrán autofertilidad reducida (debido a la expresión de una D-aminoácido oxidasa en el tejido floral) y de este
 modo producirán poco grano. Por lo tanto usando el arroz híbrido de la presente invención puede usarse DL
 fosfinotricina para control de malas hierbas con un riesgo futuro muy reducido de contaminación de grano con arroz
 rojo como resultado de que el rasgo de resistencia a herbicida haya pasado por polinización cruzada al arroz rojo
 cercanamente relacionado. De forma similar, las plantas espontáneas de segunda generación de arroz o trigo que
 surjan del cultivo híbrido no producirán, en su mayor parte, grano después de pulverización con DL fosfinotricina.

25 **Ejemplo 9. Transformación/Regeneración de maíz con un polinucleótido que comprende un gen quimérico
 expresado preferentemente en tejido reproductor masculino y que codifica una enzima capaz de oxidar D-
 fosfinotricina.**

Se clonan casetes de expresión de RA8-D-aminoácido oxidasa-nos en una serie de vectores bluescript sk,
 pBLRA8_RGF58KM213T, pBLRA8_RGF58KM213S etc. como se ha descrito anteriormente. Opcionalmente, estos
 se bombardean conjuntamente con ADN que comprende marcadores de selección tales como pUbiHyg o pSOG35;
 seleccionados y regenerados usando higromicina o metotrexato como se ha descrito, por ejemplo, en el Ejemplo 11
 30 del documento WO 98/39462.

Como alternativa, pZEN18_BLR8_RGF58KM213S etc. se bombardean directamente o se transfieren en triquitos
 de carburo de silicio a células de maíz y se seleccionan plantas de maíz y se regeneran en glifosato como, por
 ejemplo, se describe en los Ejemplos 12 y 13 del documento WO 00/66748.

35 Como alternativa, se llevó a cabo transformación del maíz usando *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un
 vector superbinario. Por ejemplo, el casete de expresión pZEN18 y el gen quimérico de D-aminoácido oxidasa
 BLRA8_F58K se escinde de pZEN18_BLR8_RGF58K y se clona en posiciones entre los extremos de ADN T
 izquierdo y derecho de un vector superbinario derivado de pSB1 a través de una serie de subclonación y
 recombinación homóloga en una serie de etapas similares a las descritas en el documento WO 00/66748. Se infecta
 40 materia vegetal derivado de embriones inmaduros con *Agrobacterium* que contiene vector superbinario que
 comprende el gen marcador de glifosato y el gen quimérico de la presente invención. Se seleccionan y regeneran
 plantas usando glifosato como se ha descrito en el documento WO 00/66748.

Se extrae ADN de tejidos de hoja de plantas derivadas de transformación y se ejecuta una PCR con respecto a la
 presencia de gen marcador seleccionable y el gen que codifica D-aminoácido oxidasa mutante. Se propagan plantas
 positivas para PCR. Durante la floración se recogen pistilos y anteras y se prepara ARN. La expresión de ADN se
 45 confirma por análisis de Northern. Además, se expresan genes de D-aminoácido oxidasa mutantes usando vectores
 pET en *E. coli* y se purifican parcialmente. La banda proteica de la proteína expresada se corta de un gel de SDS
 y se usa para generar anticuerpos policlonales. Estos anticuerpos se usan para detectar expresión en tejidos florales y
 otros tejidos por análisis de Western.

50 **Ejemplo 10 Mutagénesis dirigida para generar mutantes adicionales derivados de la forma mutante F58K de
 D-aminoácido oxidasas de *R. gracilis* con capacidades mejoradas adicionales para oxidar D-fosfinotricina
 y/o D-aspartato etc.**

Este ejemplo se refiere a la producción de genes que codifican variantes de D-amino oxidasa de *R. gracilis* que tiene
 capacidad mejorada para oxidar D-fosfinotricina y/u otros D-aminoácidos. Estos genes se usan en realizaciones
 preferidas de la invención, descritas en los otros ejemplos, cuando la esterilidad se hace condicional tras la
 55 aplicación de D-fosfinotricina o D-aspartato. En el presente ejemplo particular estos genes codifican enzimas que
 tienen, además de la mutación F58K, un cambio de aminoácido sencillo en la posición "213" y/o en la posición "238".
 El experto en la materia reconocerá que se usan procedimientos completamente análogos para efectuar una serie
 similar de mutaciones para reemplazar la tirosina en la posición igualmente preferida 223 con el mismo conjunto de
 aminoácidos alternativos. La metionina en la posición "213" se identifica como la M en el motivo de secuencia

proteica nativa RCTMDSS (SEC ID N°: 6). La tirosina en la posición 238 se identifica como la "Y" dentro del motivo de secuencia proteica nativa GGTYGVG (SEC ID N°: 7). Existen 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 aminoácidos en una o ambas de estas posiciones. La selección de molde de ADN para mutagénesis también depende del uso pretendido. Por lo tanto, por ejemplo, cuando el uso pretendido del gen mutante es para expresión en plantas entonces un ADN sintético optimizado para plantas que codifica una D-aminoácido oxidasa de *R. gracilis* tal como el mutante F58K que codifica la forma mutante de SEC ID N°: 3 es un punto de partida adecuado. Por otro lado, cuando el uso inmediato pretendido del gen mutante es como un punto de partida para ciclos adicionales de mutagénesis aleatoria y mejora en un sistema de selección basado en levadura o *E. coli* (como en el Ejemplo 11) entonces el mutante F58K de la secuencia de ADN nativa o una secuencia sintética optimizada para expresión en *S. cerevisiae* es más adecuado.

Un procedimiento preferido para proporcionar variantes adecuadas de D-aminoácido oxidasa de *R. gracilis* es a través del uso de oligonucleótidos degenerados usando kit de mutagénesis Strategenes Quickchange. Los procedimientos usados son de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Por ejemplo en el caso de que el mutante F58K que codifica la forma mutante de la secuencia de ADN de *R. gracilis* nativa que codifica D-aminoácido oxidasa sea el ADN molde para mutagénesis, los pares de oligonucleótidos degenerados "superior" (RGMUTTOP) e "inferior" (RGMUTBOT) pueden ser de forma adecuada de 50-250 nucleótidos de longitud y diseñarse para comprender, dentro de ellos, regiones de secuencia como sigue.

RGMUTTOP comprende dentro de él una secuencia (SEC ID N°: 4)

**tcccatgcaagcgatgcacgNNNgactcgtccgaccccgcttctccgcctacatcattccccgaccaggtggcgaagtcactcg
cggcgggacgNNNggcgtgggagactgggacttg.**

RGMUTBOT comprende dentro de él una secuencia (SEC ID N°: 5)

**caagtcccagctctcccacgccNNNcgtcccgccgagatgacttcgccacctggtcggggaatgatgtagcgggagaagcggg
gtcggacgagtcNNNcgtgcatcgcttgcattgggga**

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

Se transfieren de 0,5 a 1,0 ug de cada oligonucleótido a un tubo de centrifuga Eppendorf de 0,5 ml y se calienta a una temperatura adecuada (por ejemplo 94 °C, dependiendo de los puntos de fusión calculados) durante 5 minutos y se hibrida lentamente enfriando a temperatura ambiente. El ADN molde (por ejemplo vector lanzadera de levadura pYES6/CT) se corta después con dos enzimas de restricción (de acuerdo con los dos sitios de restricción únicos en el ADN molde que abarcan la región que incluye los dos codones a reemplazar y que caracteriza los extremos del ADN hibridado), se purifica en gel, se liga con el oligonucleótido hibridado y se transforma en levadura de modo que se expresan las D-aminoácido oxidasas alternativas creadas por mutagénesis. Después, como se ha descrito, se seleccionan clones de levadura que producen el mejor crecimiento en análogos de D fosfinotricina (tales como ácido D-homocisteico) o en D-fosfinotricina (cuando se coexpresa el gen de PAT) como la única fuente de nitrógeno como los que contienen las secuencias codificantes de D-aminoácido oxidasa variantes con las propiedades deseadas. Como alternativa se lleva a cabo expresión de D-aminoácido oxidasa en algún microorganismo distinto de levadura y, por ejemplo, bajo el control de la expresión del promotor T7 de un vector pET en un lisógeno de *E. coli*. En este caso, después de la transformación, pueden seleccionarse colonias individuales, replicarse en placas, cultivarse, inducirse, lisarse y explorarse con respecto a la actividad del sustrato deseada frente a D-fosfinotricina usando procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, una exploración fluorométrica para generación de peróxido o un ensayo colorimétrico para generación de amoniaco o para el 2-ceto ácido usando procedimientos de ensayo bien establecidos. Las líneas transformantes de organismo de ensayo pueden dejarse crecer de forma adecuada en pocillos de 2 ml de placas de microtitulación, lisarse *in situ* y ensayarse de forma colorimétrica con respecto a actividad D-aminoácido oxidasa usando, como alternativa, fosfinotricina o D-aspartato como sustrato (dependiendo de la optimización de la actividad que se está buscando). Se seleccionan las líneas que proporcionan los niveles más altos de actividad. Como alternativa, las líneas transgénicas de *E. coli* se transforman adicionalmente de modo que expresan el gen PAT (por ejemplo, de forma constitutiva) y se inducen con IPTG de modo que expresen la D-aminoácido oxidasa mutante de "ensayo". Se seleccionan las líneas inducidas que muestran el mejor crecimiento en medio mínimo proporcionado con fosfinotricina (o, opcionalmente, un análogo de fosfinotricina) como la fuente principal de N (opcionalmente se incluye una cantidad pequeña de iones de amonio).

Opcionalmente, se seleccionan líneas no solamente basándose en maximizar la capacidad para utilizar D-fosfinotricina u otros D alfa aminoácidos de cadena lateral ácida sino también para mejorar la estabilidad térmica

(por ejemplo se someten extractos o líneas celulares a un tratamiento de calor corto antes del ensayo enzimático o se dejan crecer las células a temperaturas elevadas o reducidas) u otras propiedades.

La levadura u otros clones microbianos seleccionados se dejan crecer, se prepara ADN y la secuencia de ADN de D-aminoácido oxidasa de longitud completa clonada mediante PCR de revisión y clonándola en pCRBlunt usando el kit de Invitrogen zero Blunt TOPO. Se determinan las secuencias codificantes de D-aminoácido oxidasa que caracterizan los clones seleccionados. Estas secuencias codificantes de D-aminoácido oxidasa se subclonan adicionalmente para expresión en un vector pET (por ejemplo pET 24a de Novagen) y se transforman en *E. coli* BL21 DE3. Las células se dejan crecer en un fermentador en medio LCM50 que contiene kanamicina 100 ug/ml, se inducen con IPTG, se recogen, se rompen y se purifica parcialmente el extracto y se ensaya con actividad D-aminoácido oxidasa (como se detalla posteriormente). Se seleccionan genes de D-aminoácido oxidasa que codifican enzimas de D-aminoácido oxidasa que producen estabilidad aceptable y la mayor actividad (kcat/Km) por mg de proteína pura frente a D-fosfinotricina a pH 7,0.

Adicionalmente se genera una serie de secuencias de ADN particulares que codifican particularmente enzimas D-aminoácido oxidasa diana. En particular, se generan genes que codifican la forma mutante F58K de D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* con cambios mutacionales adicionales en las posiciones 213, 223 y 238 y, en particular, cuando en la posición 213, la metionina de tipo silvestre se reemplaza por His, Lys, Arg, Thr, Gly, Pro, Gln, Ser, Cys, Asn o Ala, la tirosina de tipo silvestre en la posición 223 se reemplaza por His, Lys, Arg, Thr, Gly, Pro, Gln, Ser, Cys, Asn o Ala y/o la tirosina de tipo silvestre en la posición 238 se reemplaza por His, Lys Arg, Thr, Gly, Pro, Gln, Ser, Cys, Asn o Ala. Los procedimientos usados son los mismos que se han descrito anteriormente excepto que, en vez de una mezcla de oligonucleótidos, se diseñan pares individuales de oligonucleótidos y se usan para efectuar cada cambio de aminoácido sencillo o doble. Cada secuencia codificante de D-aminoácido oxidasa mutante resultante se clona para expresión (no marcada) detrás del promotor T7 en pET 24A de Novagen y se transforma en *E. coli* BL21 DE3. Las células se dejan crecer en un fermentador 1.01 en medio LCM50 complementado con kanamicina 100 ug/ml, se inducen para expresión con IPTG 1 mM y se recogen por centrifugación a baja velocidad.

El medio LCM50 contiene (en 1 litro)

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 componen en solución y se esterilizan por autoclave). Los siguientes ingredientes adicionales se esterilizan por filtración como soluciones y se añaden al medio: 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), *reserva de Fe SO₄.7H₂O/ácido cítrico (2 ml), **Solución de elementos traza (5 ml) y componer hasta 1 litro.

*La reserva de Fe SO₄.7H₂O/ácido cítrico por 100 ml consiste en Fe SO₄.7H₂O (0,415 mg), ácido cítrico (0,202 mg).

**La composición de solución de elementos traza por 1 ml es AlCl₃.6H₂O (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).

Se lavan aproximadamente 7 g de peso húmedo de células en agua. Las células se resuspenden en un volumen igual de tampón de Mops/KOH 50 mM a pH 7,0 que contiene EDTA 2 mM, DTT 2 mM y FAD 0,01 mM. Las células se suspenden uniformemente usando un homogeneizador de vidrio y después se rompen usando un cabezal de un disparo en el disruptor celular Basic Z de Constant Systems (BudBrooke Rd, Warwick Reino Unido) a 93,05 MPa. El extracto en bruto se mantiene frío (-4 °C), se centrifuga a 30.000 g de media durante 1 h y el sedimento se descarta. Se hace correr algo de la proteína del extracto en un gel de SDS PAGE teñido con Azul de Coomassie y, a través de comparación lateral con extractos preparados de forma similar de células que contienen solamente vector pET "vacío" se estima que 2-50 % de la proteína soluble total en el extracto es D-aminoácido oxidasa. Parte de la proteína del extracto se intercambia en tampón de Mops/KOH 50 mM a pH 7,0 que contiene FAD 0,01 mM. Esto se diluye con el mismo tampón en una celda de electrodo de oxígeno convencional (calibrada a 25 °C entre cero y una concentración saturada de oxígeno). Opcionalmente, la D-aminoácido oxidasa se purifica adicionalmente usando intercambio iónico, fenil sepharose, precipitación de sulfato de amonio fraccionaria y filtración en gel. Los ensayos, a 25 °C, se inician mediante la adición de una solución 200 mM de la sal de amonio de DL fosfinotricina a la enzima diluida o mediante adición de D-aspartato 25 mM. Para la medición de los valores de Vmax y Km, las concentraciones de sustratos se varían de la manera normal. Los valores de Vmax se estiman basándose en la proteína total y la pureza estimada de la D-aminoácido oxidasa. Basándose en SDS PAGE, la D-aminoácido oxidasa mutante normalmente constituye 15-35 % de la proteína soluble en extractos de proteína en bruto (o más cuando la D-aminoácido oxidasa se purifica adicionalmente). El volumen de reacción final en la celda de electrodo de oxígeno es de 2 ml. Las cantidades finales de proteína en la celda varían hasta 5 mg dependiendo del nivel de actividad que se mida. Se miden las tasas de consumo de oxígeno (después de restar cualquier deriva en las líneas basales).

Son resultados ejemplares obtenidos en las condiciones descritas anteriormente los siguientes. La D-aminoácido oxidasa de *R. gracilis* de tipo silvestre no muestra capacidad detectable para oxidar D-fosfinotricina y solamente actividad baja (~30 nmol/min/mg) cuando se usa D-aspartato como sustrato (en comparación con tasas de control de > de 40 umol/min/mg observadas cuando se usan D-alanina 25 mM como sustrato). La forma mutante F58K muestra

5 algo de actividad baja frente a fosfinotricina (> de ~15 nmol/min/mg) y actividad moderada (~ 1,8 umol/min/mg) con D-aspartato. La forma de mutante doble F58KM213S muestra una actividad muy alta frente a D-aspartato de ~40 umol/min/mg y, frente a DL fosfinotricina, un nivel alto de actividad de ~3,2 umol/min/mg. La Km para D-fosfinotricina del mutante doble F58KM213S se estima que es ~12 mM. El mutante triple F58K, M213S, Y223H muestra una actividad moderada de ~0,4 umol/min/mg frente a D-fosfinotricina y ~0,7 umol/min/mg frente a D-aspartato.

En experimentos de control la forma L-pura no se oxida a niveles detectables y, dependiendo de la concentración, la forma D pura se oxida hasta dos veces la tasa a la que se oxida el racemato DL.

10 También se obtienen resultados adicionales usando un procedimiento de ensayo de mayor rendimiento basándose en el procedimiento de Konno en 'Methods for the Detection of D-Amino-Acid Oxidase'. Biol. Proced. Online. (1998) 14 de mayo; 1: 27-31. Este es un procedimiento especialmente útil para la selección inicial de mutantes antes de análisis más preciso usando el ensayo de electrodo de oxígeno. Se clonan mutantes dirigidos/aleatorios del gen de D-aminoácido oxidasa obtenido como se ha descrito anteriormente en vector PET24 o PET21 (Novagen) como fragmentos Ndel/EcoRI y se transforman por choque térmico en Células Competentes (DE3)-RP BL21-CodonPlus® (Stratagene). Después de selección y siembra en placas, se seleccionan colonias individuales y se dejan crecer en 15 1 ml de caldo de cultivo L (+Kanamicina o Ampicilina + Cloranfenicol) a 30 °C durante una noche en una placa de 96 pocillos que contiene pocillos grandes de 2 ml. La placa se somete después a centrifugación a velocidad baja, las células se centrifugan hasta el fondo de la placa y el sobrenadante se retira cuidadosamente. Las células se resuspenden agitando en vórtex en 0,5 ml de Caldo de cultivo L nuevo (sin antibiótico) y se dejan incubar y se agitan durante 2 horas adicionales a 30 °C. Se añaden 0,5 ml adicionales de Caldo de cultivo L + 4 ul de IPTG y la placa se 20 vuelve a poner en incubador en agitación (30 °C) durante 3 horas. La placa se centrifuga una vez más de modo que las células se sedimentan por centrifugación, el sobrenadante se retira y la placa se congela a -80 °C durante 10 minutos. La placa se devuelve después a la temperatura ambiente y los sedimentos celulares se lisan antes del ensayo enzimático. Se añaden 0,4 ml de CelLyticB (Sigma) que contiene lisozima 1 mg/ml a cada pocillo y se deja durante 10 minutos. Se añade una perla de vidrio a cada pocillo y después los pocillos se sellan como un bloque 25 para moler en molino de perlas durante 2 minutos. La placa se centrifuga después para separar los residuos del ciclo. Se ensayan después 10 ul del extracto de sobrenadante resultante añadiendo 30 ul de D-aminoácido de ensayo (por ejemplo sales de amonio o potasio de D-glutamato, D-aspartato o DL glufosinato a, por ejemplo, 5, 10, 25, 50/100 ó 200 mM en agua) junto con 30 ul de tampón Pirofosfato 0,133 M a pH ~ 8,3 (incluyendo Beta mercaptoetanol 1 ul/ml y Catalasa 5 mg/ml), 20 ul de FAD 0,1 mM y 10 ul de metanol 70 %. La placa se incuba después para permitir que el ensayo se ejecute a temperatura ambiente durante 10-60 minutos y después se detiene la reacción en cada pocillo con la adición de 100 ul de TCA 10 %. Se retiran después 50 ul de cada pocillo al pocillo correspondiente de una nueva placa en la que cada pocillo contiene 50 ul de KOH 5 M. Se añaden después 50 ul de HCl 0,5 M que contiene "Purpald" (4-amino-5-hidrazino-1,2,4-triazol-3-tiol) 0,5 % a cada pocillo y la placa se deja durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se añaden 50 ul de KOH 0,2 M que contiene 35 peróxido potásico 0,75 % a cada pocillo y finalmente se añaden 5 ul de isopropanol a cada pocillo para evitar formación. La densidad óptica de cada pocillo de la última placa se mide después a 550 nm. Niveles altos de actividad D-aminoácido oxidasa se corresponden con lecturas de DO altas. El ensayo puede cuantificarse usando adiciones convencionales de cetóácidos y se calculan actividades específicas basándose en concentraciones de proteína medidas usando procedimientos convencionales tales como los procedimientos de Bradford o Lowry. Las actividades específicas de DAMOX se estiman basándose en el porcentaje de la proteína total en extractos que es 40 D-aminoácido oxidasa (como se estima por SDS PAGE teñido con Coomassie). Usando el ensayo anterior se muestra, por ejemplo, a una concentración de sustrato de D-fosfinotricina 25 mM, que la forma de mutante doble F58K, M213T de D-aminoácido oxidasa de *R. gracilis* es aproximadamente 2-5 veces más activa que la forma F58K, M213S (véase Tabla 1).

45

Tabla 1

Resultados ejemplares obtenidos de un ensayo basado en placa comparando las actividades de formas mutantes de D-aminoácido oxidasa con D-fosfinotricina como un sustrato. El ensayo se ejecuta en las condiciones descritas anteriormente usando DL fosfinotricina 25 mM como sustrato. Los extractos que contienen la forma de tipo silvestre de la enzima no producen ningún color detectable en estas condiciones. La densidad óptica a 550 nm obtenida después de un ensayo de 30 minutos del extracto de la forma mutante F58K, M213T de DAMOX de *R. gracilis* es más del doble de la obtenida de un extracto similar de la forma mutante F58K, M213S. Puesto que el ensayo se hace no lineal a densidades ópticas altas, se estima que la forma mutante F58K, M213T es cualquiera de 2 a 5 veces más activa que la forma F58K, M213S en las condiciones de ensayo.

| Mutante | Experimento | Absorbancia a 550 nm |
|-------------|-------------|----------------------|
| F58K, M213T | 1 | 2,2019 |
| F58K, M213T | 2 | 2,2966 |
| F58K, M213T | 3 | 1,5633 |
| F58K, M213T | 4 | 1,4484 |
| F58K, M213T | Media | 1,8775 |
| | | |
| F58K, M213S | 1 | 0,9843 |
| F58K, M213S | 2 | 0,8374 |
| F58K, M213S | Media | 0,9109 |
| | | |
| F58H, M213S | 1 | 0,5982 |
| F58H, M213S | 2 | 0,6030 |
| F58H, M213S | Media | 0,6006 |

Ejemplo 11. Mutagénesis aleatoria y selección para generar mutantes adicionales de los genes de D-aminoácido oxidasa F58K que codifican enzimas con especificidad mejorada (kcat/ Km) para la oxidación de D-fosfinotricina

- 5 Se clona una secuencia de ADN, con codones optimizados para expresión en levadura y que codifica la forma mutante F58K o la forma mutante doble F58K,M213S o F58K,M213T de la D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* en el vector lanzadera pYES6/CT de Invitrogen como un fragmento HindIII/PmeI cadena abajo del promotor GAL1. De forma similar, estas secuencias de ADN se clonan en el vector lanzadera de expresión proteica pAUR123 (Panvera) como un fragmento XbaI cadena abajo del promotor constitutivo ADHI. La construcción de estos vectores se realiza en *E. coli* seguido de transformación en *Saccharomyces cerevisiae* S288C. Cuando sea apropiado, el gen PAT se usa para reemplazar los genes de resistencia a antibiótico blastidina o aureobasidina en los vectores pYES6/CT/pAUR123 respectivamente y se usa DL fosfinotricina en lugar del antibiótico para mantener la selección. Se crean variantes mutantes adicionales de D-aminoácido oxidasa usando diversos procedimientos de mutagénesis. Por ejemplo, se generan múltiples variantes de la secuencia codificante de D-aminoácido oxidasa por PCR envenenada con Mn²⁺, la población mixta se clona delante de los promotores GAL1 o ADH1 de los dos vectores lanzadera, se transforma en levadura, la levadura se transforma adicionalmente con un gen PAT y se realiza selección basándose en la capacidad de la nueva secuencia para conferir en la levadura la capacidad de crecer más rápidamente en un medio mínimo con fosfinotricina como una fuente principal de nitrógeno. Como alternativa se lleva a cabo mutación y selección directamente en la levadura transformada. Por ejemplo, se deja crecer levadura transformada con los plásmidos anteriores en un fermentador en presencia de un mutágeno químico tal como EMS en un medio de cultivo con nitrógeno limitado que contiene DL fosfinotricina 20-100 mM y se induce para expresión de D-aminoácido oxidasa (por ejemplo cultivada en galactosa como fuente de carbono). Después de subcultivos sucesivos, se identifican los subcultivos que crecen más rápido en fosfinotricina como fuente de N principal, se siembran en placas y las secuencias que codifican la D-aminoácido oxidasa se subclonan, secuencian y expresan en *E. coli* para caracterización adicional.

En un procedimiento adicional, preferido, se lleva a cabo mutagénesis en los dos vectores lanzadera usando una amplificación y pase a través de cepa de *E. coli* XL1-red. Esta cepa es deficiente en tres rutas de reparación de ADN

primarias, mut S, mut D y mut T. Esto da como resultado un aumento de 5000 veces de las tasas de mutación durante la replicación de ADN. El protocolo usado es de acuerdo con Stratagene. Por ejemplo, se transforman 10 ng de vector lanzadera en cepa de *E. coli* XL1-red, las células se dejan crecer y después se siembran en placas de agar de Caldo de cultivo L que contiene ampicilina durante 24 horas. De cada placa se agrupan > 200 lotes de transformantes de colonias raspando las colonias de la placa en caldo de cultivo L y después se dejan crecer diluciones 1 en 100 y 1 en 1000 y se subcultivan sucesivamente en caldo de cultivo L/ampicilina a 37 °C durante 1-2 semanas de modo que se sucede un gran número de divisiones celulares. Se lleva a cabo un procedimiento similar comenzando a partir de varias placas. Se preparan miniprep de ADN de vector lanzadera a partir de células cultivadas durante una noche y transformadas de nuevo a levadura. La levadura transformada se deja crecer y las colonias que contienen D-aminoácido oxidasa mejoradas se seleccionan como se ha descrito anteriormente.

Como alternativa, se lleva a cabo expresión y selección de D-aminoácido oxidasa en algún microorganismo distinto de levadura y, por ejemplo, bajo el control de la expresión del promotor $\tau 7$ de un vector pET en un lisógeno de *E. coli*. En este caso, la secuencia codificante de D-aminoácido oxidasa (opcionalmente mutada por PCR envenenada con Mn^{2+}) se clona en un vector pET, se transforma en *E. coli* XL1 red y después de pase durante varias generaciones, se transforma de nuevo a un lisógeno de *E. coli* tal como *E. coli* BL212 DE3. Pueden después seleccionarse colonias individuales, replicarse en placas, cultivarse, inducirse con IPTG, lisarse y explorarse con respecto a la actividad del sustrato deseada frente a D-fosfinotricina usando procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, una exploración fluorométrica para generación de peróxido o un ensayo colorimétrico para generación de 2-ceto ácido o amoniaco). Como alternativa, las líneas de *E. coli* transgénicas se transforman adicionalmente de modo que expresen el gen PAT (por ejemplo, de forma constitutiva) y se inducen con IPTG de forma que expresen la D-aminoácido oxidasa mutante de "ensayo". Se seleccionan líneas inducidas que muestran el mejor crecimiento en medio mínimo proporcionado con fosfinotricina (o, opcionalmente, un análogo de fosfinotricina), como la fuente principal de N (opcionalmente se incluye una cantidad pequeña de iones de amonio).

Opcionalmente el medio usado para selección de levadura contiene una baja concentración de disolvente (por ejemplo DMSO 0,1 %).

Ejemplo 12. Producción de D-fosfinotricina en una forma enantioméricamente pura

Se transforma *E. coli* BL21 DE3 codon plus RIL con pET 24A de Novagen que tiene la secuencia codificante de PAT (A02774) clonada para expresión (no marcada) detrás del promotor T7. Estas células se dejan crecer hasta una densidad de $DO_{600\text{ nm}}$ de ~ 40 en un fermentador de 10 litros de medio LCM50 que contiene kanamicina, se inducen con IPTG 0,2 mM, se recogen por centrifugación de baja velocidad y se transfieren rápidamente a medio mínimo que contiene 9,91 g de la sal de amonio de D/L fosfinotricina (PPT).

Medio mínimo (en 1 litro) es.

Se disolvieron Na_2HPO_4 (6 g), KH_2PO_4 (3 g), NaCl (1 g), NH_4Cl (1 g) en agua y se esterilizaron por autoclave y las siguientes soluciones se añadieron después de esterilización por filtración:

CaCl₂ (1 ml de 14,7 g/l), MgSO₄ (1 ml de 246,5 g/l), Tiamina.HCl (5 ml de 1 mg/ml)

Glucosa (30 ml de solución 20 % esterilizada por autoclave de forma separada), DMSO 0,5 ml.

Los detalles de fermentación son los siguientes. Se inocula medio LCM 50 en un fermentador de 10 litros con inóculo crecido en caldo de cultivo LB (200 ml) de *E. coli* BL21 DE3 codon plus RIL que contiene el gen PAT y se mantiene a 30 °C, tasa de agitación 200 rpm, pH 6,5, concentración de oxígeno 50 % saturado en aire. Después de aproximadamente 12 horas el cultivo crece hasta una $DO_{600\text{ nm}}$ de ~ 30. El cultivo se induce después para expresión de PAT mediante la adición de IPTG 0,2 mM. Después de 1,5 horas, el cultivo típicamente crece adicionalmente hasta una $DO_{600\text{ nm}}$ de ~ 40, antes de recogerse las células por centrifugación y lavarse en 8 litros de medio mínimo. Las células se centrifugan una vez más y se resuspenden a un volumen final de 10 litros en el fermentador en medio mínimo que contiene 9,91 g de la sal de amonio disponible en el mercado de D/L-fosfinotricina e IPTG 0,2 mM adicional. La temperatura se aumenta a 37 °C y las muestras del medio fermentador se controlan por NMR de fósforo y protones para determinar a) cuándo los niveles de glucosa han descendido sustancialmente y necesitan abastecerse y b) el alcance de la conversión de fosfinotricina a N-acetil fosfinotricina. Durante el transcurso de ~ 12 horas, se añaden ~ 500 g de glucosa al fermentador. Se observa que la formación de n-acetil fosfinotricina comienza después de unas pocas horas y a las ~ 20 horas alcanza > 93 % de conversión de la L-PPT (46,5 % de volumen de la D/L) a N-acetil-L-PP. El medio de fermentación se recoge poco después retirándose las células por centrifugación a baja velocidad.

D-PPT se purifica a partir de medio de fermentación usando cromatografía de intercambio iónico. El medio de fermentación (~ 9,5 l) se almacena a 4 °C. Se mezcla con 900 ml de resina de intercambio catiónico de malla 200-400 Dowex 50W-X8 (preparada previamente con HCl) en forma de H⁺ de modo que el pH del sobrenadante por encima de la resina baja hasta ~ pH 3,2. Se permite que la resina Dowex sedimente por gravedad y se decanta el sobrenadante junto con un aclarado de agua 21 de la resina Dowex y después se centrifuga para clarificar. El Dowex lavado se descarta (para reciclarse con el tiempo). El sobrenadante clarificado se extrae después mediante un

embudo de decantación con etil acetato (1/4 del volumen del sobrenadante) y la fracción acuosa (~ 121) se conserva. Después se añaden 2,31 adicionales de forma H⁺ de resina Dowex 50W-X8 y se agita con el - 121. Después se permite que la resina sedimente. El pH del sobrenadante por encima de la resina es ~ pH 1,6 en esta etapa. El sobrenadante se retira por decantación y se descarta y la resina se lava con ~ 12 litros de agua y, de nuevo, se permite que sedimente. De nuevo, el sobrenadante se descarta y la resina se vierte en un filtro de embudo Buchner sinterizado y se aclara con ~ 4,51 adicionales de agua (para retirar la mayoría de la N-acetil-fosfinotricina residual). La fracción principal que contiene D-fosfinotricina se eluye de la resina con 151 de hidróxido de amonio 0,4 M, seguido de un aclarado con 1,41 de agua de la resina. El pH de esta reacción que contiene D-fosfinotricina es ~ 11,4. Opcionalmente, este se reduce a ~ pH 10 mediante la adición de, por ejemplo, ~ 0,13 moles de ácido acético y ~ 600 ml de resina de intercambio catiónico en forma H⁺. Si se añade, se permite que la resina sedimente. La fracción de D-fosfinotricina (sobrenadante) se carga después en una columna de 565 ml (5 x 28 cm) de resina de intercambio aniónico de malla 400 Dowex 1X8 en forma OH (preequilibrada con NaOH y lavada con agua). Se aplica un gradiente de acetato de amonio de 0 M - 0,32 M a la columna durante 17 volúmenes de lecho de columna. Se recogen fracciones de 55 ml en todo el gradiente. Las fracciones se controlan por UV a 215 nm y también por NMR de 31P y protones. Este análisis indica que se eluye fosfinotricina altamente pura entre las fracciones 39 y 78. Se eluye N-acetilfosfinotricina como material no unido y temprano en el gradiente y algo de glutamato eluye posteriormente las fracciones 79-90.

Las fracciones 63 a 78 (correspondientes a 6-7,6 volúmenes de lecho) constituyen el volumen de fosfinotricina altamente pura. Las fracciones de fosfinotricina se liofilizan y se descubre que son puras por NMR de fósforo y protones (no son visibles otros picos aparte de acetato, > 95 % del material orgánico es fosfinotricina), aunque, basándose en discrepancias entre los pesos secos calculados y observados se descubre que, típicamente, algún resto de sales inorgánicas (por ejemplo cloruro de amonio) permanece en las muestras de fosfinotricina. Para fines prácticos, cuando se usa D-fosfinotricina (por ejemplo para pulverizar en plantas) puede considerarse que los agentes inorgánicos son inertes y sólo necesitan tenerse en cuenta para ajustar las concentraciones calculadas cuando las soluciones de D-fosfinotricina se componen de muestras pesadas en seco.

Se espera que la fosfinotricina aislada de acuerdo con el procedimiento anterior deba ser sustancialmente D-fosfinotricina enantioméricamente pura. Esto se verifica de acuerdo con el procedimiento de análisis de HPLC fluorescente de Hori y col. (2002) J. Chrom. B 776, 191-198. Por ejemplo, se disuelven 50 ul de DL fosfinotricina comercial (0,01-10 ug/ ml) o de muestra en tampón Borato 0,1 M pH 8,5 y se mezcla con 200 ul del mismo tampón Borato. Después se añaden 50 ul de FLEC ((+)-1-(9-fluorenil) etil cloroformato) 18 mM y las mezclas se incuban adicionalmente durante 30 minutos a 40 °C. Se retira FLEC en exceso agitando durante 3 minutos con 500 ul de etil acetato. Se retiran 100 µl de la capa acuosa del fondo para análisis de HPLC.

Se equilibra una columna de HPLC práctica 5 µM Inertsil ODS2 (15 x 4,6) con acetato de amonio acuoso 10 mM 77 % (pH 5,0): acetonitrilo 23 % a un caudal de 0,8 ml/minuto. Se inyecta una muestra de 2 ul en la columna y se ejecuta de forma isocrática durante 60 minutos y se controla usando detección de fluorescencia con excitación a 260 nm y longitud de onda de emisión a 305 nm. Se observa que los isómeros D y L de fosfinotricina están claramente separados y eluyen a 12,4 y 13,4 minutos respectivamente. Se ejecuta una muestra de D fosfinotricina aislada de acuerdo con el procedimiento actual y se estima que está en un exceso enantiomérico mayor de 99 %. Esto se estima basándose en la adición de cantidades conocidas de DL fosfinotricina comercial y observando lo pequeño que es un aumento detectable en el pico de 13,4 minutos del lado derecho frente al fondo del pico de 12,4 minutos aparentemente sencillo producido por la muestra.

Además, el procedimiento de HPLC se usa para estimar la cantidad de fosfinotricina basándose en integración de los picos y comparación con una curva patrón. Adicionalmente se estiman las cantidades totales de fosfinotricina mediante integración de señales de NMR.

Se estima que, en total, desde los ~ 9,91 g de racemato DL de partida, se producen ~ 1,9 g (rendimiento del 38 %) de sal de amonio de D-fosfinotricina pura en un exceso enantiomérico de > 99 %. 50-70 % del peso seco de la muestra comprende sales inorgánicas que se mantienen. Opcionalmente estas se retiran por etapas adicionales de intercambio iónico y liofilización (después de intercambio a sales volátiles).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Syngenta Limited

<120> Procedimiento de producción de forma selectiva plantas estériles masculinas o femeninas

<130> PPD70629

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.1

ES 2 376 665 T3

5
 <210> 1
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

10
 <400> 1
 aactgcagct ttttggttag cgaatgc 27

15
 <210> 2
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

20
 <400> 2
 cagactagtt ttagctaatt tctttaagta aaaac 35

25
 <210> 3
 <211> 1107
 <212> ADN
 <213> Rhodotoula gracilis

<400> 3

```

atgggatccc aaaagagggg tgtggtgctg ggttccggcg tgataggact cagctccgcg      60
cttataacttg cccggaaggg gtactccgtc cacatcctgg ccogggacct cccagaggat      120
gtagctcac agaccttcgc gtecccttgg gctggagcca actggacccc ttttatgacc      180
ctcactgacg gcccgaggca ggcaaagtgg gaggagtcta cattcaagaa gtgggtggaa      240
cttgtgccaa cggggcatgc catgtggttg aagggaacca ggcgtttcgc ccaaaatgag      300
gacggactgc tcggtcactg gtacaaagat atcaccccca attatagacc cttgcacctc      360
tcogaatgtc caccaggcgc tattggcgtg acctatgaca cattgtcagt gcacgctcca      420
aagtactgcc aatacctcgc aaggagctc cagaagctgg gggcgacatt cgagcgcgc      480
accgttactt ccctcgagca agcttttgat ggggctgacc tcgtcgtaa cgcgacgggg      540
ctgggtgcca agtccatcgc tggcatcgat gaccaggcgg ccgagcctat tcgcggtcaa      600
acggtgctcg tcaagtgcgc ctgcaaaagg tgtactatgg acagctcggg cccggcatca      660
ccggcgtaca tcatcccgcg gccaggagc gaagtgattt gcggcggtac gtacggggtc      720
ggagactggg atctctcggc caaccagag accgtccagc gcatcctcaa aactgcctg      780
cgcctggatc cgactatttc ttcggacggc acaatogaag gcatcgaggt gctgcggcat      840
aacgtcggac tcagaccggc gaggagggga ggccctcgcg ttgaagccga gaggattggt      900

cttcacttg acagaacgaa gagccccctc tcaactgggccc gtgggagcgc tcgtgcggcc      960
aaggagaagg aggtgacttt ggtgcatgcc tacggtttct ccagcctgg ctatcaaacg      1020
tcttggggcg cagccgaaga cgtcgcacaa ttggtcgatg aggcgtttca gaggtatcat      1080
ggggccgccc gcgagtctaa gctctga                                     1107
    
```

30

ES 2 376 665 T3

5
 <210> 4
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> En la que n = a, t, c o g.

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> En la que n = a, t, c o g.

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> En la que n=a, t, c o g.

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (97)..(97)
 <223> En la que n=a, t, c o g.

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(98)
 <223> En la que n=a, t, c o g.

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (99)..(99)
 <223> En la que n=a, t, c o g.

40
 <400> 4

tccccatgca agcgatgcac gnnngactcg tccgaccccg cttctcccgc ctacatcatt 60
ccccgaccag gtggcgaagt catctgcggc gggacgnnng gcgtgggaga ctgggacttg 120

45
 <210> 5
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> En la que n=a, t, c o g.

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> En la que n=a, t, c o g.

60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)

ES 2 376 665 T3

<223> En la que n=a, t, c o g.
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (97)..(97)
 <223> En la que n=a, t, c o g.
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (98)..(98)
 <223> En la que n=a, t, c o g.
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (99)..(99)
 <223> En la que n=a, t, c o g.
 <400> 5
 caagtcaccag tctcccacgc cnnncgtccc gccgcagatg acttcgccac ctggtcgggg 60
 20 aatgatgtag gccgggagaag cgggggtcgga cgagtcnnc gtgcatcgct tgcattggga 120
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220> <223> Motivo
 <400> 6
 Arg Cys Thr Met Asp Ser Ser
 30 1 5
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Motivo
 40 <400> 7
 Gly Gly Thr Tyr Gly Val Gly
 1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de producción de plantas estériles masculinas o femeninas que comprende las etapas de transformar material vegetal con un polinucleótido que codifica al menos una enzima que reacciona con una sustancia no fitotóxica para producir una citotóxica y regenerar el material transformado de este modo en una planta, en el que dicha sustancia no fitotóxica se aplica a la planta hasta el momento de la formación y/o maduración de gametos masculinos o femeninos, de modo que la sustancia no fitotóxica posibilita la producción de una fitotóxica que evita selectivamente la formación de o hace de otro modo a dichos gametos no funcionales, en el que la enzima se expresa preferentemente en estructuras reproductoras masculinas o femeninas y la sustancia no fitotóxica es un aminoácido D-alfa, **caracterizado porque** la enzima es una D-aminoácido oxidasa obtenida de *Rhodotorula gracilis* y codificada por la secuencia de ácido nucleico como se representa en SEC ID N°: 3, siendo dicha enzima una versión mutada de la proteína codificada por SEC ID N°: 3 y comprendiendo una lisina en la posición 58 y en la posición 213 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Gln y Gly; en la posición 238 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Gln y Gly y/o en la posición 223 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Cys, Gly, Gln y/o Asn.
- 15 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha sustancia no fitotóxica se aplica en mezcla junto con al menos una sustancia adicional que se selecciona del grupo que consiste en sanadores, gametocidas, inductores de glutatión-S-transferasa, inductores de citocromo P450, herbicidas, fertilizantes, nematocidas, sinergistas, insecticidas, fungicidas, hormonas, reguladores del crecimiento vegetal e inhibidores de citocromo P450.
- 20 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la sustancia no fitotóxica se aplica foliamente y es un sustrato oxidable móvil en el floema y metabólicamente estable de la enzima, en el que la enzima proporciona el producto fitotóxico, como uno directo o indirecto de la sustancia no fitotóxica.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que el producto fitotóxico es uno indirecto producido en forma de peróxido y/o un anión superóxido.
- 25 5. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que la sustancia no fitotóxica es D-aspartato o D-glutamato y la enzima oxida dicho aminoácido a un 2-ceto ácido con reducción conjunta de oxígeno a un anión peróxido.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior en el que el aminoácido en la posición 213 es Thr.
7. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que la enzima tiene una diana distinta del peroxisoma.
- 30 8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la sustancia no fitotóxica es el enantiómero D de fosfinotricina o un D enantiómero de bialafos.
9. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la sustancia no fitotóxica está comprendida dentro de una mezcla, que contiene una sustancia fitotóxica y en el que la enzima oxida un aminoácido a un 2-ceto ácido con reducción conjunta de oxígeno a un anión peróxido.
- 35 10. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, en el que la mezcla comprende tanto D como L fosfinotricina y el material vegetal expresa un gen de PAT sustancialmente solo en tejidos verdes y/o en tejido floral que produce gametos que son distintos de los que se hacen no funcionales.

Figura 1

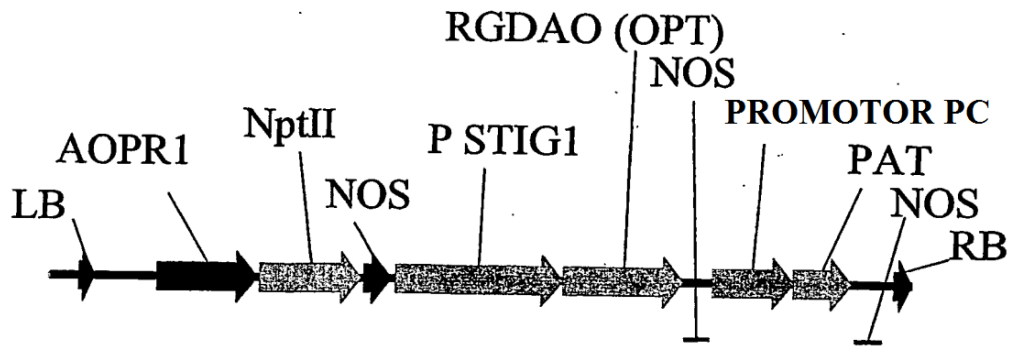


Figura 2

