

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 522**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03755923 .4**
96 Fecha de presentación: **21.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1509610**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2005**

54 Título: **Plantas transgénicas con una distribución controlada de un rasgo a una progenie**

30 Prioridad:
31.05.2002 DE 10224214
05.06.2002 DE 10224980

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2012

73 Titular/es:
Bayer CropScience N.V.
J.E. Mommaertsiaan 14
1831 Diegem , BE

72 Inventor/es:
WERNER, Stefan;
GIRITCH, Anatoly;
ELIBY, Serik;
MARILLONNET, Sylvestre;
KLIMYUK, Victor y
GLEBA, Yuri

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 388 522 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

Plantas transgénicas con una distribución controlada de un rasgo a una progenie

Campo del invento

5 El presente invento se refiere a semillas híbridas. El invento se refiere también a un organismo de planta multicelular transgénica que expresa un rasgo de interés y que tiene una distribución controlada de dicho rasgo a una progenie o a otros organismos. El invento se refiere también a un organismo de planta multicelular transgénica que expresa dos rasgos de interés, teniendo dichos rasgos una distribución controlada a una progenie. Preferiblemente, uno de dichos rasgos es la esterilidad masculina.

Antecedentes del invento

10 El uso comercial de especies de plantas cultivadas tratadas por ingeniería genética ha causado preocupaciones acerca de la posible transferencia de transgenes y de rasgos codificados por transgenes a partir de plantas modificadas genéticamente (plantas GM acrónimo de genetically modified) a variedades puras de origen, variedades relativas silvestres u otras variedades de plantas no GM o especies de plantas cultivadas relacionadas (Ellstrand, N. C., 2001, *Plant Physiol.* 125, 1543-1545; Quist & Chapela, 2001, *Nature*, 414, 541-543), que podrían cambiar el equilibrio ecológico en los ecosistemas afectados o conducir a otros problemas, ante todo de tipo socioeconómico. Adicionalmente, hay un cierto miedo de que los transgenes, especialmente los genes de resistencia a antibióticos usados como marcadores de transformación, puedan escapar, por medio de una denominada transferencia horizontal, hacia los microorganismos circundantes (Chiter y colaboradores, 2000, *FEBS Lett.*, 481, 164-168), modificando de esta manera a la microflora de una manera indeseable.

20 Aunque muchas de estas preocupaciones no están bien justificadas científicamente (Christou, P., 2002, *Transgenic Res.*, 11, iii-v), la creación de sistemas de administración de transgenes seguros y controlados es altamente deseable, puesto que podría evitar potenciales problemas en el futuro y ayudará a proteger al plasma germinal de especies de plantas existentes de una manera sumamente eficaz. Además, existen problemas causados por una contaminación con cultivares transgénicos de plantas cultivadas que han crecido orgánicamente o de plantas cultivadas que no son GM. Esto tiene un grave impacto sobre la comercialización de plantas cultivadas transgénicas así como no transgénicas, un tema que no puede ser ignorado por los productores.

30 A diferencia de otros productos generados por los seres humanos, los productos creados por biotecnología son potencialmente unas máquinas auto-replicas. Por lo tanto, cualquier material transgénico creado por una tecnología actual y liberado al medio ambiente tiene un potencial de persistir allí durante un período de tiempo muy largo. Una práctica corriente del tratamiento por ingeniería genética de plantas está basado en el uso de casetes de expresión y de vectores que contienen una secuencia de codificación continua para el gen de interés. Dichos casetes de expresión son integradas dentro de un cromosoma anfitrión y después de una hibridación o de otro intercambio de información genética entre una planta GM y otro organismo, ya sea lícito o ilícito, la casete de expresión es transmitida con una alta probabilidad a una progenie o a otro recipiente como una unidad de transcripción funcional.

35 El documento de solicitud de patente internacional WO00/52146 describe ideas generales para encriptar un rasgo de interés por disociación de gen(es) en dos o más fragmentos y reunir los fragmentos por trans-empalme después de emparejar organismos parentales, en donde los organismos parentales proporcionan dichos fragmentos. El documento WO00/52146 no va más allá de unas ideas generales. Él no contiene una descripción habilitadora sobre cómo estas ideas pueden ser reducidas a la práctica. Notablemente, no contiene ningún ejemplo. El documento WO00/71701 describe el ensamble de una proteína funcional mediante interacción de trans-empalme de una proteína mediado por inteínas para mejorar la contención de un transgén que codifica dicha proteína. El documento WO00/71701 no describe poner juntos a fragmentos de una proteína por apareamiento de organismos parentales. Además, la frecuencia de transmisión de un transgén de acuerdo con el documento WO00/71701 no es lo suficientemente baja para aplicaciones a gran escala tales como la agricultura, particularmente cuando un transgén proporciona una ventaja selectiva.

40 El documento WO0116287 se refiere a la creación de una posición alélica para transgenes, cuya expresión determina un fenotipo, con la meta de que los transgenes se segreguen a diferentes gametos. Esta solicitud de patente no afronta el problema de controlar el movimiento de los transgenes, sino más bien la generación de rasgos, específicamente la esterilidad masculina, codificados por al menos dos transgenes. Además, no menciona el trans-empalme mediado por inteínas. Esta solicitud no describe el control sobre el movimiento de rasgos por disociación de un gen que codifica un rasgo en dos o más fragmentos.

55 El ensamble de rasgos a partir de unas partes que codifican el rasgo no tiene un alto valor sin conocer cómo se han de conseguir las posiciones más favorables de los fragmentos codificadores prácticamente de la manera más factible, con el fin de proporcionar el control más estricto acerca de la transmisión deseada de dicho rasgo. Para aplicaciones a gran escala tales como para la agricultura, la seguridad biológica requiere que la transmisión indeseada de un transgén sea reducida a una frecuencia de prácticamente cero.

Las plantas cultivadas que expresan como un rasgo de interés la esterilidad masculina o femenina se usan ampliamente para la producción de semillas híbridas. Las plantas cultivadas híbridas tienen en promedio una ventaja de rendimiento medio de 20 % con respecto a las variedades innatas, y la producción de semillas híbridas es una gran industria. Muchas diferentes tecnologías se usan para producir semillas híbridas (como recopilación véase la cita de: Pérez-Prat E. & van Lookeren Campagne, MM, 2002, Trends Plant Sci., 7, 199-202). Estas tecnologías pueden ser divididas condicionalmente en por lo menos cuatro grupos de acuerdo con el mecanismo de control de la polinización: mecánico, químico, genético y transgénico. Sin embargo, un requisito crítico es común para todas estas tecnologías: idealmente un linaje estéril masculino en 100 % debería ser usado para el proceso de hibridación y se debería conseguir en una progenie F₁ una restauración de la fertilidad masculina en un 100%. Dichos estrictos requisitos son absolutamente necesarios para producir semillas híbridas libres de contaminación con semillas autofecundadas.

Los actuales métodos de producción de semillas híbridas son insatisfactorios en los anteriores aspectos. Estos procesos o bien son caros, como en el caso del despenchado mecánico (castración) del maíz, o bien son "susceptibles de fugas" tal como en el caso de los enfoques genéticos, o ambas cosas a la vez, como en el caso de un método basado en un tratamiento químico (p.ej. documento de patente de los EE.UU. US4569688).

Los enfoques genéticos incluyen preferiblemente el uso de linajes con mutantes de esterilidad masculina citoplasmática (CMS = acrónimo de cytoplasmic male sterility) y restauradores de la fertilidad (p.ej. el documento WO02098209). Los enfoques transgénicos usan predominantemente plantas con esterilidad masculina nuclear (NMS, acrónimo de nuclear male sterility) o CMS, tratadas por ingeniería genética y la restauración de la fertilidad en una progenie F₁ (documentos WO8910396; US5530191; US6255564; WO9832325; WO9201799; US6392119; WO0116287). Estos enfoques requieren también el uso de un denominado linaje mantenedor con el fin de propagar y mantener el linaje estéril masculino.

Los sistemas transgénicos construidos a base de un transgén que proporciona esterilidad masculina y de otro transgén que es portador de la función de restaurar la fertilidad masculina (p.ej. el documento US6255564) no garantizan ni la restauración completa de la fertilidad masculina en una progenie híbrida ni la completa eliminación de efectos potencialmente negativos del transgén que proporciona esterilidad masculina sobre la salud general de dicha progenie. En otras palabras, estos sistemas son susceptibles de fugas. Además, ninguno de los mencionados sistemas anteriormente mencionados ofrece una vía conveniente de producir y mantener el linaje estéril masculino. Este es un elemento importante de cualquier sistema tratado por ingeniería genética para la producción de semillas híbridas, puesto que la aplicación con éxito de dicho sistema para una producción a gran escala depende de sí el linaje parental femenino estéril masculino puede ser propagado de una manera económica y eficiente. En otras palabras, actualmente no hay ningún sistema universal, confiable y económico para la producción de semillas híbridas que integre todos los requisitos necesarios para el mantenimiento de los linajes originales, el proceso de hibridación, la restauración de la fertilidad masculina en una progenie híbrida y al mismo tiempo tenga unos parámetros de alta seguridad biológica, p.ej. proporcione un control estrecho sobre la segregación del transgén. Un esquema general de producción de semillas híbridas por uso de unos enfoques genéticos/transgénicos actualmente existentes se muestra en la Figura 12.

En el presente invento, los autores del mismo describimos un nuevo procedimiento de producir semillas híbridas (Fig. 13) que tiene todas las características necesarias para concordar los requisitos de un sistema de hibridación ideal. Una comparación del sistema de producción de semillas híbridas del invento con los métodos de la técnica anterior se presenta en la Tabla 1.

Por lo tanto, es un objeto del invento proporcionar un procedimiento para producir una planta transgénica que exprese un rasgo de interés, particularmente esterilidad masculina, en donde una distribución de dicho rasgo a una progenie esté controlado estrictamente y se realice con una baja probabilidad.

Un objeto adicional del invento es proporcionar un procedimiento de producir una planta transgénica segura biológicamente, particularmente una planta estéril masculina, que exprese un rasgo de interés, en donde unos fragmentos de genes que codifican dichos rasgos están colocados de tal manera que una transmisión indeseada de dicho rasgo se produzca con baja probabilidad.

Un objeto adicional del invento es proporcionar un procedimiento de posicionar secuencias de ADN transgénicos en cromosomas homólogos, particularmente en el mismo locus (lugar) de cromosomas homólogos de un organismo multicelular.

Es también un objeto del invento proporcionar un procedimiento de producir un linaje de planta estéril masculina.

Otro objeto del invento es proporcionar un procedimiento universal y seguro para el medio ambiente de producir semillas híbridas usando un linaje de planta estéril, en donde una restauración completa de la fertilidad se produzca en dichas semillas híbridas.

Descripción general del invento

El invento proporciona una planta, una semilla o una célula de planta que expresa un rasgo de interés comprendiendo dicha planta, dicha semilla o dicha célula de planta:

- 5 (i) en un primer locus de un cromosoma nuclear, una primera secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés, y
- (ii) en un segundo locus de un cromosoma nuclear que es homólogo con dicho cromosoma nuclear de la etapa (i), una segunda secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende un segundo fragmento de la secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés;

10 exhibiendo dicha planta, dicha semilla o dichas células de plantas dicho rasgo funcional de interés debido a un trans-empalme mediado por inteínas entre una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha primera secuencia de nucleótido heteróloga y una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga.

Una planta, una semilla o una célula de planta preferida es definida en la reivindicación 2.

15 El invento proporciona además las semillas de acuerdo con la reivindicación 3, unas plantas que han crecido a partir de las semillas de acuerdo con la reivindicación 5, un uso de las semillas o de las plantas para expresar una proteína de interés de acuerdo con la reivindicación 8, y una planta, una semilla o una célula como se definen en la reivindicación 9.

Además, el invento proporciona un procedimiento de producir una primera y una segunda plantas de acuerdo con la reivindicación 10.

20 También se describe un procedimiento de producir un organismo de planta multicelular transgénica o partes de la misma que expresan un rasgo de interés y que tienen una distribución controlada de dicho rasgo a una progenie, en que dicho procedimiento comprende

25 (i) producir una primera planta o una célula de la misma que tiene en un primer locus de un cromosoma nuclear una primera secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés,

(ii) producir una segunda planta o una célula de la misma que tiene en un segundo locus de un cromosoma nuclear que es homólogo con dicho cromosoma nuclear de la etapa (i), una segunda secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende un segundo fragmento de la secuencia de nucleótidos, que codifica dicho rasgo de interés, y

30 (iii) hibridar dicha primera y dicha segunda plantas o células de las mismas para generar una progenie que exhibe dicho rasgo funcional de interés debido a la unión entre una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga y una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga. Dicha unión implica preferiblemente un trans-empalme de proteínas.

35 Dichos organismos de plantas multicelulares o dichas partes producidas por el procedimiento anterior pueden expresar dos rasgos de interés, un rasgo (1) y un rasgo (2), teniendo ambos rasgos una distribución controlada a una progenie.

40 Los autores de este invento han desarrollado por primera vez un método de hacer a plantas transgénicas seguras para el medio ambiente puesto que el transgén o un rasgo de interés expresado por dicha planta tiene una distribución controlada a una progenie de dicha planta. El invento resuelve un problema principal de la biotecnología, particularmente de la biotecnología de plantas, puesto que la transferencia de un transgén desde una planta GM a otros organismos puede ahora ser controlada y limitada de una manera efectiva. La transferencia de un transgén a otros organismos incluye la transferencia a una progenie sexual por polinización cruzada así como una transferencia de genes laterales. Los procedimientos anteriores hacen obtenibles unas plantas multicelulares modificadas genéticamente con una contención controlada de un rasgo de interés.

50 En una importante forma de realización, dicho rasgo de interés es la esterilidad masculina o femenina, preferiblemente la esterilidad masculina. En este caso el organismo de planta multicelular transgénica del invento se puede usar para la producción de semillas híbridas por cruce con otra planta que es fértil masculina o fértil femenina, respectivamente. Las semillas híbridas producidas por uso de la planta multicelular transgénica del invento pueden ser fértiles en un 100 % debido a una distribución controlada del rasgo de esterilidad a una progenie. En una forma de realización particularmente preferida, dicha planta multicelular transgénica del invento puede expresar dos rasgos de interés, un rasgo de esterilidad masculina y un rasgo de resistencia a herbicidas que hace practicable y accesible a un nuevo procedimiento de producir semillas híbridas con varias ventajas con respecto a los procedimientos de la técnica anterior (véase más abajo).

En el procedimiento de producir la planta del invento, la secuencia de nucleótidos que codifica (o está implicada en) dicho rasgo es disociada en dos o más fragmentos. Preferiblemente, dicha secuencia de nucleótidos es disociada en dos fragmentos de dicha secuencia de nucleótidos, obteniendo de esta manera una parte de 5' y una parte de 3' de la secuencia de nucleótidos. Dicha parte de 5' corresponde esencialmente a dicho primer fragmento. Dicha parte de 3' corresponde esencialmente a dicho segundo fragmento. Dicha secuencia de nucleótidos es típicamente una secuencia de codificación (o un marco de lectura abierto) de una proteína implicada en dicho rasgo. Sin embargo, dicha secuencia de nucleótidos puede contener uno o más intrones. Para obtener dichos fragmentos, dicha secuencia de nucleótidos es disociada preferiblemente de tal manera que cada fragmento obtenido, al realizar una expresión, es incapaz de generar dicho rasgo en la ausencia del otro fragmento. Cada fragmento contiene una porción de secuencia que es necesaria para la función de la proteína implicada en dicho rasgo. Por ejemplo, si dicha proteína implicada en dicho rasgo es una enzima, cada fragmento contiene preferiblemente unos aminoácidos necesarios para una catálisis o unión al sustrato de la enzima. Una proteína implicada en, o que codifica, un rasgo puede ser disociada en dichos fragmentos de muchas maneras diferentes, con la condición de que la expresión de dicho rasgo requiera a todos dichos fragmentos y la unión de los mismos unos con otros. Una información estructural y funcional conocida acerca de la proteína implicada en dicho rasgo puede ser útil para encontrar un apropiado sitio de disociación de dicha secuencia de nucleótidos. En cualquier caso, se puede ensayar experimentalmente con facilidad si un fragmento generado por disociación de una secuencia de nucleótidos en un sitio escogido al azar es capaz de expresar un rasgo codificado por dicha secuencia de nucleótidos. La siguiente descripción se enfoca sobre la forma de realización preferida, en la que dicha secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo es disociada en dos fragmentos.

La expresión de dicho rasgo requiere la presencia de ambos de dichos fragmentos en la misma planta, preferiblemente en las mismas células de la misma. La expresión de dicho rasgo requiere además la transcripción y la traducción de dicho primero y dicho segundo fragmentos y la unión de los productos de traducción de dichos fragmentos unos con otros con o sin la formación de un enlace peptídico. Preferiblemente, dicha unión implica la formación de un enlace peptídico entre dichos fragmentos.

El primer fragmento es incorporado en una primera secuencia de nucleótidos heteróloga, el segundo fragmento es incorporado en una segunda secuencia de nucleótidos heteróloga. Preferiblemente, dichas secuencias de nucleótidos heterólogas son secuencias de ADN .

De manera preferible, dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas codifican además un primero y un segundo polipéptidos de unión, respectivamente, lo que hace que dichos polipéptidos codificados por dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas sean capaces de dicha unión. Cada uno de los polipéptidos de unión es expresado preferiblemente como una fusión de una proteína con el polipéptido codificado por dicho primero o dicho segundo fragmento.

Dicho/a polipéptido o proteína codificado/a por dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga comprende, preferiblemente consiste en, un primer polipéptido de unión y un polipéptido codificado por dicho primer fragmento. Dicho/a polipéptido o proteína codificado/a por dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga comprende, preferiblemente consiste en, un segundo polipéptido de unión y un polipéptido codificado por dicho segundo fragmento.

Después de una transcripción y de una traducción, cada uno/a de dichos/as polipéptidos o proteínas tiene por lo menos las siguientes dos funciones:

(i) proporcionar una parte de la proteína implicada en dicho rasgo;

(ii) la capacidad de unirse al polipéptido o a la proteína codificada por el otro fragmento. Las porciones de secuencias de aminoácidos que son responsables de dichas funciones (i) y (ii) pueden o no solaparse.

Dicha unión puede implicar o no la formación de un enlace peptídico entre dichas/os proteínas o polipéptidos que se ha codificado por dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas. Sin la formación de enlaces peptídicos, dichos polipéptidos de unión pueden unirse uno con otro por afinidad. En este caso, dichos polipéptidos de unión pueden ser unos polipéptidos conocidos por unirse uno con otro, p.ej. a partir de dominios de unión presentes en la naturaleza de complejos de proteínas. Preferiblemente, dichos polipéptidos de unión implicados en dicha afinidad de unión, o por lo menos uno de ellos, puede(n) haber sido tratado(s) por ingeniería genética artificialmente. Dichos polipéptidos de unión pueden ser p.ej. los componentes de un par de un antígeno y de un anticuerpo. Además, dichos polipéptidos de unión pueden ser seleccionados artificialmente usando p.ej. bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios (para una recopilación véase: Barbas CF., 1993, Curr Opin. Biotechnol., 4, 526-530; Irving y colaboradores, 2001, Curent Opin. Chem. Biol., 5:314-324; Hoogenboom HR, 1997, Trends Biotechnol., 15: 62-70) o un sistema de dos híbridos de levadura (para una recopilación véanse las citas de Fields & Sternglanc, 1994, Trends Genet., 10, 286-292; Bartel & Fields., 1995, Methods Enzymol., 254: 241-263). Además, ellos pueden ser unos fragmentos de inteínas que pueden haber sido hechos no funcionales para el empalme con inteínas.

En el invento dicha unión comprende la formación de un enlace peptídico entre dicha proteína o dichos polipéptidos que se han codificado por dichas primera y segunda secuencias de nucleótidos heterólogas. Es preferida la formación de un enlace peptídico entre los polipéptidos codificados por dichos fragmentos. Dicha unión es o comprende un trans-empalme mediado por inteínas. Con esta finalidad, dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas codifican además unas proteínas o unos polipéptidos capaces de un trans-empalme de proteínas. Por medio de dicho trans-empalme las proteínas y los polipéptidos que se han codificado por dichas primero y dicho segundo fragmentos pueden ser engarzados por formación de enlaces peptídicos. En esta forma de realización, dichos polipéptidos de unión se derivan preferiblemente de una inteína capaz de trans-empalme. Las inteínas para trans-empalme pueden ser seleccionadas a partir de los genomas nucleolares u organulares de diferentes organismos, que incluyen eucariotas, arcaebacterias y eubacterias. Las inteínas que se pueden usar para realizar el invento se enumeran en la página <http://www.neb.com/neb/inteins.html>. También, se puede usar una inteína mencionada en una preferencia aquí citada. La elección de la inteína puede depender de las secuencias de consenso así como de las condiciones requeridas para un trans-empalme eficiente.

Para el tratamiento por ingeniería genética de dichas secuencias de nucleótidos heterólogas, la secuencia de nucleótidos que codifica una inteína puede ser disociada en una parte de 5' y una parte de 3', que codifican respectivamente a la inteína de 5' y la inteína de 3' (tal como se señala aquí). Las porciones de secuencias no necesarias para un empalme con inteínas (p.ej. un dominio de endonucleasa mensajera) pueden ser suprimidas. La secuencia codificadora de inteína es disociada de manera tal que las inteínas de 5' y de 3' son capaces para el trans-empalme. En lo que se refiere a un apropiado sitio de disociación de la secuencia que codifica una inteína, se pueden seguir las consideraciones publicadas por Southworth y colaboradores (EMBO J. (1998) 17, 918-926). La capacidad de las inteínas de 5' y de 3' para el trans-empalme puede ser desde luego ensayada experimentalmente, p.ej. tal como se ha descrito por Southworth y colaboradores, (ibid). Se puede realizar un ensayo experimental mediante un trans-empalme. El ensayo experimental de las porciones de inteínas que pueden ser suprimidas sin comprometer la funcionalidad para un trans-empalme puede hacerse mediante un trans-empalme o mediante un cis-empalme.

La inteína de 5' corresponde esencialmente al primer polipéptido de unión. La inteína de 3' corresponde esencialmente al segundo polipéptido de unión. Para tratar por ingeniería genética a dichas secuencias de nucleótidos heterólogas, la secuencia que codifica la inteína de 5' es engarzada con el extremo 3' de dicho primer fragmento. La secuencia que codifica la inteína de 3' es engarzada con el extremo de 5' de dicho segundo fragmento. Particularmente en la vecindad del sitio de engarce, unos nucleótidos y/o codones (aminoácidos) pueden ser cambiados para conseguir una deseada funcionalidad de trans-empalme.

Dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga puede comprender por lo tanto: dicho primer fragmento, dicho primer polipéptido de unión, unas secuencias reguladoras para la transcripción (p.ej. un promotor, una secuencia de terminación de la transcripción en 3') y para la traducción. Dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga puede comprender: dicho segundo fragmento, dicho segundo polipéptido de unión, unas secuencias reguladoras para la transcripción (p.ej. un promotor, una secuencia de terminación de la transcripción en 3') y para la traducción. Además, ella puede contener un marcador seleccionable y/o contra-seleccionable que son necesarios para producir dicha primera y/o dicha segunda plantas y secuencias reconocidas por una recombinasa o secuencias de transposones que son específicas para un sitio (véase más adelante).

El invento se puede usar también para ensamblar dos o más rasgos, particularmente por trans-empalme. Sin embargo, dichos diferentes sistemas de inteínas deberían ser usados para el ensamble de cada rasgo con el fin de evitar un mal empalme de rasgos debido a la naturaleza universal de la interacción entre partes de inteínas, que es independiente del fragmento de proteína adjunto destinado al trans-empalme.

En el proceso de producir la planta del invento, dicha primera planta o las células de la misma se pueden producir por introducción de dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga en una planta precursora o en las células de la misma. Dicha segunda planta o las células de la misma se pueden producir por introducción de dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga en una planta precursora o en las células de la misma. Dicha introducción se puede hacer de acuerdo con métodos generalmente conocidos en la especialidad. De manera preferible, ambas secuencias de nucleótidos heterólogas son incorporadas de una manera estable en un cromosoma del genoma nuclear de la primera y de la segunda plantas. Dicha primera y dicha segunda plantas obtenidas de esta manera son hechas preferiblemente homocigóticas con respecto a las respectivas secuencias de nucleótidos heterólogas de acuerdo con procedimientos conocidos en la especialidad, particularmente por autofecundación. Dichas primera y segunda plantas pertenecen preferiblemente a la misma familia, más preferiblemente al mismo género y de manera sumamente preferible a la misma especie de organismos.

El invento proporciona plantas multicelulares (y partes de las mismas tales como semillas) que expresan un rasgo de interés y que tienen una distribución controlada de dicho rasgo a una progenie, en donde una proteína implicada en dicho rasgo es generada por unión mediante trans-empalme de polipéptidos codificados por dichas secuencias heterólogas. Dichos polipéptidos son codificados en cromosomas homólogos de dicho organismo en una primera y una segunda secuencias de nucleótidos heterólogas.

En principio, diversas localizaciones relativas de dichas primeras y dichas segundas secuencias de nucleótidos heterólogas y de los respectivos fragmentos existen en la planta transgénica del invento. Dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas en dicha planta transgénica del invento deberían estar posicionadas de tal manera que ellas se segreguen como loci (sitios) no engarzados. Dichos loci no engarzados están posicionados preferiblemente de manera tal que se reduzca al mínimo la recombinación o el cruce meiótica/o y la creación de un engarce entre dichos loci.

Unas posibles localizaciones relativas de dichas primeras y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas y dichos fragmentos contenidos en ellas se muestran generalmente en la Fig. 2B usando un organismo diploide como un ejemplo.

En el caso I de la Fig. 2B, dicho primero y dicho segundo fragmentos están situados en el mismo cromosoma, es decir ellos están engarzados físicamente en la misma molécula de ADN pero están separados unos de otros por unas secuencias de cromosomas que son nativas para el organismo. Los fragmentos pertenecerán a diferentes unidades de transcripción. Dicho cruce en meiosis puede conducir a la separación de los fragmentos (o de las secuencias heterólogas que contienen los fragmentos), la probabilidad de transferir el rasgo codificado por ambos fragmentos a una progenie es reducida en comparación con el caso convencional, en donde el rasgo es codificado por una secuencia de codificación continua.

En el caso II (véase la Fig. 2B) dicho primero y dicho segundo fragmentos están localizados en diferentes cromosomas heterólogos. La frecuencia de herencia de dicho rasgo codificado por los dos fragmentos o por los dos fragmentos en diferentes cromosomas después de un auto-cruce es de aproximadamente 50 % y después de un cruce con un organismo que no lleva ninguno de estos fragmentos es de 25 %. En los casos I y II de la técnica anterior la probabilidad de transferir ambos fragmentos a una progenie o a otros organismos es demasiado alta para finalidades prácticas, particularmente si el rasgo codificado en dichos fragmentos proporciona una ventaja para la supervivencia o la propagación. Estos casos no representan casos biológicamente seguros de una planta transgénica.

Los autores de este invento han encontrado que la frecuencia de transferencia de dicho rasgo a una progenie (después de un cruce con plantas que no tienen dicho rasgo) y con otros organismos puede ser reducida enormemente cuando dichos fragmentos están localizados en cromosomas homólogos como se muestra esquemáticamente en la Fig. 2B, casos III y IV.

En el caso III (Fig. 2B) los dos fragmentos están presentes en loci diferentes en cromosomas homólogos, es decir están engarzados en repulsión. Cuanto más cercanamente están localizados los fragmentos, tanto más baja es la frecuencia de recombinación entre dichos loci y, consiguientemente, la transferencia del rasgo a una progenie como el resultado de una hibridación cruzada. En el caso sumamente preferido (caso IV en la Fig. 2B), los fragmentos están localizados en el mismo locus en cromosomas homólogos. Por lo tanto, el rasgo se segrega confiablemente en una progenie cruzada (progenie híbrida) de la planta multicelular del invento.

Dichas localizaciones relativas de dicha primera y de dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas en cromosomas homólogos de la planta del invento se consiguen por hibridación, particularmente por cruce, de dicha primera y de dicha segunda plantas o de células de las mismas. Dicha primera y dicha segunda plantas se pueden obtener por métodos conocidos en la especialidad. Unas posibilidades adicionales se describen a continuación.

En una forma de realización, muchos transformantes se producen con dicha primera así como con dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas. Entonces, el cromosoma que tiene dicha secuencia heteróloga incorporada, así como la localización de la secuencia transformada en el cromosoma, se pueden determinar por métodos genéticos o de biología molecular. Seguidamente se puede seleccionar una planta transformada o un clon de células de la misma que tiene dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga en una localización apropiada. Luego, se puede seleccionar una planta transformada o un clon de células de la misma que tiene dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga en una localización apropiada con relación a dicha primera secuencia. De esta manera se puede escoger un apropiado par de primera y segunda plantas.

En una segunda forma de realización, una integración dirigida como diana a un locus deseado de un cromosoma deseado se emplea haciendo uso de una recombinación homóloga. Preferiblemente, una integración dirigida a una diana se hace usando una planta multicelular que tiene un sitio de dirección a diana integrado previamente en un cromosoma en combinación con una recombinación específica para un sitio. El último enfoque es particularmente útil para introducir dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas en el mismo locus del mismo cromosoma, puesto que el mismo linaje de organismo de partida que tiene un sitio de dirección a diana previamente integrado se puede usar para transformar dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos de nucleótidos heterólogas. La integración a una diana es descrita p.ej. en el documento de solicitud de patente internacional PCT/EP02/03266 (WO02/077246). Unos métodos de crear sitios para una integración dirigida a una diana en plantas con diferentes perfiles de expresión se describen en el documento PCT/US02/11924. Unos métodos de mejorar la eficiencia de una integración dirigida a la diana de un sitio se describen p.ej. en la solicitud de patente internacional PCT/EP02/03266.

Alternativamente, dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga se puede incorporar en un cromosoma del genoma nuclear del primer organismo y dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga se puede incorporar en el plastidio o en el genoma mitocondrial del mismo o de otro organismo. Sin embargo, se prefiere la incorporación de ambas secuencias de nucleótidos heterólogas dentro de cromosomas nucleares.

5 Unos métodos preferidos de producir dicha primera y dicha segunda plantas se describen esquemáticamente en el lado derecho ("escisión") de la Fig. 2E y en las Figs. 5 hasta 8. En estos métodos preferidos, las etapas (i) y (ii) de la reivindicación 1 se llevan a cabo por

10 (a) introducción de una secuencia de nucleótidos heteróloga parental que comprende dicha primera y dichas segundas secuencias de nucleótidos heterólogas en un cromosoma nuclear de organismos parentales o de células de los mismos,

(b) seleccionar opcionalmente organismos o células de los mismos, que tienen dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental integrada en un deseado cromosoma o locus de cromosoma.

15 (c) disociar subsiguientemente dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental de manera tal que dicha primera y segunda secuencias de nucleótidos heterólogas estén situadas en cromosomas homólogos en diferentes organismos de plantas o células.

20 Dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental comprende dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas. Preferiblemente, ella comprende además secuencias para escindir dicha primera y/o dicha segunda secuencias heterólogas (para obtener detalles, véase más adelante). Dicha introducción (a) puede hacerse por cualquier conocido método de transformación (véase más adelante). Se prefiere una transformación mediada por *Agrobacterium*. Unas plantas o células que son portadoras de dicha secuencia de nucleótidos heteróloga se pueden seleccionar usando un marcador seleccionable contenido en ellas. Unas plantas enteras pueden ser regeneradas a partir de células o tejidos transformadas/os. Preferiblemente, se crean unas plantas homocigóticas para dicha secuencia parental.

25 Una planta (o un grupo de plantas) portadora(s) de dicha secuencia parental se puede usar entonces para escindir dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga fuera de dicha secuencia parental. Por lo tanto se puede obtener dicha segunda planta. Otra planta (o grupo de plantas) se puede usar para escindir dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga con el fin de obtener dicha primera planta. Las secuencias heterólogas que no son escindidas están localizadas en dicha primera y dicha segunda plantas en cromosomas homólogos, particularmente en el mismo locus de dichos cromosomas homólogos, es decir en loci iso.

30 La primera y la segunda plantas o células de las mismas así obtenidas (o la progenie de las mismas) se analizan ventajosamente en cuanto a cualquier reintegración de una secuencia de nucleótidos heteróloga escindida dentro del genoma p.ej. por técnicas genéticas o de biología molecular (p.ej. por una PCR y el uso de sondas de nucleótidos para una hibridación de Southern). Se pueden seleccionar entonces plantas o células de las mismas que contengan dicha secuencia de nucleótidos heteróloga reintegrada en un locus deseado en un cromosoma homólogo con el cromosoma que alberga la secuencia de nucleótidos heteróloga que no ha sido escindida. Por lo tanto, la planta transgénica del invento se puede obtener directamente. De manera preferida, se seleccionan plantas o células de las mismas que están libres de la secuencia de nucleótidos heteróloga escindida. Dicha selección puede comprender un análisis por técnicas genéticas o de biología molecular. Preferiblemente, dicha selección es apoyada por un marcador contra-seleccionable en la secuencia heteróloga que se ha de escindir. Dicha primera y dicha
35 40 segunda plantas son hechas preferiblemente homocigóticas para dicha secuencia heteróloga que no ha sido escindida.

Dicha escisión se puede realizar p.ej. usando unas recombinasas específicas para unos sitios (compárese la Fig. 2E). Es altamente conveniente que dicha escisión se realice usando unos transposones, particularmente unos transposones no autónomos (es decir unos transposones que no codifican la respectiva transposasa). Para la última
45 forma de realización, dichas primeras y/o dichas segundas secuencias de nucleótidos heterólogas en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental es/son embebidas en uno de dichos transposones. Dicha escisión comprende proporcionar una transposasa para dicho transposón. Particularmente,

50 (A) dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental está contenida en un primer transposón y dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga está contenida en un segundo transposón, y

(B) dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga es escindida por provisión de una primera transposasa que es funcional con dicho primer transposón y dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga es escindida por provisión de una segunda transposasa que es funcional con dicho segundo transposón. Dichos primeros y dichos segundos transposones en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental preferiblemente se solapan de manera tal que una escisión de dicha primera o dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas conducen a la rotura de dicho segundo o dicho primero transposón no autónomo respectivamente. Se pueden usar convenientemente transposones solapados con un marcador seleccionable y contra-seleccionable en la región de solapamiento tal como se describe en las Fig. 7 y 8.

Además, dicha disociación de la etapa (c) no requiere necesariamente diferentes recombinasas para dicha escisión de dicha primera o dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga. En una forma de realización muy conveniente, dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental está flanqueada por diferentes sitios de recombinación de una integrasa específica para un sitio y dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental está flanqueada por diferentes sitios de recombinación de la misma integrasa específica para un sitio (compárense las Fig. 21 y 22), y la etapa (c) se lleva a cabo

- proporcionando dicha integrasa específica para un sitio a dicho organismo parental o a células del mismo,
- seleccionar la progenie de dicho organismo parental o de células del mismo que contienen dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga pero no contienen dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga,
- seleccionar la progenie de dicho organismo parental o de células del mismo que contienen dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga pero no contienen dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga.

En la etapa (iii) del procedimiento dicha primera y dicha segunda plantas o células de las mismas son luego hibridadas para obtener la planta multicelular transgénica del invento. La hibridación puede ser un cruce sexual o una fusión de células de dichas plantas. La fusión de células puede ser una fusión de células germinales o de células somáticas. Preferiblemente, una hibridación implica una polinización de plantas o una fusión con células somáticas de protoplastos. El cruce sexual de plantas es sumamente preferido. Dicha hibridación lleva a dichos fragmentos que codifican o están implicados en dicho rasgo a juntarse en una planta o en células de la misma de manera tal que dicha planta exhiba dicho rasgo de interés debido a un trans-empalme de proteínas. La exhibición de dicho rasgo debido a la unión de proteínas o al trans-empalme de proteínas significa que la unión o el trans-empalme es una condición necesaria para la expresión de dicho rasgo de interés. La producción del organismo de planta transgénica del invento puede comprender otras etapas adicionales además de dicha hibridación. Ejemplos de dichas otras etapas incluyen: el crecimiento y la cosecha de semillas, la siembra y el crecimiento de la planta del invento. En el caso de la fusión de protoplastos, dichas otras etapas incluyen: la propagación de los protoplastos fusionados para obtener colonias, y la regeneración de plantas.

Una distribución controlada de dicho rasgo a una progenie significa que la probabilidad de transferir dicho rasgo a una progenie es reducida significativamente en comparación con unos organismos transgénicos convencionales que tienen un transgén implicado en dicho rasgo de interés codificado en un locus de un cromosoma, particularmente como una única unidad de transcripción, o en cromosomas heterólogos. La frecuencia de aparición de dicho rasgo en una progenie después de haber cruzado dicha planta multicelular transgénica del invento con una planta desprovista de dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas es de menos que un 10 %, preferiblemente de menos que un 1 %, más preferiblemente de menos que un 0,1 %, incluso más preferiblemente de menos que un 0,01 %, de manera sumamente preferible de menos que 0,001 %. Como comparación, la frecuencia de aparición de un transgén en una progenie después de haber cruzado un organismo (diploide) transgénico convencional que tiene dicho transgén en una única unidad de transcripción y que es heterocigótico con respecto al transgén con otro organismo de la misma especie que no tiene dicho transgén es de aproximadamente un 50 %. Se puede comprobar experimentalmente con facilidad si una planta transgénica que expresa un rasgo de interés cumple los criterios del invento en lo que se refiere a dicha frecuencia.

En el presente contexto, un enlace peptídico significa el engarce de una amida entre el grupo carboxilo de un polipéptido y el grupo amino de otro polipéptido. El engarce no permite una rotación libre y puede aparecer en una configuración *cis* o *trans*, la última es sumamente corriente en péptidos naturales, excepto en engarces con el grupo amino de prolina, que son siempre *cis* (fuente <http://www.mblab.gla.ac.uk/dictionary/>). La formación de un enlace peptídico se puede conseguir mediante un trans-empalme mediado por inteínas.

En el procedimiento más arriba descrito se producen organismos de plantas multicelulares transgénicas. Entre las plantas se prefieren unas plantas cultivadas que incluyen las de cebada, avena, centeno, trigo, *zea mays* (*maíz*), arroz, mijo, patata, colza oleaginosa, canola, tomate, algodón, sorgo y tabaco. El invento se aplica a plantas diploides y a plantas poliploides.

Ejemplos de rasgos expresables de acuerdo con el invento, particularmente en plantas, son la esterilidad masculina, la resistencia a herbicidas, la resistencia a insecticidas, un marcador seleccionable, un marcador contra-seleccionable, la morfología de un organismo, el contenido de semillas, la estabilidad de las semillas, la adaptación al clima, el contenido de vitaminas, el contenido y la composición de hidratos de carbono, el contenido y la composición de grasas, etc. Además, dicho rasgo puede ser la expresión de una proteína de interés, particularmente de una proteína farmacéutica. Ejemplos de dichas proteínas se dan seguidamente. En un caso (compárense el Ejemplo 1) un gen reportero es expresado en una planta del invento. En otro ejemplo de este invento (Ejemplo 2) se expresa un gen de EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) que confiere resistencia a herbicidas, p.ej. tolerancia al glifosato. Dichas plantas multicelulares y dichas plantas multicelulares transgénicas del invento pueden ser adicionalmente modificadas genética o transitoriamente, p.ej. para proporcionar unas funciones necesarias para

dicho trans-empalme y/o dicha expresión del rasgo de interés. Además, se puede expresar un segundo transgén implicado en la expresión de dicho rasgo de interés o de un rasgo diferente.

El invento se puede usar para una amplia diversidad de aplicaciones. P.ej. se puede usar para expresar un rasgo de interés en dicho organismo transgénico. Dicho rasgo puede ser cualquier propiedad de dicho organismo, ya sea codificada por un único gen o por varios genes. Dicho rasgo puede ser causado por una expresión de por lo menos una proteína. Pueden ser necesarias dos o más proteínas para dicho rasgo. En este caso, puede ser suficiente controlar la expresión de solamente una proteína como se ha descrito aquí. Sin embargo es más seguro para el medio ambiente controlar todas las proteínas que producen un rasgo de acuerdo con el invento.

Una aplicación altamente importante del invento es la producción de semillas híbridas para generar plantas destinadas a finalidades agrícolas o para la producción de proteínas en dichas plantas, en donde dichas plantas tienen una distribución controlada de un rasgo a una progenie. Dichas semillas híbridas permiten la generación de unas plantas que expresan un rasgo de interés que ni es expresado en un linaje parenteral ni se segrega rápidamente en una progenie.

Producción de plantas o células de las mismas que expresan dos rasgos de interés con una distribución controlada de dichos rasgos a una progenie

Se puede hacer que las plantas multicelulares transgénicas o partes de las mismas del invento expresen dos (o más) rasgos de interés, en donde ambos o todos los rasgos pueden tener una distribución controlada a una progenie tal como más arriba se define. Para el caso preferido de dos de dichos rasgos de interés, éstos son citados en lo sucesivo como rasgo (1) y rasgo (2). La anterior descripción en lo que concierne a dicho rasgo de interés puede aplicarse a dicho rasgo (1) o a dicho rasgo (2). Preferiblemente, se aplica a dicho rasgo (1) y a dicho rasgo (2). Sin embargo, la expresión del rasgo (1) o del rasgo (2) puede depender del trans-empalme de ARN de productos de expresión de ARNm de dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas. La traducción del ARN trans-empalmado puede en este caso generar uno de dichos rasgos (1) o (2). El trans-empalme de ARN es descrito con detalle en el documento WO02/96192 y en las referencias allí citadas. Es también posible expresar dos o más rasgos a través de un trans-empalme de ARN.

Preferiblemente, la progenie generada en la etapa (iii) del procedimiento (es decir las plantas multicelulares transgénicas o las partes de las mismas de acuerdo con el invento exhibe el rasgo (1) y el rasgo (2) debido a la unión entre una proteína o un polipéptido codificado por dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga y una proteína o un polipéptido codificado por dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga. Además, dicha progenie puede exhibir el rasgo (1) o el rasgo (2) debido a un trans-empalme mediado por inteínas. Además, dicha progenie puede exhibir el rasgo (1) y el rasgo (2) debido a un trans-empalme mediado por inteínas.

En el procedimiento de producir una planta multicelular o partes de las mismas, que expresan dos rasgos de interés, las etapas (i) y (ii) se pueden llevar a cabo de una manera similar a como más arriba se ha descrito con detalle para un rasgo. La planta producida en la etapa (i) (la planta A1 en la Fig. 13) puede contener un (primer) fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (1) y un (primer) fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (2). La planta producida en la etapa (ii) (planta A2 en la Fig. 13) puede contener otro (un segundo) fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (1) y otro (un segundo) fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (2). Dichos primeros fragmentos (del rasgo (1) y del rasgo (2)) en la planta producida en la etapa (i) pueden estar en el mismo cromosoma o en diferentes cromosomas. Similarmente, dichos segundos fragmentos (del rasgo (1) y del rasgo (2)) en la planta producida en la etapa (ii) pueden estar en el mismo cromosoma o en diferentes cromosomas. Se prefiere que dichos primeros fragmentos estén en el mismo cromosoma y que dichos segundos fragmentos estén en los mismos cromosomas. Más preferiblemente, dichos primeros fragmentos están en el mismo locus de un cromosoma y dichos segundos fragmentos están en el mismo locus de un cromosoma. De manera sumamente preferible, el locus que tiene dichos primeros fragmentos de dicha primera planta y dicho locus que tiene dichos segundos fragmentos de dicha segunda planta son los mismos loci en cromosomas homólogos, es decir son loci iso.

En una forma de realización preferida, dicho primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (1) y dicho primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (2) están contenidos en dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga del invento. Similarmente, dicho segundo fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (1) y dicho segundo fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (2) están contenidos en dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga del invento. La etapa (iii) puede comprender entonces hibridar dicha primera y dicha segunda plantas o células de las mismas para generar una progenie que exhibe el rasgo (1) y el rasgo (2), en donde la exhibición del rasgo (1) es debida a una unión entre una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga y una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga.

En la forma de realización preferida más arriba mencionada, se puede conseguir convenientemente una distribución estrictamente controlada del rasgo (1) y del rasgo (2) en la planta producida por el procedimiento del invento, si dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas están situadas en loci iso en dicha primera y dicha segunda plantas. Por lo tanto, la progenie obtenida por cruce de dicha planta multicelular transgénica del

invento que expresa dichos dos rasgos de interés con otra planta que no contiene dichos fragmentos no expresará ni el rasgo (1) ni el rasgo (2).

Las etapas (i) y (ii) se llevan a cabo preferiblemente

5 (a) introduciendo una secuencia de nucleótidos heteróloga parental que contiene dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas en un cromosoma nuclear de organismos parentales o células de los mismos,

(b) seleccionando opcionalmente organismos o células de los mismos que tienen dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental integrada en un deseado cromosoma o locus de cromosoma.

10 (c) subsiguientemente disociando dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental de manera tal que dicha primera y segunda secuencias de nucleótidos heterólogas estén situadas en cromosomas homólogos en diferentes organismos de plantas o células,

en donde dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga de dicha secuencia de nucleótidos parental contiene el primer fragmento del rasgo (1) y el primer fragmento del rasgo (2), y dicha secuencia de nucleótidos heteróloga de dicha secuencia de nucleótidos parental contiene el segundo fragmento del rasgo (1) y el segundo fragmento del rasgo (2). Dicha disociación de la etapa (c) se puede llevar a cabo tal como más arriba se ha descrito, con lo que se pueden obtener la planta A1 y la planta A2. Preferiblemente, dichas plantas producidas en la etapa (i) y en la etapa (ii) son autofecundadas para hacerlas homocigóticas para dicha primera y/o dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas.

Ejemplos de un rasgo (1) y de un rasgo (2) pueden ser los dados más arriba.

20 Procedimiento de producción de semillas híbridas

En una forma de realización de enorme importancia, el rasgo (1) es una resistencia a herbicidas y el rasgo (2) es la esterilidad masculina o femenina, en donde se prefiere la esterilidad masculina. En esta forma de realización, el invento se puede usar para la producción de semillas híbridas con fines agrícolas. Por lo tanto, se describe un procedimiento de producción de semillas híbridas, que comprende producir la planta multicelular transgénica de acuerdo con el invento (aquí citada como planta A1/A2 en la Fig. 13). Preferiblemente, el rasgo (1) es una resistencia a herbicidas y el rasgo (2) es la esterilidad masculina. Dicho procedimiento de producción de semillas híbridas comprende típicamente además cruzar dicho organismo de planta multicelular transgénica con otra planta que es fértil masculina (citada aquí como planta B en la Fig. 13). La planta B no debería contener ningún fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifique dicha resistencia a herbicidas o dicha esterilidad masculina. Las semillas híbridas que crecen en la planta A1/A2 resistente a herbicidas y estéril masculina pueden ser luego cosechadas. El invento proporciona también la semilla híbrida obtenida de esta manera.

El uso de dicho rasgo de resistencia a herbicidas en el procedimiento de producir semillas híbridas tiene las siguientes ventajas (compárese la Fig.13): dicha resistencia se puede usar para seleccionar plantas que contienen dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental (el linaje A en la Fig. 13). Además, dicha resistencia a herbicidas se puede usar para seleccionar una progenie cruzada estéril masculina en la etapa (iii) del invento (progenie cruzada del linaje A1 y del linaje A2 en la Fig.13), puesto que una progenie autofecundada no estéril del linaje A1 y una progenie autofecundada no estéril del linaje A2 no son resistentes a herbicidas. Consiguientemente se pueden obtener existencias de plantas puramente estériles masculinas, y, después de un cruce con el linaje B, unas semillas de progenie que crecen en el linaje A1/A2 estéril masculino serán híbridas en un 100 %. Las semillas de progenie autofecundada que crecen en plantas del linaje B pueden ser separadas por cosecha de semillas de los linajes A1/A2 por separado con respecto a semillas que crecen en el linaje B. En contraste con los procedimientos de la técnica anterior de producir semillas híbridas usando linajes de plantas estériles masculinas, el procedimiento de producir plantas híbridas que aquí se describe tiene mucha más eficiencia y es menos laborioso de realizar, puesto que los linajes de plantas A1 y A2 pueden ser mantenidos con facilidad por autofecundación.

El linaje A que contiene la secuencia de locus pro (Fig. 13) puede ser estéril masculino. Esto es ventajoso para generar transformantes primarias del linaje A con un fenotipo deseado (p.ej. esterilidad masculina, resistencia a herbicidas, etc.) pero puede resultar difícil entonces el mantenimiento del linaje A. Por lo tanto, el linaje A puede ser diseñado de manera tal que sea fértil, pero los linajes A1 y A2 puedan todavía proporcionar una planta A1/A2 estéril masculina después de un cruce. Esto se puede conseguir separando, en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental del linaje A (locus pro), uno de los fragmentos de la secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo de esterilidad masculina a partir de su promotor. Entonces, dicho locus pro no proporcionaría esterilidad masculina, puesto que no es expresado uno de los fragmentos que codifica la esterilidad masculina. La creación de loci iso (linajes A1 y A2) puede llevar a juntarse al promotor y al fragmento de tal manera que dicho fragmento pueda ser expresado, permitiendo de esta manera obtener plantas A1/A2 estériles masculinas. Como un ejemplo, dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga puede interrumpir a dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga en el locus pro. Después de la creación de los linajes A1 y A2, una escisión de dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga puede restaurar la funcionalidad de dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga.

Debido a la distribución controlada de ambos rasgos en una progenie, la progenie cruzada (progenie F1 en la Fig. 13) mostrará un vigor híbrido y tendrá una fertilidad restaurada y una sensibilidad restaurada al herbicida para el que la planta A1/A2 era resistente. Preferiblemente, la esterilidad y la sensibilidad a los herbicidas son restauradas en por lo menos un 96 % de la progenie, más preferiblemente en por lo menos un 99 % de la progenie. Consiguientemente, dicha progenie F1 puede ser usada para la plantación a gran escala en campos agrícolas sin ningún peligro de cruzar falsamente o transferir al medio ambiente un gen funcional de resistencia a herbicidas.

En el Ejemplo 4 del invento se describe un tratamiento por ingeniería genética de un gen de AHAS disociado que proporciona resistencia a herbicidas de los tipos de imidazolinas y sulfonilureas. El gen de AHAS fue amplificado por una PCR a partir de un ADN genómico de *Arabidopsis*, mutado y clonado en vectores (Fig.16) para ensayar su funcionalidad en ensayos transitorios. En el Ejemplo 5 se describe el tratamiento por ingeniería genética de una barnasa disociada que proporciona una RNasa citotóxica. En ambos ejemplos, los autores hemos usado el sistema de inteínas para proporcionar un trans-empalme de proteínas codificadas por fragmentos de genes disociados. Un trans-empalme es mediado por dos diferentes sistemas de inteínas que no reaccionan de modo cruzado entre sí. Este sistema está basado en la inteína de DnaE PCC6803 de *Synechocystis sp.* para la AHAS y la inteína de DnaB para la barnasa. Las construcciones artificiales intermedias con fusiones de AHAS disociada y una inteína y con fusiones de barnasa disociada y una inteína se muestran en las Figuras 17 y 18, respectivamente.

Unos experimentos de ensayos transitorios mostraron el ensamble mediado por inteínas de proteínas funcionales codificadas por fragmentos de genes. El invento no está limitado al uso del gen de AHAS que proporciona resistencia a herbicidas. Se pueden usar muchos otros genes que confieren resistencia a herbicidas, sujetos a una disociación y reconstrucción correctas mediante un trans-empalme mediado por inteínas. Ejemplos de dichos genes incluyen, entre otros, los de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, fosfinotricina acetil transferasa (BAR), betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), dihidrofolato reductasa (DFR1), acetolactato sintasa (ALS), y glifosato óxidoreductasa.

Además, el de barnasa es uno de varios genes posibles que pueden proporcionar esterilidad masculina. Se pueden emplear muchos otros genes que afectan al desarrollo de polen cuando se expresan en células de anteras o en un estadio deseado de formación de polen. Realmente, cualquier gen, cuyo producto sea capaz de interferir con la función y el desarrollo del polen, se puede usar en este invento. Ejemplos de dichos genes son, entre otros, los de proteínas inhibidoras de ribosomas (Cho y colaboradores, 2001, Mol. Cells, 11, 326-333), de la proteasa sacarosa isomerasa (documento WO159135), de la glucanasa (Tsuchia y colaboradores, 1995, Plant Cell Physiol.,36, 487-494), etc. Alternativamente, se pueden usar genes responsables de incompatibilidad de fecundación (impidiendo la polinización con fecundación de plantas que contienen dichos genes) para proporcionar la producción de semillas híbridas, particularmente en vez del rasgo de esterilidad masculino que más arriba se ha discutido (Entani, T., y colaboradores, 2003, Genes Cells, 8, 203-213; Ushijima, K., y colaboradores, 2003, Plant Cell, 15, 771-781).

Diversos promotores específicos para polen o tapetum se pueden usar para impulsar la expresión de un gen o de fragmentos del gen para producir esterilidad masculina. Ejemplos de promotores específicos para tapetum son promotores de los genes A3 y A9 (documento US5723754; Hodge y colaboradores, 1991, J Exp. Botany, 42, 238 suplemento p. 46), el promotor específico para tapetum procedente del gen Osg6B de arroz (Tsuchia y colaboradores, 1994, Plant Mol. Biol., 26, 1737-1746), el promotor del gen de tabaco TA29 (Kriete y colaboradores, 1996, Plant J., 9:809-818), etc. La expresión específica para tejidos de un gen que proporciona esterilidad masculina se describe con detalle en el documento WO98/32325.

En la siguiente etapa de clonación, dichos fragmentos de genes fueron ensamblados por pares en construcciones artificiales intermedias (Fig. 19) diseñadas para un tratamiento por ingeniería genética del vector de locus pro final (Fig. 21) de acuerdo con la descripción dada en el Ejemplo 6. Dicho vector de locus pro está diseñado para la generación del linaje parental A, tal como se describe en el Ejemplo 8. Dicho linaje parental que será estéril masculino puede ser seleccionado usando la resistencia a herbicidas proporcionado por el gen de AHAS disociado. Para generar los linajes A1 y A2 a partir de la planta parental, se puede usar una recombinación específica para un sitio. Una descripción de vectores que proporcionan una actividad de recombinasas es presentada en el Ejemplo 7. Las plantas transgénicas que son portadoras de genes de recombinasas pueden ser generadas de la misma manera que las plantas parentales que son portadoras del locus pro. Unos métodos de transformación son ilustrados en el Ejemplo 8.

Con el fin de generar los linajes A1 y A2 que son portadores de loci iso, unas transformantes primarias correspondientes al linaje parental fueron polinizadas de modo cruzado con un polen de la planta que proporciona la actividad de recombinasa (Ejemplo 8). La progenie procedente de dichos cruces fue ensayada por una PCR en cuanto a la presencia de un ADN heterólogo que corresponda a un locus iso y la ausencia del ADN heterólogo que corresponde al otro locus iso y viceversa. La generación y la estructura de los loci iso es mostrada en la Figura 22. Unos linajes A1 y A2 generados que son portadores de diferentes loci iso fueron ensayados en cuanto a su funcionalidad por polinización cruzada. Si se usaron linajes homocigóticos, toda la progenie procedente de dichos linajes era resistente a los herbicidas y estéril masculina. En la Figura 22 hemos demostrado la posibilidad de generar loci iso a partir de un locus pro con la ayuda de una recombinasa específica para un sitio. Para la recombinasa PhiC13, una recombinación (escisión o integración) requiere dos diferentes sitios de recombinación, AttP y AttB. Una recombinación catalizada por esta integrasa es un proceso irreversible, puesto que conduce a la

formación de sitios AttL o AttR que no son reconocidos por la recombinasa PhiC31. El locus pro mostrado en la Figura 22 contiene tres de dichos sitios y una interacción aleatoria entre dos de ellos (catalizada por la integrasa) conduciría a un suceso de escisión con dos posibles resultados, generando ya sea el linaje A1 o el linaje A2 con loci iso. En contraste, un enfoque similar con un linaje parental transformado con el vector pICH12970 (Fig. 21) producirá cuatro diferentes variantes de loci iso con y sin un marcador seleccionable por HPT debido a la presencia de un sitio AttB adicional.

El enfoque con dicho locus pro en el linaje A parental tiene importantes ventajas con respecto a los conocidos sistemas de producción de semillas híbridas: él permite seleccionar directamente unos transformantes primarios que muestran el requerido fenotipo de esterilidad masculina; se puede ensayar la restauración de la fertilidad durante la generación de linajes A1 y A2 con loci iso procedentes del linaje parental. Esto reduce el tiempo necesario para desarrollar el sistema de producción de semillas híbridas del invento y hace que su mantenimiento sea conveniente y avanzado.

Además, el enfoque del invento es fácilmente compatible con otros métodos, por ejemplo con métodos de controlar la germinación de semillas. El control de dicha germinación puede afrontar diferentes temas específicos de seguridad biológica, especialmente en el caso de producir enzimas industriales, proteínas destinadas a la salud humana y de los animales, etc., en plantas híbridas. El hecho de controlar la germinación de semillas puede eliminar el problema causado por "voluntarias" de plantas que frecuentemente contaminan a la siguiente cosecha y pueden plantear un grave problema de seguridad biológica, especialmente en el caso de proteínas "farmacéuticas". Hay varios informes que afrontan el tema de controlar la germinación de semillas (documentos US5723765; WO9744465; US5129180; US5977441), sin embargo, estos métodos no son integrados en un procedimiento de producir semillas híbridas. El proceso de controlar la germinación de semillas cosechadas a partir de plantas híbridas puede hacerse de acuerdo con la enseñanza general de este invento. Preferiblemente, la planta (F1) híbrida es homocigótica para un locus A3 inactivo (véase la Fig. 14D) que puede controlar la germinación de semillas después de haber sido activada (el locus activado A3 es designado como A3* en la Fig. 14D). Esto proporcionaría toda la progenie de plantas F1 con el locus A3. Dicha homocigotidad en F1 se puede conseguir introduciendo una secuencia heteróloga que controla la germinación de semillas en una posición previamente determinada de un cromosoma nuclear del linaje A1/A2 (o de sus linajes precursores A1, A2 o el linaje A) y en el linaje B p.ej. por medio de una recombinación homóloga o una integración dirigida a un sitio. Alternativamente, es también posible una introgresión del locus deseado por métodos clásicos de crianza. Además, la planta híbrida (F1) deberá contener un activador (A4 + B4) para dicho locus inactivo (A3), dicho activador puede ser codificado por dos secuencias de nucleótidos heterólogas, A4 y B4 (Fig. 14D). Las secuencias A3, A4, y B4 pueden ser llevadas a juntarse como el resultado de un cruce entre el linaje A1/A2 y el linaje B para producir plantas F1. En plantas F1, el activador puede ser hecho funcional mediante un trans-empalme, mediado por inteínas o ribozimas, de secuencias de proteínas o ARN respectivamente, expresadas a partir de secuencias A4 y B4. Preferiblemente, dicho activador es una recombinasa o una transposasa bajo el control de un promotor activo transitoriamente (documento US597741), en donde dicho promotor preferiblemente no es específico para embriones, semillas o la germinación de semillas, es decir no se solapa con, ni precede a, el modelo de expresión del promotor que impulsa la expresión de uno o varios gen(es) del locus A3 que controla la germinación de semillas. El promotor controlador A3 y dicho gen que controla la germinación de semillas (A3) pueden ser separados por una secuencia de bloqueo que puede ser suprimida por dicha recombinasa/transposasa usada como dicho activador. Alternativamente, dicho promotor controlador A3 o dicho gen que controla la germinación de semillas puede ser reorientado uno con relación al otro mediante una recombinación específica para un sitio, dando como resultado una activación y una expresión de A3. El A3 activado (A3*) será heredado por la progenie de plantas F1. La progenie autofecundada de plantas F1 será homocigótica para A3*, la progenie cruzada de plantas F1 será heterocigótica para A3*. Consiguientemente, las semillas de progenie de las plantas F1 no serán viables, es decir se detendrá su crecimiento en un estadio temprano del desarrollo.

El desarrollo de una planta puede ser dividido en dos grupos principales de estadios a continuación de una germinación: estadios vegetativos (V) y estadios reproductivos (R). Los estadios vegetativos comienzan con un estadio de brote (VE) seguido por el estadio de cotiledones (VC) y por estadios consecutivos del desarrollo vegetativo hasta el comienzo de los estadios reproductivos (comenzando la floración). Por lo tanto, el invento proporciona también unas plantas que han crecido a partir de las semillas híbridas del invento, en que las semillas de progenie de dichas plantas (híbridas) no alcanza el estadio de cotiledones, preferiblemente ellas no alcanzan el estadio VC, preferiblemente ellas no alcanzan el estadio VE, de manera sumamente preferible ellas no germinan. Usando esta forma de realización, unas plantas híbridas con un contenido genético potencialmente problemático se pueden usar p.ej. para expresar una proteína de interés, sin el peligro de que unas semillas procedentes de estas plantas den lugar a plantas indeseadas en la siguiente estación de crecimiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1

Esquema general un trans-empalme mediado por inteínas que da como resultado la formación de proteínas funcionales

Figura 2

A - describe el principio general del invento, en donde tiene lugar una formación mediada por trans-empalme de una proteína funcional en células de progenie híbridas.

5 B – describe cuatro posibles localizaciones relativas de la primera y la segunda secuencias de nucleótidos heterólogos en cromosomas anfitriones de un organismo. Las casillas III y IV muestran localizaciones relativas de dichas secuencias heterólogas en la planta multicelular transgénica del invento. Se usa como ejemplo un organismo diploide que tiene dos cromosomas y un rasgo de interés codificado por dos fragmentos (A y B).

10 C - describe el principio básico de consecución de localizaciones alélicas de dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas, que proporciona un trans-empalme por medio de una integración dirigida hacia un sitio.

D - describe el principio básico de consecución de localizaciones alélicas de dicha primera y dicha segunda secuencias de ADN heterólogas, que proporciona un trans-empalme por medio de una transposición.

15 E – esquema general de métodos para la consecución de locaciones alélicas de diferentes secuencias de ADN heterólogas en cromosomas homólogos.

La Figura 3 muestra representaciones esquemáticas de regiones de ADN T para los plásmidos pIC5'gfpint y pICintgfp3'.

La Figura 4 describe representaciones esquemáticas de regiones de ADN T para los plásmidos pIC5'eps-int y pICint-eps3'.

20 La Figura 5 describe representaciones esquemáticas de regiones de ADN T para los plásmidos pIC5'eps-intM y pICint-eps3'M.

25 La Figura 6 describe una representación esquemática de una construcción artificial diseñada para conseguir una localización alélica para las partes 5' o 3' de la secuencia codificadora de EPSP (A) y de sus derivados (B y C) que resultan de una escisión de elementos transponibles no autónomos (*Ds* o *dSpm*, respectivamente) después de una exposición a una fuente de transposasa.

30 La Figura 7 describe un esquema general de una construcción artificial (un centro) que se ha diseñado para conseguir localizaciones alélicas de diferentes fragmentos de ADN heterólogos (hDNA 1 y hDNA 2) por la vía de una eliminación mediada por transposición de fragmentos indeseados después de una exposición a una fuente de transposasa. SM – marcador de transformación seleccionable, CSM - marcador contra-seleccionable. En la parte superior, se muestran los fragmentos indeseados escindidos por la acción de la respectiva transposasa. En la parte inferior, se muestran los deseados fragmentos que se han dejado atrás por la transposición.

35 La Figura 8 muestra una representación esquemática de un método de generar plantas con diferentes fragmentos de ADN heterólogos (hDNA 1 y hDNA 2) en localizaciones alélicas usando una transposición. Se proporciona una transposasa a la progenie de la planta 1 cruzando la planta 1 con la planta 2 . SM – gen marcador seleccionable; CSM – gen marcador contra-seleccionable, TPasa – transposasa.

La Figura 9 describe las construcciones artificiales intermedias y los vectores binarios que se usan para hacer las construcciones artificiales mostradas en las Figuras 3 y 4.

La Figura 10 describe un mapa del plásmido pICH5300.

La Figura 11 describe un mapa del vector binario pICBV16 de Icon Genetics.

40 La Figura 12 describe los esquemas generales para existentes sistemas de hibridación genéticos/transgénicos. Los actuales sistemas requieren tratar por ingeniería genética tres linajes de plantas - un linaje estéril masculino, un linaje mantenedor y un linaje restaurador de la fertilidad.

45 La Figura 13 describe esquemáticamente el principio del procedimiento de producir semillas híbridas de acuerdo con el presente invento. Este sistema requiere diseñar solamente un linaje parental original A con un locus pro que contiene la secuencia de nucleótidos heteróloga parental del invento. El linaje A puede ser resistente a herbicidas (H^R) y estéril masculino (ms), permitiendo una selección por uso del herbicida apropiado para el rasgo de resistencia empleado. La disociación de dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental conduce al linaje A1 y al linaje A2 que contienen dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas, respectivamente. Por lo tanto, los linajes A1 y A2 son fértiles masculinos y sensibles a herbicidas (H^S). Los linajes A1 y A2 pueden ser mantenidos por autofecundación. El cruce del linaje A1 y del linaje A2 conduce al linaje A1/A2 estéril masculino y resistente a herbicidas, en donde la progenie autofecundada del linaje A1 y la progenie autofecundada del linaje A2 se pueden eliminar usando dicha resistencia a herbicidas. El cruce del linaje A1/A2 con un linaje B que puede ser un linaje de tipo silvestre (WT) conduce a unas semillas (progenie

F1) que crecen en plantas A1/A2. Cuando dichas semillas de progenie F1 son sembradas las plantas F1 que crecen a partir de ellas mostrarán un vigor híbrido.

Las Figuras 14 A-D muestran unas etapas del procedimiento de producción de semillas híbridas de acuerdo con el invento

- 5 A – un esquema de la creación de linajes A₁ y A₂ con loci iso a partir de un linaje parental A que tiene un locus pro que contiene la secuencia de nucleótidos heteróloga parental representada en la parte superior. El tratamiento del linaje A con una recombinasa A1 elimina una parte de la secuencia de nucleótidos heteróloga parental que contiene los fragmentos HR5' y MS5', formando de esta manera el linaje A1.
- 10 El tratamiento del linaje A con la recombinasa A2 elimina una parte de la secuencia de nucleótidos heteróloga parental que contiene los fragmentos HR3' y MS3', formando de esta manera el linaje A2.
- Todos los fragmentos de genes pueden ser diseñados como fusiones por traducción con fragmentos de inteínas capaces de trans-empalme. Unos triángulos rellenos y de puntos muestran los sitios de recombinación reconocidos por diferentes recombinasas específicas para un sitio.
- 15 SM – marcador seleccionable, HR 3' - 3' fragmento del gen que confiere resistencia a herbicidas; HR 5' – 5' fragmento del gen que confiere resistencia a herbicidas; MS 3' – 3' fragmento del gen que proporciona esterilidad masculina; MS 5' – 5' fragmento del gen que proporciona esterilidad masculina.
- 20 B – creación de un linaje estéril masculino (por el fondo en el centro) por cruce del linaje A1 y del linaje A2. La progenie autofecundada del linaje A1 (imagen izquierda en el fondo) y la progenie autofecundada del linaje A2 (imagen derecha en el fondo) se pueden eliminar debido a la sensibilidad a herbicidas, permitiendo unas existencias puras del linaje A1/A2 resistente a herbicidas y estéril masculino (por el fondo en el centro).
- 25 C – producción de semillas híbridas por cruce del linaje A1/A2 (linaje A1XA2). Toda la progenie es sensible a herbicidas y estéril masculino. La progenie cruzada muestra un vigor híbrido, mientras que la progenie autofecundada del linaje B no lo hace. Las semillas de progenie autofecundada que crecen en plantas del linaje B pueden ser separadas de las semillas de progenie cruzada que crecen en un linaje A1/A2, mediante cosecha por separado.
- D – muestra la producción de semillas híbridas que proporcionan una progenie F2 con una germinación controlada de las semillas. El locus A3 proporciona el control de la germinación de semillas una vez que han sido activadas (A3*) por un activador proporcionado por los loci A4 y B4.
- 30 La Figura 15 describe unos posibles enfoques para generar loci iso. SM – marcador seleccionable. Los triángulos rellenos y de puntos muestran los sitios de recombinación reconocidos por diferentes recombinasas específicas para unos sitios.
- La Figura 16 describe unas representaciones esquemáticas de regiones de los ADN T de los plásmidos pICH 12590 y pICH12600.
- 35 La Figura 17 describe una representación esquemática de regiones de los ADN T de los plásmidos pICH12610 y pICH12650.
- La Figura 18 describe unas representaciones esquemáticas de regiones de los ADN T de los plásmidos pICH12830 y pICH12840.
- 40 La Figura 19 describe una representación esquemática de regiones de los ADN T de las construcciones artificiales pICH12910 y pICH12950.
- La Figura 20 describe una representación esquemática de regiones de los ADN T de los plásmidos pICH12870, pICH13130 y pICH13160.
- La Figura 21 describe una representación esquemática de regiones de los ADN T de los plásmidos pICH12960 and pICH12970.
- 45 La Figura 22 describe un locus pro procedente de pICH12960 del linaje A (parte superior) y la disociación de la secuencia de nucleótidos heteróloga parental para generar loci iso a partir de un locus pro de la región del ADN T del pICH12960. El locus pro contiene sitios de recombinación AttP y AttB de una integrasa. La aplicación de la integrasa conduce a la eliminación estadística de una parte del locus pro o de la otra parte, conduciendo de esta manera al linaje A1 y al linaje A2. Un análisis molecular, p.ej. con una PCR se ha de llevar a cabo típicamente
- 50 para analizar el resultado de la recombinación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

En este invento, los autores proponemos disociar la secuencia de codificación de un transgén implicado en un rasgo de interés en dos o más fragmentos que pueden estar unidos unos con otros al nivel de proteínas, particularmente por trans-empalme. Unas secuencias de nucleótidos heterólogas que contienen estos fragmentos son introducidas en el genoma de una planta anfitriona, preferiblemente dentro de cromosomas homólogos, o en el genoma y el plastoma de una planta multicelular transgénica, por hibridación de plantas parentales. Una vez transcritos y traducidos, los fragmentos de proteínas pueden ser ensamblados por trans-empalme de proteínas, formando de esta manera una proteína funcional, particularmente una proteína que puede proporcionar el rasgo de interés. Puesto que el proceso de crianza de plantas implica usualmente unos cruces parentales muy específicos, la administración de dicho proceso del invento no plantea graves problemas adicionales. Cualquier cruce espontáneo indeseado entre la planta transgénica del invento y organismos indeseados desensambla efectivamente dicho rasgo, suprimiendo de esta manera la expresión y reduciendo en gran manera la posibilidad de transferencia de un gen funcional a una progenie ilícita.

El invento permite construir unos mecanismos que podrían controlar ya sea la expresión del transgén por sí mismo o que se podrían utilizar para controlar la variedad transgénica, puesto que la progenie de cualquier cruce ilícito es hecha no viable. Ambas de estas posibilidades son consideradas, entre otras, en nuestro invento.

La enseñanza permite también a un experto en la especialidad diseñar unos esquemas para seleccionar unas transformantes basadas en un marcador seleccionable que es efectivo y operativo en la progenie To, pero los fragmentos o alelos de la cual, después de subsiguientes cruces, se segregan en una diferente progenie transgénica y por lo tanto desaparecen como un gen marcador seleccionable funcional.

Además, las enseñanzas permiten un ensamble rápido in vivo de diferentes genes cruzando organismos parentales que contienen diferentes fragmentos de una unidad de transcripción de interés, permitiendo de esta manera permutar diferentes dominios funcionales, tales como intensificadores de la traducción, péptidos de tránsito o de señal o de dirección a dianas, marcas de purificación, diferentes dominios funcionales de proteínas, etc., simplemente por cruce de unas plantas que son portadoras de fragmentos deseados de dicho gen funcional.

Hay una descripción de un sistema de producción de semillas híbridas que está basado en fragmentos del gen de barnasa. Si dichos fragmentos son expresados en la misma célula (células de anteras), los fragmentos de proteínas producidos se asocian, con lo que se restaura la actividad de barnasa, generando la esterilidad masculina (documento US6392119; Burgess y colaboradores, 2002, Plant J., 31, 113-125). Las semillas híbridas producidas con la ayuda de dicho enfoque recuperan la fertilidad debido a la segregación de los fragmentos del gen de barnasa a diferentes gametos, causando de esta manera la desactivación del gen citotóxico que es responsable de la esterilidad masculina. Sin embargo, dicho sistema tiene graves limitaciones puesto que está construido por interacciones de fragmentos de proteínas, no por un trans-empalme. Como resultado, dicho sistema es sensible a la temperatura: unas temperaturas más altas que 18°C pueden restaurar la fertilidad del linaje estéril masculino por disociación de los fragmentos de la proteína barnasa.

En el presente invento, la unión de proteínas y/o el trans-empalme se pueden conseguir usando inteínas tratadas por ingeniería genética. Las inteínas fueron primeramente identificadas como secuencias de proteínas embebidas dentro del marco de un precursor de proteína y escindidas durante el proceso de maduración de una proteína (Perler y colaboradores 1994, Nucleic Acids Res., 22, 1125-1127; Perler, F.B., 1998, Cell, 92, 1-4). Toda la información y todos los grupos catalíticos necesarios para realizar una reacción de auto-empalme residen en la inteína y en dos aminoácidos flanqueadores. El mecanismo químico del empalme de proteínas ha sido descrito por Perler y colaboradores (1997, Curr. Opin. Chem. Biol., 1, 292-299) y por Shao & Kent (1997, Chem. Biol., 4, 187-194). Las inteínas consisten usualmente en regiones de empalme terminales de N y de C y en una región de endonucleasa mensajera central o región engarzadora pequeña. Se conocen más de 100 inteínas siempre y cuando que ellas estén distribuidas entre los genomas nucleares y organulares de diferentes organismos que incluyen eucariotas, arqueobacterias y eubacterias (<http://www.neb.com/neb/inteins.html>). Se mostró que las moléculas de inteínas son capaces de un trans-empalme. La eliminación de la región de endonucleasa mensajera central no tiene ningún efecto sobre el auto-empalme de inteínas. Esto también hace posible el diseño de sistemas de trans-empalme en los cuales los fragmentos terminal de N y terminal de C de una inteína son concomitantemente expresados como fragmentos separados y, cuando se han fusionado para dar exteínas (fragmentos de proteínas, que están ligados conjuntamente con la ayuda de una inteína), pueden realizar un trans-empalme *in vivo* (Shingledecker y colaboradores 1998, Gene, 207, 187-195). Se demostró también con segmentos terminales de N y C de la inteína RecA de *Mycobacterium tuberculosis*, que un trans-empalme de proteínas podría tener lugar in vitro (Mills y colaboradores 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 3543-3548). Este fenómeno fue también identificado para la proteína DnaE de *Synechocystis sp.* cepa PCC6803 (Wu y colaboradores 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 9226-9231). Dos diferentes genes situados a una distancia de más 700 Kpb (kilopares de bases) entre ellas en hebras de ADN opuestas codifican la proteína. Se mostró también que dos secuencias de inteínas codificadas por dichos genes reconstituyen una mini-inteína disociada y son capaces de mediar en la actividad de trans-empalme de proteínas cuando ensayan en células de *Escherichia coli*. La molécula de inteína del mismo origen (inteína DnaE procedente de *Synechocystis sp.* cepa PCC6803) se usó para producir una acetolactato sintasa II funcional resistente a herbicidas, a partir de dos fragmentos no engarzados (Sun y colaboradores 2001, Appl. Environ.

Microbiol., 67, 1025-29) and la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) (Chen y colaboradores 2001, Gene, 263, 39-48) en *E. coli*.

El principio general del trans-empalme mediado por inteínas se muestra en la Fig. 1.

5 Todavía otra aplicación bien consagrada de las inteínas es su uso para sistemas de purificación de proteínas basados en inteínas (para una breve recopilación véase la cita de Amitai & Pietrokovski (1999, Nature Biotechnol., 17, 854-855). La auto-disociación de una inteína a partir de su exteína libera a la exteína como una molécula de proteína libre después de la exposición a cambios o bien en el pH (Wood y colaboradores 1999, Nature Biotechnol., 17, 889-892) o en la temperatura (Sourthworth y colaboradores 1999, Biotechniques, 27, 110-114). Alternativamente, unos agentes nucleófilos (p.ej. DTT) también inician una disociación, pero dicho agente permanece engarzado covalentemente con la proteína liberada (Klabunde y colaboradores, 1998, Nat. Struct. Biol., 5, 31-37). Por lo mejor que nosotros conocemos, no existe ninguna técnica anterior que describa el uso de un trans-empalme de proteínas mediado por inteínas para el ensamble de rasgos útiles en células de plantas de una manera biológicamente segura y controlable. El esquema general de un ensamble de rasgos mediado por un trans-empalme en una progenie F_1 es mostrado en la Figura 2A. Ninguno de dos linajes parentales (P_1 y P_2) tiene un gen lineal plenamente funcional que codifique dicho rasgo. En contraste, cada uno de ellos contiene unos fragmentos (A o B) de dicho gen localizados preferiblemente en cromosomas homólogos. Como un resultado de una hibridación entre P_1 y P_2 , se genera una progenie que proporciona un rasgo funcional debido a un ensamble de proteínas mediado por un trans-empalme, codificado por los fragmentos A y B. Es evidente, a partir de dicha Figura, que solamente una cuarta parte de la progenie S_1 derivada de una polinización autónoma del híbrido primario retendrá el rasgo de interés, mientras que la otra mitad heredará solamente uno de los dos fragmentos requeridos para proporcionar dicho rasgo y una cuarta parte no tendrá ni A ni B. Es también evidente que una polinización cruzada con cualquier otra planta (cruce ilícito) que no tenga ninguno de los fragmentos A y B, no conducirá a una transmisión del rasgo, puesto que solamente uno de los dos fragmentos necesarios para un gen funcional es transmitido a cada planta de progenie.

25 Hay varios enfoques desarrollados e inteínas tratadas por ingeniería genética que se pueden usar para practicar este invento (en las referencias más arriba citadas). Ellos cubren realmente el uso de todos los tipos conocidos de inteínas con el fin de tratar por ingeniería genética sucesos de trans-empalme en células eucarióticas. En el EJEMPLO 3 nosotros describimos una interacción mediada por inteínas, que lleva a juntarse dos dominios de la EPSP sintasa que proporcionan una resistencia a herbicidas. Esto demuestra la posibilidad de ensamblar un dímero de proteína funcional llevando a juntarse unos dominios necesarios para la función sin que tenga lugar realmente un trans-empalme de proteínas. Dichas interacciones de proteínas con proteínas mediadas por inteínas ofrecen también una alternativa en algunos casos específicos para proporcionar un rasgo sin trans-empalmar proteínas.

35 Los procedimientos del invento se pueden usar como una manera conveniente de ensamblar una deseada secuencia y/o una unidad de expresión a partir de diferentes partes en *trans*, usando como módulos o bloques de construcción diferentes plantas transgénicas. Su progenie híbrida pondría juntos a los módulos heredados a partir de diferentes organismos parentales a través de un trans-empalme mediado por inteínas tratadas por ingeniería genética. Es posible formar un rasgo de interés escogiendo el apropiado par de organismos parentales transgénicos que contienen módulos requeridos, de manera muy probable escogiendo un par apropiado de plantas parentales para producir semillas híbridas de alto valor en una crianza tradicional. Ejemplos de dichos módulos incluyen diferentes péptidos de señal, dominios de unión (p.ej. dominios de unión de celulosa, pectina, almidón, etc.), señales de retención, señales de compartimentalización, dominios de activación, dominios con actividades enzimáticas, marcas de afinidad, secuencias reguladoras, diferentes genes de interés y partes de los mismos. A este respecto, el rasgo de interés es entendido de un modo amplio e incluye no solamente una proteína funcional con unas capacidades específicas pero en particular una proteína dirigida como diana a un compartimiento o matriz macromolecular específico/a, o una proteína tratada por ingeniería genética para un subsiguiente proceso de aislamiento/purificación.

Adicionalmente, un trans-empalme al nivel de las proteínas proporciona muchas ventajas importantes que no se pueden proporcionar por trans-empalme de ARN. Dichas ventajas son el resultado de las siguientes características:

50 a) un trans-empalme mediado por inteínas da como resultado directamente la molécula de proteína, mientras que un trans-empalme mediado por ribozimas forma una molécula de ARN, la cual, en la mayor parte de los casos, será traducida para dar la proteína, restringiendo de esta manera la elección de un compartimiento celular/intercelular para dicho trans-empalme;

b) la dirección hacia una diana de componentes de un trans-empalme mediado por inteínas proporciona una gran flexibilidad, puesto que estamos tratando con moléculas de proteínas, mientras que la dirección hacia una diana de moléculas de ARN se restringe preferiblemente a un citosol;

55 c) unas inteínas tratadas por ingeniería genética, además de lo dicho anteriormente, permiten regular un trans-empalme cambiando el pH, la temperatura o los agentes nucleófilos;

d) unas inteínas tratadas por ingeniería genética para un trans-empalme interactúan con alta eficiencia y pueden llevar a juntarse a unos dominios de proteínas que proporcionarán una actividad enzimática a continuación de dicha interacción incluso sin que tenga lugar el engarce por enlaces covalentes (trans-empalme).

5 Dicha diversidad en la elección de parámetros para la regulación de un trans-empalme mediado por inteínas o una interacción (combinación de opciones de compartimentalización con una modulación de parámetros abióticos) proporciona flexibilidad y una notable variabilidad de opciones en comparación con el enfoque de trans-empalme de ARN.

10 Sin embargo, todas dichas aplicaciones potenciales tienen un valor limitado sin conocer cómo se ha de conseguir la localización sumamente preferible de dichos fragmentos heterólogos unos con relación a los otros, preferiblemente en cromosomas nucleares.

15 De acuerdo con el invento, dichos fragmentos están en diferentes cromosomas homólogos (Fig 2B, casillas III y IV). En la casilla III, la progenie autofecundada puede heredar el rasgo, pero dicho rasgo no será heredado por una progenie que resulta del cruce con unas plantas que no poseen ninguno de dichos fragmentos si es despreciado o está ausente un cruce meiótico. Una recombinación meiótica entre los dos cromosomas homólogos puede, sin embargo, engarzar físicamente a dichos fragmentos A y B. La frecuencia de dichos sucesos de recombinación depende directamente de la distancia relativa entre dichos fragmentos en los dos cromosomas homólogos.

20 Con el fin de suprimir el engarce físico de dichos fragmentos por recombinación meiótica, dichos fragmentos están colocados preferiblemente a una corta distancia relativa en cromosomas homólogos o, de manera sumamente preferible, en el mismo locus en los cromosomas homólogos (Fig. 2B, casilla IV), reduciendo al mínimo de esta manera la frecuencia de recombinación meiótica entre dichos fragmentos, prácticamente hasta cero. Existen diferentes soluciones técnicas para conseguir la localización alélica sumamente preferible de dichos fragmentos. Dichos fragmentos pueden ser integrados en el mismo locus en un sitio de integración previamente tratado por ingeniería genética por medio de una recombinación específica para un sitio (Fig. 2C). Ejemplos de dichos sistemas incluyen el sistema Cre-Lox procedente del bacteriófago P1 (Austin y colaboradores, 1981, Cell, 25, 729-736), el sistema Flp-Frt procedente de *Saccharomyces cerevisiae* (Broach y colaboradores, 1982, Cell, 29, 227-234), el sistema R-RS procedente de *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki y colaboradores, 1985, J. Mol. Biol., 182, 191-203) y la integrasa procedente del fago PhiC31 de *Streptomyces* (Thorpe & Smith, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 5505-5510; Groth y colaboradores, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 5995-6000).

30 Dichos fragmentos A y B pueden ser integrados dentro de un ADN cromosomal como una construcción artificial AB (Fig. 2D). El diseño de la construcción artificial debería permitir una eliminación selectiva de uno de los fragmentos de ADN (A o B) usando el mecanismo de un arreglo controlable de ADN (escisión o trasposición) generando de esta manera una progenie que contiene o bien el fragmento A o el fragmento B en el mismo locus, llevando a juntarse ambos fragmentos o sus transcritos por cruce de plantas que poseen solamente uno de dichos fragmentos o que poseen ambos fragmentos, pero solamente uno de los transcritos requeridos conducirá a la expresión de un rasgo de interés.

35 Un ejemplo de dicho arreglo controlado de ADN es el de flanquear fragmentos A y B con unas secuencias reconocidas por diferentes recombinasas específicas para un sitio y, después de la provisión de la respectiva recombinasa, eliminar selectivamente o bien el fragmento A o el fragmento B. Alternativamente, la localización de una región de iniciación de la transcripción (promotora) flanqueada por sitios de recombinación invertida solamente entre dichos fragmentos puede conducir a una transcripción selectiva de cualquiera de los fragmentos A o B dependiendo de dicha orientación de la región de iniciación de la transcripción. La inversión de la orientación (pero no la escisión) de dicha región puede ser inducida por exposición a la fuente de recombinasa. Como resultado de ello, es posible conseguir una transcripción selectiva ya sea del fragmento A o del fragmento B sin eliminarlo (físicamente) pero usando una inversión de ADN como un conmutador. Sin embargo, el caso de la expresión selectiva de un fragmento de ADN heterólogo en la presencia de ambas secuencias de ADN heterólogas en la misma localización no se encuentra entre las formas de realización preferidas de este invento, puesto que esto puede no proporcionar el nivel requerido de control con respecto a la expresión y al movimiento de los rasgos.

40 Una forma de realización importante de dicho arreglo controlado de ADN comprende el uso de una transposición, en la que uno de los fragmentos, por ejemplo el fragmento B, es localizado y transcrito dentro de un elemento transponible no autónomo, y su escisión desde la construcción artificial disparará la transcripción del fragmento A. La escisión del transposón puede ser seguida o no por su reinserción en cualquier lugar y se puede seleccionar una progenie que contenga solamente el fragmento A o B. Tomando en consideración que la mayor parte de las reinserciones de transposones en posiciones estrechamente vinculadas con el sitio donante (Jones y colaboradores, 1990, Plant Cell, 2, 701-707; Carroll y colaboradores, 1995, Genetics, 139, 407-420), la probabilidad de seleccionar una progenie que contenga los fragmentos A y B engarzados en repulsión (en diferentes cromosomas del par de cromosomas) es muy alta. La Figura 2E recopila una diversidad de enfoques para conseguir una localización alélica de la primera y la segunda secuencias de nucleótidos heterólogas incluyendo una integración dirigida hacia un sitio y una escisión de dichos fragmentos. La escisión de dichos fragmentos, mediada por una transposasa o mediada por una recombinasa se puede conseguir con la ayuda de un sistema (Fig. 2E, a/, a', d/ y d'/) o dos diferentes sistemas

de transposones o recombinasas (Fig. 2E, b/, b'/, c/, c'/, e/, e'/, f/ y f'/). Es preferido el uso de dos diferentes sistemas. Es más preferido el uso de dos diferentes sistemas de transposones. El uso de dos diferentes sistemas de transposones con extremos de transposones solapados, es la forma de realización sumamente preferida (c/ y c'/).

5 La descripción del diseño de una construcción artificial para el ensamble de rasgos mediante un trans-empalme de proteínas mediado por inteínas (Figuras 3, 4) o la integración de fragmentos de proteínas mediada por inteínas (Fig. 5) se describe en los Ejemplos 1, 2 y 3 respectivamente. El uso de una recombinación o transposición específica para un sitio permite el posicionamiento de la primera y la segunda secuencias de nucleótidos heterólogas a partir de una construcción artificial en los mismos loci en cromosomas homólogos, lo que es sumamente favorable para una distribución controlada de un rasgo de interés a una progenie cruzada. Una representación esquemática de dicha construcción artificial (en el ADN T o en un vector para transformación mediada por *Agrobacterium*) y de la escisión de una u otra de dichas secuencias de nucleótidos heterólogas con el uso de dos diferentes sistemas de transposones de plantas (*Spm/dSpm* y *Ac/Ds*) se muestra en la Figura 6. Aquí, los dos componentes (secuencias de nucleótidos heterólogas) del sistema de trans-empalme con inteínas están localizados en el mismo ADN T (Fig. 6 A), pero flanqueados por diferentes extremos de transposones (*Ds* o *dSpm*) reconocidos por diferentes transposasas, *Ac* o *Spm*, respectivamente. Dicho brevemente, la construcción artificial en el ADN T tiene dos elementos transponibles no autónomos con solapamiento en un extremo. La exposición de una planta o de células de plantas que es/son portadora(s) de dicha construcción artificial a una fuente de transposasa *Spm* o *Ac* conducirá a la escisión del fragmento flanqueado por las secuencias *Ds* (exposición a una transposasa *Ac*), o del fragmento flanqueado por las secuencias *dSpm* (exposición a transposasa *Spm*). Las resultantes estructuras de ADN T se muestran en las Fig. 6, B y C, respectivamente. Estas construcciones artificiales resultantes son estables incluso en la presencia de la transposasa *Spm* (en el caso de B) o *Ac* (en el caso de C), puesto que uno de los dos extremos del transposón no autónomo requerido para la transposición es escindido conjuntamente con el otro elemento transponible no autónomo. Dicha estabilización del remanente elemento transponible es muy útil, especialmente en el caso de plantas que son portadoras de una fuente de transposasas endógenas, p.ej. maíz en el caso de la transposasa *Ac* o *Spm*. El esquema de eliminación selectiva, basada en transposones, de fragmentos de ADN indeseados se muestra en la Fig. 7. Aquí, una transposición conduce también a una eliminación de otras secuencias indeseadas, p.ej. de un marcador seleccionable (SM) y un marcador contra-seleccionable (CSM), facilitando de esta manera el escrutinio de plantas o células de plantas que sea(n) portadora(s) solamente de la requerida secuencia de nucleótidos heteróloga (hDNA 1 o 2). Uno de los posibles esquemas para generar plantas con diferentes secuencias de nucleótidos heterólogas en relación alélica se muestra en la Figura 8. Estos ejemplos con genes marcadores seleccionables no están limitados a genes que confieran resistencia a antibióticos o a herbicidas. Se muestra más adelante una extensa lista de tales genes. Ejemplos de algunos genes marcadores contra-seleccionables aplicables a sistemas de plantas, el codA bacteriano y el citocromo P-450 (Kopreck y colaboradores, 1999, Plant J., 19, 719-726; Gallego y colaboradores, 1999, Plant Mol Biol., 39, 83-93), se describen en un cierto número de publicaciones, incluyendo su aplicación en combinación con sistemas de transposones (Tissier y colaboradores, 1999, Plant Cell, 11, 1841-1852).

Hay unos sistemas de transposones bien estudiados para plantas que se describen abundantemente en la bibliografía (para recopilaciones véanse: Dean y colaboradores, 1991, Symp Soc Exp Biol., 45, 63-75. Walbot, V., 2000, Plant Cell Physiol, 41, 733-742; Fedoroff, N., 2000, Proc Natl Acad Sci USA., 97, 7002-7007). Los sistemas *Ac/Ds* (Briza y colaboradores, 1995, Genetics, 141, 383-390; Rommens y colaboradores, 1992, Plant Mol Biol, 20, 61-70; Sundaresan y colaboradores, 1995, Genes Dev., 9, 1797-810; Takumi, S. 1996, Genome, 39, 1169-1175; Nakagava y colaboradores, 2000, Plant Cell Physiol., 41, 733-742) y *Spm/dSpm* (Cardon y colaboradores 1993, Plant J. 3. : 773-784; Aarts y colaboradores 1995, Mol Gen Genet., 247. 5555-64; Tissier y colaboradores, 1999, Plant Cell; 11, 1841-1852) están bien consagrados para la marcación por transposones en muchas especies de plantas incluyendo muchas plantas cultivadas, y su adopción para practicar este invento es una cuestión rutinaria para los que están familiarizados con la especialidad. Este invento no está limitado a los sistemas *Ac/Ds* y *Spm/dSpm*. Realmente, cualquier sistema de transposón activo en plantas que emplean un mecanismo "de corte y empaste" [en inglés "cut-and-paste"] (escisión y inserción) para su transposición puede ser empleado en este invento.

En los ejemplos, nosotros hemos usado el suministro de ADN T mediado por *Agrobacterium* en células de plantas, en donde dicho ADN T contiene dicha primera y/o dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas como un vector. Se pueden usar diferentes métodos para el suministro de vectores a células de plantas tales como una introducción directa de dicho vector dentro de células por medio de un bombardeo con microproyectiles, una electroporación o una transformación de protoplastos mediada por PEG. Se prefiere una transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. De esta manera, un ADN puede ser transformado en el seno de células de plantas por diferentes tecnologías apropiadas tales como mediante un vector plásmido TI soportado por *Agrobacterium* (documentos US 5.591.616; US 4.940.838; US 5.464.763), bombardeo con partículas o microproyectiles (documento US 05100792; EP 00444882B1; EP 00434616B1). En principio, se pueden usar también otros métodos para la transformación de plantas, p.ej. una microinyección (documentos WO 09209696; WO 09400583A1; EP 175966B1), una electroporación (documentos EP00564595B1; EP00290395B1; WO 08706614A1), etc. La elección del método de transformación depende de la especie de plantas que se haya de transformar. Por ejemplo un bombardeo con microproyectiles puede ser preferido para una transformación de plantas monocotiledóneas, mientras que para plantas dicotiledóneas una transformación mediada por *Agrobacterium* proporciona generalmente mejores resultados.

El sistema de trans-empalme descrito en nuestro invento comprende dos fragmentos, que son proporcionados en posición trans y están localizados en posiciones alélicas en cromosomas homólogos. Esto significa que nuestro sistema es mejor controlado y más seguro, p.ej. puede tener un nivel cero de expresión de rasgos en el estado no inducido y una transferencia cero de rasgos durante una polinización cruzada con otras plantas.

5 Genes de interés, o fragmentos de los mismos, que pueden ser expresados, en orientación del mismo sentido o antisentido, usando este invento incluyen: enzimas que modifican a almidones (la almidón sintasa, la enzima de fosforilación de almidón, la enzima desramificadora de almidón, enzima ramificadora de almidones, la enzima ramificadora de almidón II, la almidón sintasa unida a gránulos), la sacarosa fosfato sintasa, la sacarosa fosforilasa, la poligalacturonasa, la polifrufructano sacarasa, la ADP glucosa pirofosforilasa, la ciclodextrina glicosil transferasa, la fructosil transferasa, la glicógeno sintasa, la pectina esterasa, aprotinina, avidina, la levano sacarasa bacteriana, la proteína glgA de *E.coli*, la MAPK4 y ortólogas, la enzima de asimilación/metabolismo de nitrógeno, la glutamina sintasa, la osmotina de plantas, la albumina 2S, taumatina, una recombinasa/integrasa específica para un sitio (FLP, Cre, recombinasa R, Int, integrasa R SSVI, integrasa phiC31, o un fragmento activo o una variante de la misma), isopentenil transferasa, Sca M5 (calmodulina de soja), una toxina del tipo de coleopterano o un fragmento activo como insecticida, proteínas de fusión de la enzima conjugadora de ubiquitina (E2), enzimas que metabolizan a lípidos, aminoácidos, azúcares, ácidos y polisacáridos, la superóxido dismutasa, una forma de proenzima inactiva de una proteasa, toxinas de proteínas de plantas, rasgos que alteran a las fibras en plantas productoras de fibras, toxina activa como coleopterano procedente de *Bacillus thuringiensis* (toxina de Bt2, la proteína cristal insecticida (ICP), la toxina de CryIC, la delta endotoxina, una toxina de polio péptido, una protoxina, etc.), una toxina específica para insectos AaIT, enzimas que degradan a celulosas, la celulasa E1 procedente de *Acidothermus celluloticus*, enzimas que modifican a ligninas, la cinamoíl alcohol deshidrogenasa, la trehalosa-6-fosfato sintasa, enzimas de la ruta metabólica de las citocininas, la HMG-CoA reductasa, una pirofosfatasa inorgánica de *E. coli*, una proteína de almacenamiento en semillas, la licopeno sintasa de *Erwinia herbicola*, la ACC oxidasa, la proteína codificada por pTOM36, la fitasa, la cetohidrolasa, la acetacetil CoA reductasa, la PHB (polihidroxibutanoato) sintasa, una proteína portadora de acilo, napina, EA9, una fitoeno sintasa que no es de plantas superiores, la proteína codificada por pTOM5, un ETR (receptor de etileno), la piruvato fosfato dicinasa plastídica, una proteína de poros transmembranales inducible por nematodos, un rasgo que intensifica la función fotosintética o como plastidio de la célula de planta, la estilbeno sintasa, una enzima capaz de hidroxilar a fenoles, la catecol dioxigenasa, la catecol 2,3-dioxigenasa, la cloromuconato cicloisomerasa, la antranilato sintasa, la proteína AGL15 de *Brassica*, la fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa), la AMV RNA3, la PVY replicasa, la PLRV replicasa, la proteína de recubrimiento de potivirus, la proteína de recubrimiento de CMV, la proteína de recubrimiento de TMV, la replicasa de luteovirus, el ARN mensajero de MDMV, una replicasa geminivirírica mutante, una acil-ACP tioesterasa que prefiere a C12:0 de *Umbellularia californica*, una acil-ACP tioesterasa que prefiere a C10 o C12:0 de planta, una acil-ACP tioesterasa que prefiere a C14:0 (luxD), el factor A de sintasa de planta, el factor B de sintasa de planta, la 6-desaturasa, una proteína que tiene una actividad enzimática en la oxidación peroxisomal de ácidos grasos en células de plantas, una acil-CoA oxidasa, una 3-cetoacil-CoA tiolasa, una lipasa, una acetil-CoA-carboxilasa de maíz, una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSP), una fosfinotricina acetil transferasa (BAR, PAT), la proteína CP4, la ACC desaminasa, una ribozima, una proteína que tiene un sitio de disociación posterior a la traducción, una proteína de fusión que consiste en un dominio de unión a ADN de un activador de la transcripción de Gal4 y en un dominio de activación de la transcripción, una fusión por traducción de la proteína oleosina con una proteína de interés capaz de dirigir a la proteína de fusión hacia la diana de la fase de lípidos, el gen de DHPS que confiere resistencia a sulfonamidas, una nitrilasa bacteriana, la 2,4-D monooxigenasa, una acetolactato sintasa o una aceto-hidroxiácido sintasa (ALS, AHAS), una poligalacturonasa, una nitrilasa bacteriana, una fusión de la región hidrófoba amino terminal de una proteína translocadora de fosfato madura, que reside en la membrana de envoltura interna del plastidio con una proteína de interés que ha de ser dirigida a diana dentro de dicha membrana, etc.

Se puede expresar cualquier proteína humana o animal, particularmente en semillas híbridas y plantas que han crecido a partir de ellas, usando el sistema de trans-empalme del invento. Ejemplos de tales proteínas de interés incluyen, entre otras, las siguientes proteínas (proteínas farmacéuticas): proteínas de respuesta inmunitaria (anticuerpos monoclonales, anticuerpos monocatenarios, receptores de células T, etc.), antígenos, factores estimulantes de colonias, relaxinas, hormonas polipeptídicas, citocinas y sus receptores, interferones, factores de crecimiento y factores de coagulación, una enzima lisosomal activa enzimáticamente, polipéptidos fibrinolíticos, factores de coagulación de la sangre, tripsinógeno, 1-antitripsina (AAT), al igual que fusiones similares a proteínas que conservan la función, versiones mutantes y derivados sintéticos de las anteriores proteínas.

El invento puede comprender además la expresión de un gen que codifica una proteína supresora del silenciamiento de genes después de la transcripción (PTGS acrónimo de post-transcriptional gen silencing) o una variante que conserva la función o un fragmento de la misma en una planta para suprimir el PTGS de dicha secuencia codificadora transgénica. Dicho gen de una proteína supresora del PTGS o una variante conservadora de la función o un fragmento de la misma puede ser proporcionado a una planta en el mismo vector que es portador de dicha secuencia codificadora transgénica o en un vector suplementario. Dicha proteína supresora del PTGS es preferiblemente de origen vírico o vegetal. Ejemplos de proteínas supresoras del PTGS son la proteína p25 del virus X de la patata, la proteína AC2 del virus del mosaico de la mandioca africana, la proteína P1 del virus de la mancha amarilla del arroz, la proteína 19K del virus del marchitamiento peludo del tomate, la CAM rgs o una variante que conserva la función o un fragmento de una de estas proteínas. Dicha variante que conserva la función o dicho

fragmento tiene preferiblemente una identidad entre secuencias de un 75 %, preferiblemente de por lo menos un 75 %, con una de las anteriores proteínas.

Detalles acerca de las proteínas supresoras del PTGS y de su uso se pueden hallar en el documento WO0138512.

5 El invento proporciona además un organismo de planta multicelular transgénica que expresa un rasgo de interés, teniendo dicho organismo una distribución controlada de dicho rasgo a una progenie, en donde la expresión de dicho rasgo implica la producción de una molécula de proteína por trans-empalme de fragmentos de polipéptidos, en donde dichos fragmentos de polipéptidos son codificados en diferentes secuencias de nucleótidos heterólogas. Dichas diferentes moléculas de nucleótidos heterólogas son incorporadas en cromosomas homólogos de esta planta. Preferiblemente, dichos polipéptidos forman, después de un trans-empalme o de otra específica interacción de polipéptidos, una proteína heteróloga.

10 El invento comprende además semillas de plantas obtenidas por dicha hibridación. Además, se proporcionan en la reivindicación 9 unas plantas o un material de plantas (particularmente semillas o células de las mismas) que se obtienen o son obtenibles de acuerdo con la etapa (i) o etapa (ii) del procedimiento. Más aún, se describen unos vectores para realizar el procedimiento del invento, en donde dichos vectores comprenden la secuencia de nucleótidos heteróloga parental que aquí se define. Además, se describen unos vectores para realizar el procedimiento del invento, particularmente los que se muestran en las Figuras y los usados en los Ejemplos del invento.

15 En resumen, nosotros proponemos unos sistemas de fijación de rasgos/genes que están basados en un principio modular de proporcionar fragmentos o sub-unidades de proteínas no funcionales para el ensamble de rasgos dentro de una proteína funcional. Dichos sistemas recurren a un control genético del rasgo de interés mediante por lo menos dos loci que se segregan independientemente durante unos cruces, especialmente durante unos cruces sexuales ilícitos o en el proceso de una hipotética transferencia horizontal. Basándose en el presente invento, dichos sistemas de fijación recurren a un ensamble de una proteína funcional cuando los necesarios loci están presentes y son expresados en la misma célula o en el mismo organismo. Basándose en el presente invento, dicha ganancia de función se consigue preferiblemente mediante un trans-empalme de proteínas. Se había mostrado antes que un trans-empalme mediado por inteínas permite un ensamble de proteínas funcionales a partir de fragmentos de proteínas no funcionales *in vitro* (Mills y colaboradores, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 3543-3548), al igual que en diferentes microorganismos (Shingledecker y colaboradores, 1998, Gene, 207, 187-195; Wu y colaboradores, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 9226-9231; Sun y colaboradores, 2001, Appl. Environ. Microbiol., 67, 1025-29; Chen y colaboradores, 2001, Gene, 263, 39-48). El presente invento, sin embargo, no está limitado a un trans-empalme de proteínas como el mecanismo de ensamble de proteínas funcionales. Dicha funcionalidad que conduce a un rasgo de interés se puede conseguir también proporcionando diferentes subunidades de una proteína heteromérica, siempre y cuando que (a) la funcionalidad de la proteína de interés dependa de la presencia de las subunidades en cuestión y (b) los genes para sus componentes sean codificados de una manera tal que se permita impedir cruces ilícitos.

20 El invento permite también ensamblar una secuencia que codifica una proteína a partir de módulos de p.ej. péptidos de señal, dominios de unión, señales de retención, señales trans-membranales, dominios de activación, dominios con actividades enzimáticas, marcas de afinidad y secuencias reguladoras. Dicho enfoque modular hace que sea sencillo encontrar una óptima casete de expresión para una específica finalidad o encontrar un óptimo péptido secretorio o de tránsito para un específico gen que ha de ser sobreexpresado y acumulado en la célula o en un específico compartimiento de la misma. Puede ser una valiosa herramienta para estudios genómicos y proteómicos funcionales. Se puede crear p.ej. una biblioteca de plantas, en donde cada miembro de la biblioteca contiene un módulo particular (p.ej. un específico péptido de señal) de una de las anteriores clases de módulos p.ej. como dicho primer fragmento. El segundo fragmento codificará entonces una proteína de interés. A continuación de dicha hibridación, la secuencia de dicha proteína es unida a dichos módulos por trans-empalme.

25 Un empalme de proteínas puede producirse solamente entre por lo menos dos loci diseñados genéticamente, se realiza *in vitro* con una muy alta eficiencia, permitiendo de esta manera un empalme cuantitativo de polipéptidos parentales, y puede realizarse entre unos polipéptidos que son codificados en diferentes genomas organulares, tales como un genoma nuclear, un plastidio o genomas mitocondriales, o episomas extracromosomales, siempre y cuando que los polipéptidos traducidos sean dirigidos a la diana del mismo orgánulo.

30 Se deberá mencionar que la tecnología aquí descrita puede ser aplicada similarmente a animales multicelulares. Se excluyen los seres humanos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

35 **Trans-empalme de GFP mediado por inteínas**

El extremo 5' del gen de GFP fue amplificado por una PCR usando los cebadores 35spar3 (cgc aca atc cca cta tcc ttc g) y gfppr8 (ctg ctt gtc ggc cat gat ata g) procedentes del plásmido piCH5290 (35S - director omega - secuencia de codificación de gfp - terminador ocs en el vector binario piCBV1 de Icon Genetics que contiene el BAR para la selección de plantas, Fig. 9). Un fragmento de ADN que contenía el extremo terminal de C de la inteína de DNAE de *Synechocystis* fue amplificado por una PCR a partir de un ADN genómico (cepa PCC6803 procedente del American Type Culture Center) usando los cebadores *gfinte1* (cta tat cat ggcc gac aag cag aag ttt gcgg aatat tgcc tcagt) y *intepr2* (ttt gga tcc tta ttt aat tgt ccc age gtc aag). Una fusión de la inteína y de los fragmentos de GFP se hizo por una PCR usando unos fragmentos de ADN previamente amplificados y los cebadores 35Spr3 y intepr2 para la segunda amplificación. El producto de la PCR fue clonado como un fragmento de Nco1-BamHI en piCBV16 (vector binario de Icon Genetics con NptII para la selección de plantas, Fig. 11; se pueden usar también otros vectores binarios). El resultante plásmido, piC5'gfpint (Fig 3), fue comprobado por secuenciación.

El extremo 3' del gen de GFP fue amplificado por una PCR usando los cebadores gfppr9 (aag aac ggc atc aag gtc aac) y *nosterrev* (tca tcg caa gac egg caa cag g) procedentes del plásmido piCH5290. Un fragmento de ADN que contenía el extremo terminal de N de la inteína de DNAE de *Synechocystis* fue amplificado por una PCR a partir de un ADN genómico usando los cebadores *intepr3* (ttt cca tgg tta aag tta tcg gtc gtc) y *integfp2* (gtt cac ctt gat gcc gtt ctt aca att ggc ggc gat cgc ccc att). Una fusión de la inteína y de los fragmentos de GFP se hizo por una PCR usando unos fragmentos de ADN previamente amplificados y los cebadores intepr3 y nosterrev para la segunda amplificación. El producto de la PCR fue clonado como un fragmento de Nco1-BamHI en piCBV16. El resultante plásmido, piCintgfp3' (Fig. 3) fue comprobado por secuenciación.

El producto del gen de GFP que resulta a partir de un trans-empalme mediado por inteínas contiene seis aminoácidos adicionales (KFAEYC) entre los aminoácidos 156 (K) y 157 (Q). Se mostró que esta inserción no afecta significativamente a la fluorescencia de la GFP (Ozawa y colaboradores, 2001, Anal. Chem., 73, 5866-5874). Las piC5'gfpint y piCintgfp3' fueron transformadas en el seno de *Agrobacterium* cepa GV3101 por electroporación. Ambas construcciones artificiales fueron expresadas concomitantemente de manera transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* usando una expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* (Vaquero y colaboradores, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 11128-11133). La fluorescencia de la GFP fue detectada cuando ambas construcciones artificiales fueron expresadas concomitantemente pero no cuando las construcciones artificiales fueron expresadas individualmente.

Ambas construcciones artificiales fueron transformadas también en el seno de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) como ha sido descrito por Bent y colaboradores (1994, Science, 285, 1856-1860). Las semillas fueron cosechadas tres semanas después de una infiltración en vacío, y germinadas y escrutadas en cuanto a transformantes sobre placas que contenían 50 mg/l de kanamicina. Las mismas construcciones artificiales se usaron también para la transformación de discos de hojas de plantas de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium* (Horsh y colaboradores, 1985, Science, 227, 1229-1231) usando 50 mg/l de kanamicina para la selección de transformantes. En tabaco y *Arabidopsis*, la fluorescencia de la GFP no podría ser detectada en transformantes con cualquiera de las construcciones artificiales a solas, pero fue detectada en plantas F₁ que contenían ambos transgenes.

EJEMPLO 2**Trans-empalme de EPSP mediado por inteínas**

La enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa (EPSP sintasa) cataliza la formación del 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato a partir de fosfoenolpiruvato y shikimato 3-fosfato. La EPSP sintasa es la diana celular del herbicida glifosato (N-fosfonometilglicina). Un alelo mutante del gen *aroA* de *Salmonella typhimurium* con una mutación P101 S codifica una EPSP sintasa con actividad disminuida para el glifosato. Una expresión de este gen en plantas confiere resistencia al glifosato (Cornai y colaboradores, 1985, Nature, 317, 741-744). El extremo 5' del gen de EPSP mutante fue amplificado por una PCR a partir de un ADN genómico de *Salmonella typhimurium* (preparado a partir de la cepa ATCC 39256 procedente del American Type Culture Center) usando los cebadores *eps1* (tctcc atg gaa tcc ctg acg tta caa c) y *epspr2* (acc tgg aga gtg ata ctg ttg). Un fragmento de ADN que contenía el extremo terminal de C de la inteína de DNAE de *Synechocystis* fue amplificado por una PCR a partir de pIC5'gfpint usando los cebadores *intepr5* (caa cag tat cac tct cca ggt aag ttt gcg gaa tat tgc ctc agt) y *intepr2*. Una fusión de los fragmentos de EPSP y de inteínas se hizo por una PCR usando fragmentos previamente amplificados de ADN y los cebadores *eps1* y *intepr2*. El producto de la PCR fue clonado como un fragmento de Nco1-BamHI en pICH5300 (vector binario de Icon Genetics con el gen BAR para la selección de plantas, Fig. 10). El resultante plásmido, pIC5'eps-int (Fig 4), contiene la fusión de EPSP y una N-inteína bajo el control del promotor 35S, fusionado con traducción a un péptido de tránsito de cloroplasto artificial (massm lssaav vatra saaqa smvap ftglk saasf pvtrk qnld itsia sngr vqca). El pIC5'eps-int fue comprobado por secuenciación.

El extremo 3' del gen de EPSP mutante fue amplificado por una PCR a partir de un ADN genómico de *Salmonella typhimurium* usando los cebadores *eps3* (cgc tat ctg gtc gag ggc gat) y *eps4* (cgg ggaatcc tta ggc agg cgt act cat tc). Un fragmento de ADN que contenía el extremo terminal de N de la inteína de DNAE de *Synechocystis* fue amplificado por una PCR a partir de pCintgfp3' ADN usando los cebadores *intepr3* y *intepr6* (atc gcc ctc gac cag ata gcg gga ttt gtt aaa aca att ggc ggc gat). Una fusión de los fragmentos de inteína y EPSP se hizo por una PCR usando fragmentos de ADN previamente amplificados y los cebadores *intepr3* y *eps4*. El producto de la PCR fue clonado como un fragmento de Nco1-BamHI en pICH5300. El resultante plásmido, pCint-eps3' (Fig 4), contiene la fusión de una C-inteína y EPSP bajo el control del promotor 35S, fusionado con traducción con el péptido de tránsito de cloroplasto artificial. El pCint-eps3' fue comprobado por secuenciación.

El producto del gen de EPSP que resulta a partir de un trans-empalme mediado por inteínas contiene diez aminoácidos adicionales (KFAEYCFNKS) entre los aminoácidos 235 (G) y 236 (R). Se ha mostrado con anterioridad que esta posición en el gen de EPSP puede acomodar inserciones de por lo menos 5 hasta 12 aminoácidos sin comprometer a la función del gen (Chen y colaboradores, 2001, Gene, 263, 39-48). Las pIC5'eps-int y pCint-eps3' fueron transformadas en el seno de la cepa GV3101 de *Agrobacterium* por electroporación. Ambas construcciones artificiales fueron transformadas en el seno de plantas *Arabidopsis thaliana* (Col-0) como se ha descrito por Bent y colaboradores (1994, Science, 285, 1856-1860). Las semillas fueron cosechadas tres semanas después de una infiltración en vacío, germinadas en tierra y escrutadas en cuanto a transformantes por atomización en varias veces con una solución que contenía 50 mg/l de fosfinotricina (PPT).

Las mismas construcciones artificiales se usaron también para la transformación de discos de hojas de plantas de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium* (Horsh y colaboradores, 1985, Science, 227, 1229-1231) usando 10 mg/l de PPT para la selección de transformantes. Las transformantes fueron comprobadas en cuanto a la actividad del gen de EPSP por atomización de plantas con una formulación comercial de glifosato (N-fosfonometilglicina). Tanto para *Arabidopsis* como para tabaco, las transformantes que contenían cualquiera de las construcciones artificiales a solas no exhibían resistencia a glifosato. Las plantas F1 que contenían ambas construcciones artificiales eran resistentes al glifosato.

EJEMPLO 3**Ensamble de EPSP funcional mediado por inteínas sin trans-empalme**

La pIC5'eps-intM es similar a la construcción artificial pIC5'eps-int pero difiere junto a la unión de la EPSP y la N inteína por la adición de 4 aminoácidos de N exteína nativos en vez de cinco y por el primer aminoácido de la N inteína que se cambió de Cys a Ala. La PICS'eps-intM se produjo siguiendo la misma estrategia que para la PICS'eps-int excepto que se usó el cebador *intepr7* (caa cag tat cac tct cca ggt ttt gcg gaa tat gcc ctc agt ttt ggc ac) en vez del cebador *intepr5*.

La pCint-eps3'M es similar a la construcción artificial pCint-eps3' pero difiere junto a la unión de la C inteína y la EPSP por la adición de 3 aminoácidos de C exteína en vez de cinco, el primero de ellos mutado de Cys a Ala, y los otros dos nativos, y por el último aminoácido de C inteína que se cambió de Asn a Ala. La pCint-eps3'M se produjo siguiendo la misma estrategia que para la pCint-eps3' excepto que se usó el cebador *intepr8* (atc gcc ctc gac cag ata gcg gtt aaa age age ggc ggc gat cgc ccc att g) en vez del cebador *intepr6*.

Los tres aminoácidos mutados impiden por completo el trans-empalme mediado por inteínas pero no impiden una asociación de los fragmentos de N y C inteínas ((Chen y colaboradores, 2001, Gene, 263, 39-48). La pIC5'epsp-intM y la pICint-epsp3'M fueron transformadas en el seno de la cepa GV3101 de *Agrobacterium* por electroporación. Ambas construcciones artificiales fueron transformadas en el seno de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) y tabaco como se ha descrito más arriba. Todos los transformantes primarios eran sensibles al glifosato, pero unas plantas híbridas F1 que contenían ambas construcciones artificiales, ya sea en tabaco o en *Arabidopsis*, exhibían resistencia al glifosato.

EJEMPLO 4

Disociación del gen de AHAS de *Arabidopsis*

El gen de acetolactato sintasa (AHAS) procedente de *Arabidopsis* (Genbank nº de acceso AY042819) fue amplificado a partir de un ADN genómico de *Arabidopsis* usando los cebadores *Als1* (5' taaaccatgg cggcggaac aacaac 3') y *Als2* (5' gactctagac cgtttcatctctcagtatt taatc cggcc atctcc 3') y clonado como un fragmento de Nco1-Xba1 en el vector binario pICBV24 de Icon Genetics (Kan^r, selección en *E.coli* y *Agrobacterium*). El Ser653 fue mutado a Asn por una PCR usando los cebadores *Alsm5* (5' caggacaagt ctctcgtcgtatg 3'), *Als4* (5' gaaagtgccca ccatcggga tcatcg 3'), *Als3* (5' cgatgatccc gaatggtggc ac 3') y *Als2*. El fragmento amplificado mutado fue clonado como un fragmento de Nhe1 - Age1. Un segundo aminoácido, Pro197, fue mutado a Ser por una PCR usando los cebadores *Als1*, *Alsm5*, *Alsm6* (5' acgacgagag actgtcctg tg 3') y *Alspr1*. El fragmento amplificado mutado fue clonado como un fragmento de SapI-MluI.

El promotor de actina1 de arroz fue amplificado por una PCR a partir de un ADN genómico de arroz usando los cebadores *Actpr1* (5' atgggcgcccagatctgca tgccggtcga ggtcatcat atgcttgag 3') y *Actpr2* (5' cgccatggtt tatcgatagc ttatcgtcta cctacaaaaa agctccgcac g 3'). El producto de la PCR fue clonado corriente arriba del gen de AHAS como un fragmento de Ascl-NcoI. El resultante plásmido, pICH12590 (Fig.16) contiene el promotor de actina1 de arroz seguido por la secuencia de codificación de AHAS de *Arabidopsis* con dos aminoácidos mutados, y el terminador Nos.

El gen de Ahas mutado fue disociado en dos partes usando la inteína de DnaE PCC6803 de *Synechocystis sp.* Para ensayar una posición para la disociación de AHAS, los aminoácidos RAEELLK (aminoácidos 428 hasta 434) fueron reemplazados por los aminoácidos DVKAYCFNKKG usando una PCR con los cebadores *Alsm5*, *Alsm4* (5' ggccatggtt aaaacaatat tccgaaact tgacgtcgtt ctcaagaacc ttattcatcc 3'), *Alsm3* (5' gcggaatatt gtttaacca tggccttgat tttggagttt ggagg 3') y *Nosterrev* (5' tcatcgcaag accggcaaca gg 3'). Esta sustitución da como resultado una proteína que es similar a la proteína que se produciría por trans-empalme mediado por inteínas de las construcciones artificiales descritas seguidamente (pICH12610 y pICH12650, véase la Fig. 17). El fragmento mutado fue subclonado como un fragmento de BspEI-ScaI. El resultante plásmido, pICH12600 (Fig. 16), fue ensayado en cuanto a la actividad de AHAS por bombardeo de cultivos en suspensión de células de *Triticum monococcum* y selección sobre placas que contenían sulfometurón metilo 0,5 a 3 microMolar (Sigma).

La parte de inteína-N de la inteína de DnaE fue amplificada por una PCR a partir de un ADN genómico de *Synechocystis* con los cebadores *IntN1* (5' gcaagcttga cgtaagttt gcggaatatt gcctcagt 3') y *IntN3* (5' cgcttagagt cgacctgcag ttatttaatt gtcccagcgt caag 3'), y subclonada dentro de pICH12600 (Fig. 16) como un fragmento de Aat2-Xba1. El resultante plásmido, pICH12610 (Fig. 17), contiene la parte de N del gen de AHAS fusionada con el fragmento de inteína-N.

Un fragmento de PCR que contenía la parte de inteína-C de la inteína de DnaE fue amplificado a partir de un ADN genómico de *Synechocystis* con los cebadores *Ctinte1* (5' ggtctagaatcgatggttaaagtatcggtcgtcg 3') y *IntC2* (5' cgccatggtt aaaacaattg cggcgcatcg c 3'). Un fragmento de PCR que contenía una señal de dirección a diana de cloroplasto artificial (secuencia: massmlssaa watrasaaq asmvapftgl ksaasfpvtr kqnnlditsi asnggrvqca) fue amplificado a partir de pICH5300 con los cebadores *Spr3* (5' cgcacaatcc cactatcctt cg 3') y *Ctinte2* (5' cttaaacat agcgattga actcttctc c 3'). Un fragmento que contenía una fusión de señal de dirección a diana de cloroplasto - fragmento de inteína-C se obtuvo por amplificación a partir de ambos fragmentos con los cebadores *Spr3* y *IntC2*. Este fragmento fue clonado usando ClaI y NcoI dentro de pICH12600 (Fig. 16). El resultante plásmido pICH12650 contiene la fusión de señal de dirección a diana de cloroplasto artificial - inteína C de DnaE - fragmento C de AHAS bajo el control del promotor de actina1 de arroz, en un vector binario. Para ensayar la funcionalidad del gen de AHAS disociado, los pICH12610 y pICH12650 (Fig. 17) fueron bombardeados concomitantemente dentro de cultivos en suspensión de células de *Triticum monococcum* y las células fueron seleccionadas sobre unos medios que contenían sulfometurón metilo 0,5 a 3 microMolar.

EJEMPLO 5

Disociación del gen de BARNASA

El gen de barnasa fue disociado usando la inteína de DnaB PCC6803 de *Synechocystis sp.*. Unos fragmentos de ADN para las partes terminales de N y C de la Barnasa flanqueadas por apropiados sitios de restricción fueron sintetizados químicamente por una compañía dedicada a la síntesis comercial de ADN.

La secuencia del extremo terminal de N es:

**5' gcaatcgatg gcacaggita tcaacacgtt tgacggggtt gggattatc ttcagacata tcataagcta cctgataatt
acattacaaa atcagaagca caagccctcg gctgggacgt ccg 3'**

La secuencia del extremo terminal de C es:

**5' cgccatgggg tggcatcaaa agggaacctt gcagacgtcg ctccggggaa aagcatcggc ggagacatct
tctcaaacag ggaaggcaaa ctccggggca aaagcggacg aacatggcgt gaagcggata ttaactatac atcaggcttc
agaaattcag accggattct t tactcaagc gactggctga ttacaaaac aacggacct ttcagacct ttacaaaaat
cagataagga tccg 3'.**

5 El extremo terminal de N de Barnasa fue fusionado con la parte N de la inteína de DnaB. El fragmento N de la inteína de DnaB fue amplificado a partir de ADN de *Synechocystis* usando los cebadores *DnaBintNpr1* (5' gtAAGCTTGA CGTcagagag agtggatgca tcaatggaga tag 3') y *DnaBintNpr2* (5' caCTGCAGct ataattgtaa agaggagctt tctag 3'). El fragmento de Barnasa (un fragmento de ClaI AatII) y el fragmento de inteína (un fragmento de AatII PstI) fueron clonados en un vector binario de Icon Genetics dando como resultado el clon pICH12790.

10 El extremo terminal de C de Barnasa fue fusionado con la parte C de la inteína de DnaB. El fragmento C de la inteína de DnaB fue amplificado a partir de ADN de *Synechocystis* usando los cebadores *dnaBintCpr1* (gt CTG CAG ATC GAT TCA TGA gcc cag aaa tag aaa agt tgt tct) y *dnaBintCpr2* (tc AAG CTT CCA TGG tct tgc tct tea ctg tta tgg aca atg atg tca t). El fragmento de inteína (un fragmento de SacI NcoI) y el fragmento de Barnasa (un fragmento de NcoI BamHI) fueron clonados dentro de un vector binario de Icon Genetics dando como resultado el clon pICH12820.

15 La funcionalidad de los clones de fusión de Barnasa e inteínas terminales de N y C fue ensayada por agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*. Como se esperaba, el sector infiltrado se volvió necrótico.

Para reducir la actividad de Barnasa, se introdujo un desplazamiento de marco en la parte de N del gen de Barnasa. Se realizó una PCR en pICH12790 con los cebadores *Bampr4* (5' gcaatcgatg gcacaggita tcaacacgt ttgac 3') que contiene el desplazamiento de marco y *Bampr5* (5' gcggacgtcc cagccgaggg cttgtgc 3') y se subclonó en pICH12790 dando como resultado el plásmido pICH12800. El promotor específico para tapetum (Genbank Número D21160; Tsuchia y colaboradores, 1994, Plant Mol Biol., 26, 1737-1746) fue amplificado a partir de ADN genómico de arroz usando los cebadores *Tappr1* (5' cggaattcgg cgcccttttt ttacacagtt caaagtgaat ttgg 3') y *Tappr2* (5' cgcatcgatg ctaaattagc ttggtaaat tggag 3') y subclonado en pICH12800 como un fragmento de EcoRI-ClaI, dando como resultado el plásmido pitch12830 (Fig. 18). El promotor específico para tapetum de arroz fue subclonado a partir de pICH12830 (Fig. 18) dentro de pICH12820 como un fragmento de EcoRI-ClaI. La resultante construcción artificial pICH12840 (Fig. 18) contiene la fusión de inteína-C y Barnasa-C bajo el control del promotor específico para tapetum de arroz.

EJEMPLO 6

30 Generación de construcciones artificiales del locus gro

El ensamble de todos los componentes requeridos en la construcción artificial final se realizó de una manera escalonada. Primeramente, una secuencia que contenía un sitio AttP y un sitio AttB flanqueados por apropiados sitios de restricción se produjo a partir de oligonucleótidos solapados y se clonó en el vector binario de Icon Genetics pICBV26 (que solamente contiene sitios de XhoI-ClaI-XbaI entre bordes de ADN T, selección por Kan^R en *E.coli* y *Agrobacterium*). La resultante secuencia (agatctgtgc cccaactggg gtaaccttgg agttctctc agttgggggc gtagggaatt ctgtctgcag tctagattta tgcattggcg gcctatctcg agctcgaagc cgcggtgcgg gtgccagggc gtcacctgg gctccccggg cgcgtactcc acctaccaca tcaactagtg tggaccatc gcaggccc) está presente en la construcción artificial pICH12920. El fragmento de Barnasa e inteína terminal de N (fragmento de EcoRI-Pst1 procedente de pICH12830, Fig. 18), el fragmento de Ahas e inteína (fragmento de AscI XhoI procedente de pICH12610, Fig. 17), y el terminador Ocs (un fragmento de XbaI Pst1 procedente de pICH12900) fueron subclonados en pICH12920. El resultante clon pICH12950 (Fig. 19) contiene a la vez fragmentos de Barnasa y Ahas terminales de N flanqueados por sitios AttP y AttB en un vector binario.

Seguidamente, una secuencia que contiene un sitio AttP flanqueado por apropiados sitios de restricción se produjo a partir de oligonucleótidos solapados y se clonó en pICBV26. La resultante construcción artificial pICBV12850 contiene la secuencia (ggtagctgca gtattctaga ttcgaattct cgagtgtggc ggcctgtgcc ccaactgggg taaccttga gttctctcag ttggggcgt agggccct) en el ADN T. El fragmento de inteína y Barnasa terminal (un fragmento de EcoRI-BamHI procedente de pICH12840, Fig. 18), the terminador Ocs (un fragmento de BamHI-Pst1 procedente de pICH12900) y el fragmento de inteína y Ahas terminal (un fragmento de AscI XhoI procedente de pICH12650) fueron subclonados en pICH12850. El resultante clon pICH12910 (Fig. 19) contiene a la vez fragmentos de Barnasa y Ahas terminales de C y un sitio AttP en un vector binario.

Los fragmentos terminales de C y terminales de N fueron combinados en un vector binario por subclonación de un fragmento KpnI Apal procedente de pICH12910 dentro de pICH12950 (Fig. 19), dando como resultado el pinch 12960 (Fig. 21).

Marcador seleccionable para transformación:

5 Un gen *HPT* bajo el control del promotor de ubiquitina de maíz se usó para la transformación de plantas. Para facilitar la selección, un intrón fue insertado dentro de la secuencia de codificación de *HPT*. Primeramente, un sitio diana para clonación fue insertado dentro de la secuencia de codificación de *HPT* para amplificar un fragmento de PCR procedente de pC052 (secuencia de codificación de *HPT* - terminador Nos en pUC19) con los cebadores solapados *Bamhpt* (5' cgggatccaa tcagatatga aaaagcctga ac 3'), *Hptint1* (5' ccacaactgt ggtctcaagg tgcttgacat

10 tggggagttc ag 3'), *Hptint2* (5' ggatctcggc ctcgtacctc cggatcggg agcgcg 3'), *Sgfhpt* (5' cgcagcgcgc gcatccattg cctccgcgac cggctggaga acagcg 3') y *Inttarg* (5' aggtacgaga cccgatccca caactgtggt ctcaagg 3'), y subclonar el fragmento amplificado como un fragmento de BamHI SgfI dentro de pC052. Un intrón fue amplificado a partir de ADN genómico de petunia con los cebadores *Intpet3* (5' gtctgtctc agtaagttc tgcatttggc tatgctcctt gcattt 3') y *Intpet4* (5' gtctgtctc tacctgtagc aataataaa acaaaaata 3') y fue clonado como un fragmento de BsaI en el plásmido descrito anteriormente, dando como resultado el plásmido pitch12710. El promotor de ubiquitina de maíz fue amplificado por una PCR a partir de un ADN genómico usando los cebadores *Ubi1* (5' ttgcatgcct gcagt gcagc gtgaccggc c 3') y *Ubi2* (5' gggatcctct agagtcgacc tgcagaagta acaccaaca acagggtg 3') y clonado como un fragmento de SphI-BamHI conjuntamente con *HPT* (un fragmento de BamHI XbaI procedente de pICH12710) en pICH12720 (una construcción artificial intermedia que contenía sitios de restricción y un sitio AttB; secuencia 5' tctaagctac tcgagactag tgcagctgt

15 tctagactcg aagccggcgt gcgggtgcca gggcgtgcc tgggctccc cgggcgcgta ctccacctca cccatcggtta ccg 3'). La resultante construcción artificial pICH12870 (Fig. 20) contiene el gen de higromicina con un intrón fusionado con el promotor de ubiquitina de maíz, seguido por un sitio AttB.

Finalmente, el gen *HPT* fue subclonado como un fragmento KpnI-SpeI dentro de pICH12960 (Fig. 21). La resultante construcción artificial pICH 12970 (Fig. 21) contiene los extremos terminales de N y C de Ahas y Barnasa fusionados con fragmentos de inteínas así como el marcador de selección de *HPT*, dos sitios AttP y dos sitios AttB.

25

EJEMPLO 7

Construcción de clones de integrasa

El pICH13160 (Fig. 20) se produjo por clonación de la integrasa del Fago C31 de *Streptomyces* (obtenida de David Ow, Plant Gen Expresión Center, US Department of Agriculture-Agricultural Research Service, Albany, CA 94710, USA) y del promotor de Spm (amplificado por una PCR a partir de pC028 con los cebadores *Spmprfwd* (5' cgtctagagt caaaggagtg tcagtaatt a 3') y *Spmprrev* (5' cgctgcagtg cttggcgagg ccgcc 3') en un vector binario de Icon Genetics (selección en *Agrobacterium* y *E.coli*: Kan^R).

30

El promotor de ubiquitina de maíz fue subclonado a partir de pitch12720 como un fragmento BspD1-romo PstI dentro de pICH13160 (Fig. 20) digerido con AscI-romo y PstI. El resultante plásmido, pICH13130 (Fig. 9), contiene la integrasa bajo el control del promotor de ubiquitina de maíz.

35

EJEMPLO 8

Generación de plantas transgénicas con un locus pro

Las construcciones artificiales pICH12970 (Fig.21), pitch13130 (Fig. 20) y pICH13160 (Fig. 20) fueron transformadas dentro de maíz, arroz y tabaco usando una selección con higromicina.

40 Unas transformantes de pICH12970 fueron rociadas con clorosulfurón (de Glean, Dupont) para seleccionar plantas que expresaban el gen de AHAS mutante disociado a un nivel suficiente para una resistencia a herbicidas (alternativamente, la construcción artificial pICH12960 (Fig. 21) puede ser transformada en el seno de plantas usando una selección con clorosulfurón o sulfometurón metilo, con la ventaja de seleccionar directamente unas transformantes que expresan AHAS en un nivel suficiente). Unas plantas que se veían sanas a pesar de la presencia del gen de Barnasa disociado, pero que eran estériles masculinas, fueron analizadas por transferencia de borrón Southern para identificar a individuos que contenían un único transgén. Dichas transformantes fueron polinizadas por transformantes de pICH13130 (Fig. 20) o pICH13160 (Fig. 20). Las mismas transformantes fueron también polinizadas con plantas de tipo silvestre para rescatar plantas con un locus de transgén intacto non-recombinado. Las plantas F1 (transformantes de pICH12970 x integrasa) fueron comprobadas por una PCR en cuanto a la presencia de ambos transgenes (transgén de pICH12970, véase la Fig. 21, y la integrasa, véase la Fig. 20), y se recogieron semillas. Las plántulas F2 se hicieron crecer y se escrutaron por una PCR para detectar recombinantes que carecía o bien de las partes terminales de N o de las partes terminales de C de los genes de Barnasa y de Ahas disociados. Dichas plantas eran completamente fértiles. Se cruzaron pares de plantas que contenían partes complementarias de la construcción artificial (como un resultado de una recombinación mediada por una integrasa). Las plántulas obtenidas a partir de estos cruces fueron rociadas con clorosulfurón para eliminar las plantas que no contenían ambas partes de la construcción artificial. Todas las plantas que eran resistentes al clorosulfurón eran también estériles masculinas.

45

50

55

Los siguientes métodos se usaron para generar plantas transgénicas:

Transformación de tabaco

5 Las construcciones artificiales se usaron para una transformación de discos de hojas de plantas de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium* (Horsh y colaboradores, 1985, Science, 227, 1229-1231) usando una selección sobre higromicina (25-100 mg/l) o sulfometurón metilo (0,5-3,0 microM) o clorosulfurón (0,2-5,0 microM).

Transformación de arroz

Unos cultivos de callos fueron inducidos a partir de embriones maduros e inmaduros de los cultivares de arroz Pusa Basmati 1, Koshihikari, etc.

10 Los medios de cultivo se basaron en sales y vitaminas de Chu (N6) (Chu y colaboradores, Scientia Sinica, 18(5):659-68, 1975).

La inducción de callos y el medio de propagación se suplementaron con 30 g/l de sacarosa, 600 mg/l de L-prolina, 2,0 mg/l de 2,4-D y 0,3 % de gelrite.

El medio de regeneración previa contenía sales y vitaminas N6 con 30 g/l de sacarosa, 1 mg/l de NAA, 2 mg/l de BA, 2 mg/l de ABA y 0,6 % de gelrite.

15 El medio de regeneración contenía sales y vitaminas N6 con 30 g/l de sacarosa, 0,2 mg/l de NAA, 2 mg/l de BA, y 0,6 % de gelrite,

El medio de infección (IM) contenía sales y vitaminas N6 con 2 mg/l de 2,4-D, 10 g/l de glucosa, 60 g/l de maltosa, 50 mg/l de ácido ascórbico, 1 g/l de MES (ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico) y 40 mg/l de acetosiringona (AS). El pH del medio fue ajustado a 5,2 mediante KOH 1 N.

20 El medio de cultivación concomitante (CM) era el mismo que el IM (excluyendo al ácido ascórbico) y fue solidificado añadiendo 0,6 % de gelrite,

El medio de infección fue esterilizado en filtro, mientras que todos los otros medios fueron autoclavados. Se añadió AS, disuelta en DMSO (400 mg/ml), después de una esterilización.

25 Cultivos de *Agrobacterias* (cepas AGL1, EHA105, LBA4404, etc.) con los apropiados plásmidos binarios se hicieron crecer durante 3 días a la temperatura ambiente sobre placas de LB2N (medio LB con 2 g/l de NaCl y 1,5 % de agar) suplementadas con los apropiados antibióticos. Las bacterias fueron separadas por rascado desde las placas y vueltas a suspender en el IM (10-20 ml) en tubos de Falcon con una capacidad de 50 ml. Los tubos fueron fijados horizontalmente a una plataforma sacudidora y sacudidos a baja velocidad durante 4 a 5 h a la temperatura ambiente. La densidad óptica (OD) de la suspensión de bacterias se midió y la OD600 se ajustó a 1,0-2,0.

30 Unos trozos de callos fueron incubados en la suspensión de *Agrobacterias* durante 20-180 min a la temperatura ambiente, transferidos en borrón sobre los discos de papel de filtro y transferidos al CM solidificado con gelrite con 60 g/l de maltosa. Después de una cultivación durante 3-6 días sobre el CM los callos fueron lavados cinco veces por agua estéril y transferidos al CM solidificado con gelrite con 60 g/l de sacarosa y un apropiado agente selectivo, y, si se necesitaban, 150 mg/l de timentina.

35 Unos callos resistentes desarrollados bajo selección fueron sembrados en placas en el medio de regeneración previa con un apropiado agente selectivo. Dos semanas más tarde, los cultivos fueron transferidos al medio de regeneración con un apropiado agente selectivo. Las plántulas regeneradas se hicieron crecer en un medio N6 de concentración mitad sin hormonas durante un mes antes de trasplantarla dentro del suelo.

40 Se usó higromicina B, para una selección basada en el gen hpt (de higromicina fosfotransferasa) en unas concentraciones de 25-100 mg/l. Una selección basada en las formas resistentes a herbicidas de la AHAS (acetohidroxi ácido sintasa) se realizó sobre sulfometurón metilo (0,5- 3,0 microM) o clorosulfurón (0,2-5,0 microM).

Transformación de maíz

5 Embriones inmaduros de maíz y cultivos de callos obtenidos a partir de los linajes A188, Hill, etc. fueron transformados esencialmente de la misma manera que los cultivos de arroz. La mayor parte de los medios y las etapas de transformación fueron iguales. El medio de regeneración previa no se usó. El medio de regeneración contenía sales y vitaminas N6, 30 g/l de sacarosa, 2 mg/l de zeatina y 0,05 mg/l de 2,4-D. Se incluyó tiosulfato de plata en el medio de regeneración en unas concentraciones de 0,01-0,06 mM.

Tabla 1. Análisis comparativos en el sistema de producción de semillas híbridas de ICON

Parámetros	ICON	Mecánico	Químico	Genético	Transgénico
Universalidad	SI	NO	NO	NO	SI
Producción de linaje hembra	SI	SI	SI	SI	SI/NO
No susceptible de fugas	SI	SI	NO	NO	NO
Restauración de plena fertilidad	SI	SI	SI	SI/NO	NO
Seguridad biológica	SI	SI	SI	SI	NO
Compatibilidad con otros sistemas	SI	NO	SI	NO	SI/NO
Solución integrada	SI	NO	NO	SI	NO

REIVINDICACIONES

1. Planta, semilla o célula de planta que expresa un rasgo de interés, comprendiendo dicha planta, dicha semilla o dicha célula de planta:

5 (i) en un primer locus de un cromosoma nuclear una primera secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés, y

(ii) en un segundo locus de un cromosoma nuclear homólogo con dicho cromosoma nuclear (i) una segunda secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende un segundo fragmento de la secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés;

10 exhibiendo dicha planta, dicha semilla o dichas células de planta dicho rasgo funcional de interés debido a un trans-empalme mediado por inteínas entre una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga y una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga.

2. Planta, semilla o célula de planta de acuerdo con la reivindicación 1, exhibiendo dicha planta, dicha semilla o dicha célula de planta dos rasgos de interés, un rasgo (1) y un rasgo (2) que comprende:

15 (i) en un primer locus de un cromosoma nuclear una primera secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende:

un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (1) y un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (2), y

20 (ii) en un segundo locus de un cromosoma nuclear homólogo con dicho cromosoma nuclear de (i), una segunda secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende:

un segundo fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (1), un segundo fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (2);

25 exhibiendo dicha planta, semilla o célula dicho rasgo (1) debido a un trans-empalme mediado por inteínas entre una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga y una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga; y

exhibiendo dicho rasgo (2) debido a un trans-empalme mediado por inteínas entre una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga y una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga;

siendo dicho rasgo (1) una resistencia a herbicidas y siendo dicho rasgo (2) una esterilidad masculina.

30 3. Semillas obtenibles por cruce de un organismo de planta multicelular transgénica con otra planta, expresando dicha planta multicelular transgénica dos rasgos de interés, un rasgo (1) y un rasgo (2) y comprendiendo:

(i) en un primer locus de un cromosoma nuclear, una primera secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende:

35 un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (1) y un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (2); y

(ii) en un segundo locus de un cromosoma nuclear homólogo con dicho cromosoma nuclear de (i), una segunda secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende:

un segundo fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (1) y un segundo fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (2);

40 exhibiendo dicha planta multicelular transgénica dicho rasgo funcional (1) debido a un trans-empalme mediado por inteínas entre una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga y una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga; y

45 exhibiendo ellas dicho rasgo funcional (2) debido a un trans-empalme mediado por inteínas entre una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga y una proteína o un polipéptido que se ha codificado por dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga.

4. Las semillas de acuerdo con la reivindicación 3, en las que el rasgo (1) es una resistencia a herbicidas y el rasgo (2) es una esterilidad masculina.

5. Plantas que han crecido a partir de las semillas de la reivindicación 3, en las que la progenie de dichas plantas no es viable.
6. Las plantas de acuerdo con la reivindicación 5, en las que las semillas de progenie de dichas plantas no germinan.
- 5 7. Las plantas de la reivindicación 5 ó 6, que contienen un gen inactivo de control de la germinación de semillas que puede ser activado por expresión de una proteína activadora.
8. Uso de las semillas o plantas de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 hasta 7, para expresar una proteína de interés, particularmente una proteína farmacéutica.
- 10 9. Planta o semilla o célula que comprende en un locus de un cromosoma nuclear una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende:
- un fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica un rasgo (1), y
- un fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica un rasgo (2);
- expresando dicha planta, semilla o célula:
- 15 una proteína de fusión que comprende un fragmento de una inteína y un polipéptido codificado por dicho fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica un rasgo (1), y
- una proteína de fusión que comprende un fragmento de una inteína y un polipéptido codificado por dicho fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica un rasgo (2).
10. Un procedimiento de producir
- 20 (i) una primera planta que tiene, en un primer locus de un cromosoma nuclear, una primera secuencia de nucleótido heteróloga que comprende un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica un rasgo de interés, y
- (ii) una segunda planta que tiene, en un segundo locus de un cromosoma nuclear homólogo con dicho cromosoma nuclear de la etapa (i), una segunda secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende un segundo fragmento de la secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés,
- 25 en el que las etapas (i) y (ii) se llevan a cabo por las etapas de
- (a) introducir una secuencia de nucleótidos heteróloga parental que comprende dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas dentro de un cromosoma nuclear de organismos parentales o células de los mismos por transformación,
- 30 (b) opcionalmente seleccionar organismos o células de los mismos que tienen dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental integrada en un deseado cromosoma o locus de cromosoma,
- (c) subsiguientemente disociar dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental de manera tal que dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas estén situadas en cromosomas homólogos en diferentes organismos de plantas o células, obteniendo de esta manera dicha primera o dicha segunda plantas.
- 35 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que una planta multicelular obtenible cruzando sexualmente dicha primera y dicha segunda plantas expresa dos rasgos de interés, un rasgo (1) y un rasgo (2), teniendo ambos rasgos una distribución controlada a una progenie, en que
- (i') dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga de la etapa (i) comprende
- un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (1) y
- 40 un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (2); y
- (ii') dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga de la etapa (ii) comprende:
- un segundo fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (1) y
- un segundo fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica el rasgo (2).
- 45 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el rasgo (1) es una resistencia a herbicidas y el rasgo (2) es una esterilidad masculina o femenina.

- 5 13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la etapa (c) comprende una escisión de dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga a partir de dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental, seguida opcionalmente por una reintegración de dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga escindida dentro de un locus de un cromosoma que es homólogo con respecto al cromosoma de dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental.
- 10 14. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la etapa (c) comprende una escisión de dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga a partir de dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental, seguida opcionalmente por una reintegración de dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga escindida dentro de un locus de un cromosoma que es homólogo con respecto al cromosoma de dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental.
15. El procedimiento de una de las reivindicaciones 13 o 14, en el que dicha primera y/o dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental está/n contenidas en un transposón no autónomo y dicha escisión comprende proporcionar una transposasa para dicho transposón.
- 15 16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que
- (A) dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental está contenida en un primer transposón no autónomo y dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga está contenida en un segundo transposón no autónomo, y
- 20 (B) dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga es escindida por provisión de una primera transposasa funcional con dicho primer transposón no autónomo y dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga es escindida por provisión de una segunda transposasa funcional con dicho segundo transposón no autónomo.
- 25 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que dicho primero y dicho segundo transposones en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental se solapan de manera tal que la escisión de dicha primera o dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga conduce a una rotura de dicho segundo o dicho primero transposón no autónomo.
- 30 18. El procedimiento de una de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental está flanqueada por sitios de recombinación de una primera recombinasa específica para un sitio y
- en el que dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental está flanqueada por sitios de recombinación de una segunda recombinasa específica para un sitio.
- 35 19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que un segmento 1 y un segmento 2 de dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental se solapan, en el que:
- el segmento 1 comprende dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga flanqueada por los sitios de recombinación funcionales con dicha primera recombinasa específica para un sitio y el segmento 2 comprende dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga flanqueada por los sitios de recombinación funcionales con dicha segunda recombinasa específica para un sitio.
- 40 20. El procedimiento de una de las reivindicaciones 10 hasta 14, en el que dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental está flanqueada por diferentes sitios de recombinación de una integrasa específica para un sitio y dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga en dicha secuencia de nucleótidos heteróloga parental está flanqueada por diferentes sitios de recombinación de la integrasa específica para un sitio, y se lleva a cabo la etapa (c)
- proporcionando dicha integrasa específica para un sitio a dicho organismo parental o a células del mismo,
 - seleccionando células de progenie de dicho organismo parental que contiene dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga pero no contiene dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga, y
 - 45 -seleccionando células de progenie de dicho organismo parental que contiene dicha segunda secuencia de nucleótidos heteróloga pero no contiene dicha primera secuencia de nucleótidos heteróloga.
- 50 21. El procedimiento de una de las reivindicaciones 15 hasta 20, en el que dicha transposasa, dicha recombinasa específica para un sitio, y dicha integrasa específica para un sitio son proporcionadas hibridando o cruzando con una planta o con células de la planta que contienen un gen que codifica dicha transposasa o dicha recombinasa o por transformación mediada por *Agrobacterium*, transfección vírica, bombardeo de partículas, electroporación o transformación mediada por PEG con un gen que codifica dicha transposasa o dicha recombinasa.
22. Procedimiento de una de las reivindicaciones 10 hasta 21, en el que dicho primero y dicho segundo loci son unos loci correspondientes en dichos cromosomas homólogos.

23. El procedimiento de una de las reivindicaciones 10 hasta 22, en el que dicha primera y dicha segunda plantas son hechas homocigóticas para dicha primera y dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas.
24. El procedimiento de una de las reivindicaciones 10 hasta 23, en el que dicha primera y/o dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas contiene(n) un intrón para el cis-empalme de ARN de un producto de transcripción de dicha primera o dicha segunda secuencias de nucleótidos heterólogas.
25. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho rasgo de interés está implicado en una esterilidad masculina o femenina.
26. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho rasgo se selecciona entre el siguiente grupo:
- una resistencia a herbicidas, una resistencia a insecticidas, un marcador seleccionable, un marcador contra-seleccionable, un factor de transcripción, enzimas modificadoras de ADN o ARN, la producción de una proteína de interés.

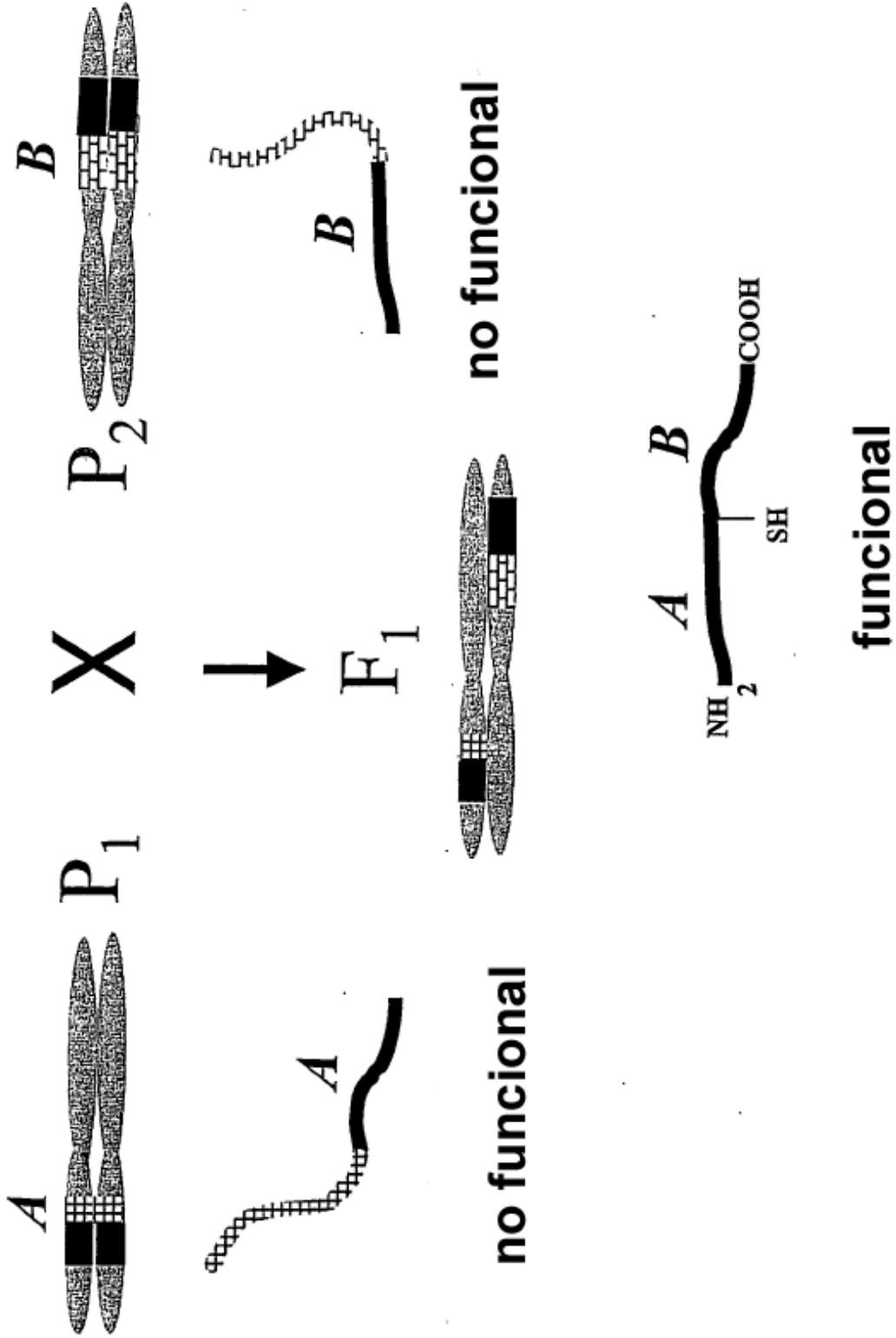


Figura 2A

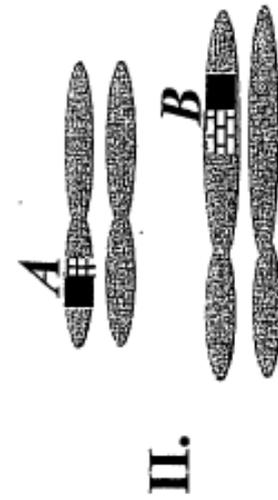
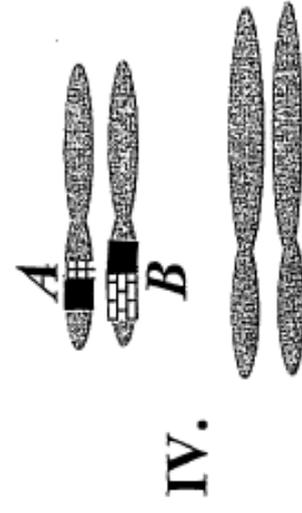
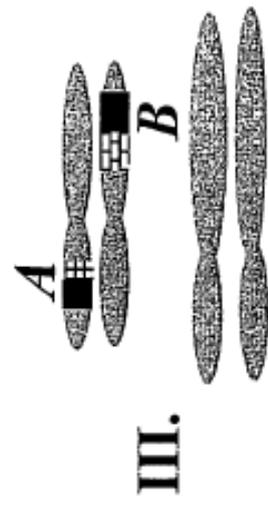


Figura 2B

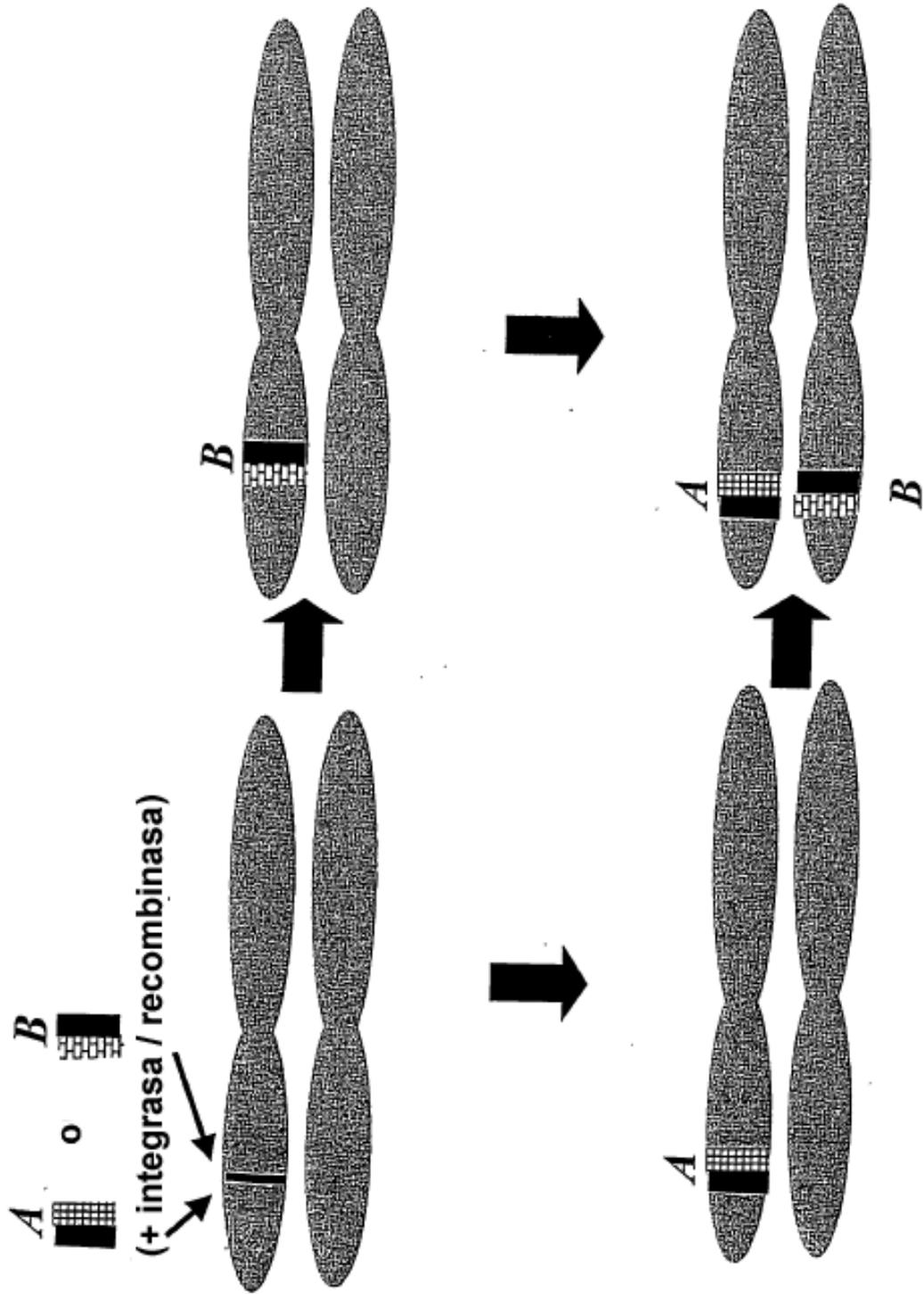


Figura 2C

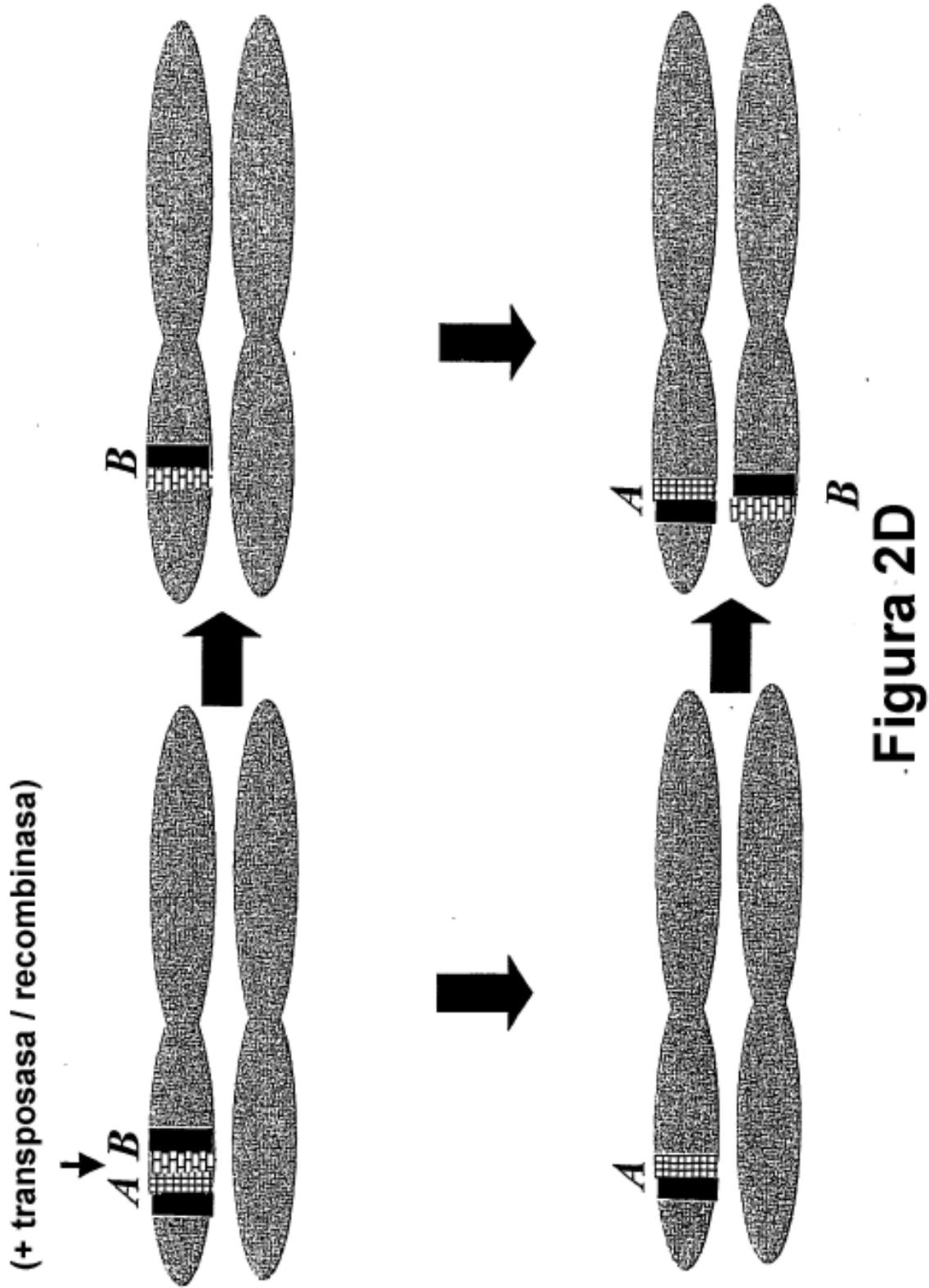


Figura 2D

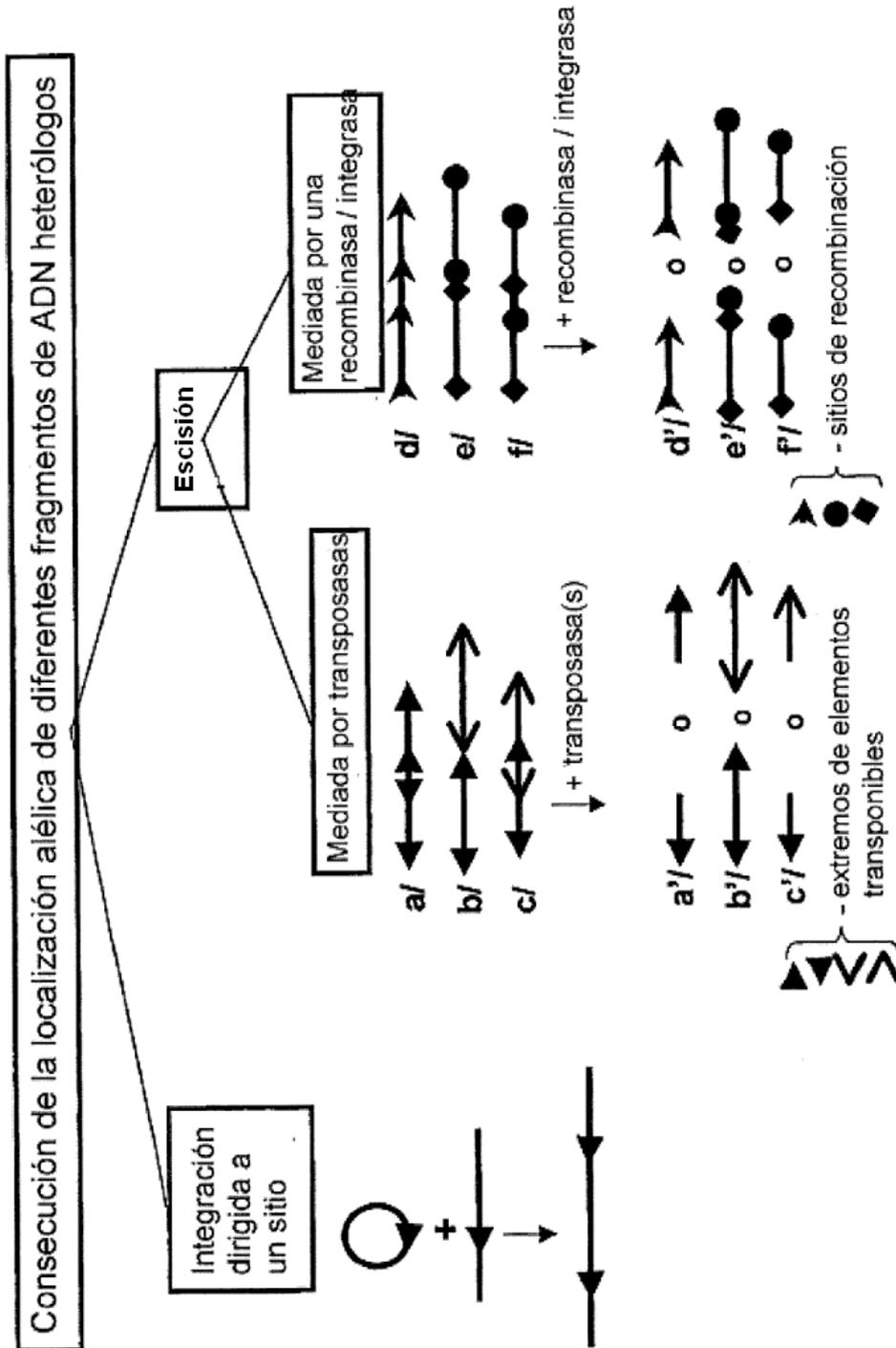


Fig. 2E

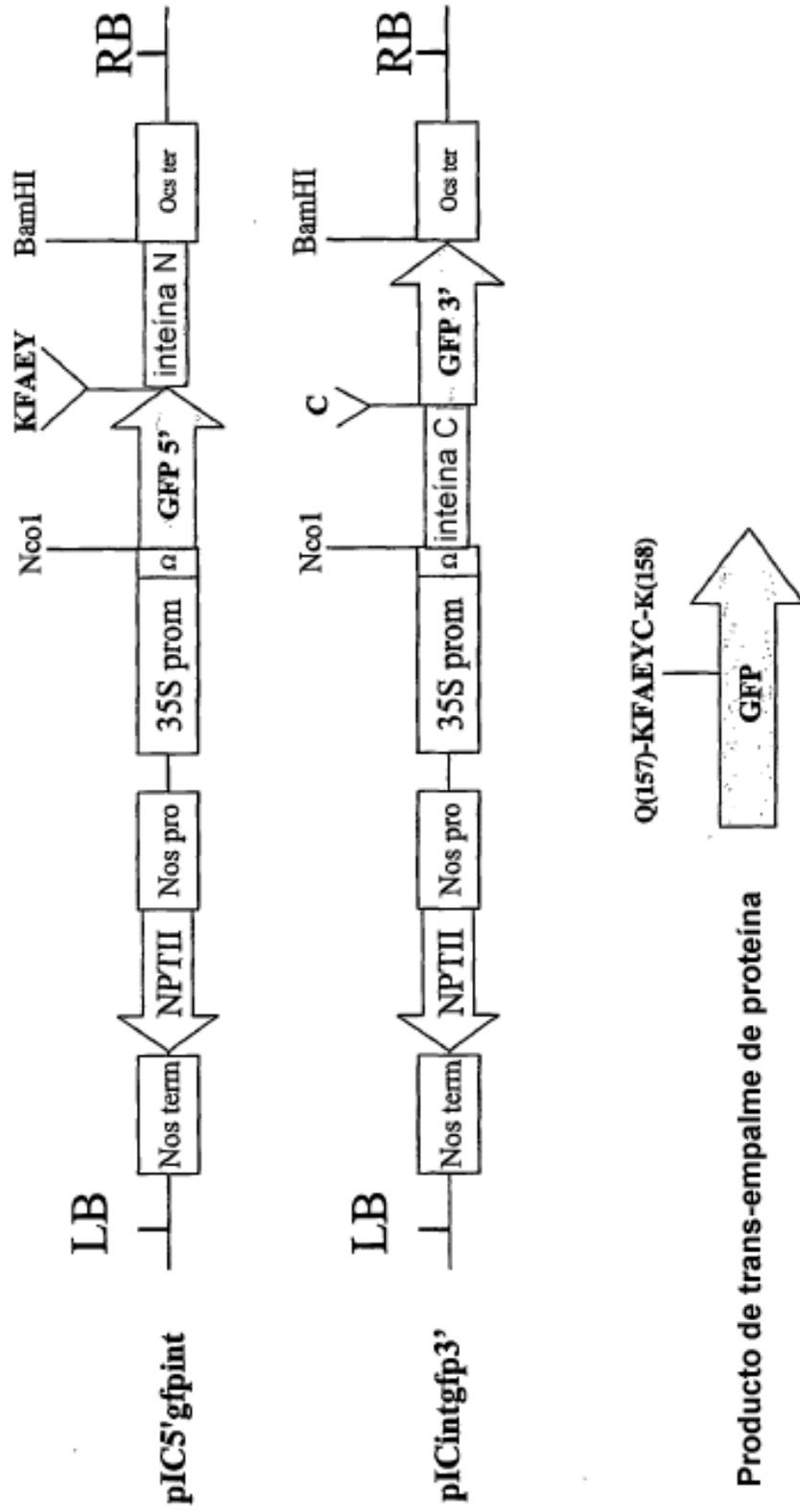


Fig. 3

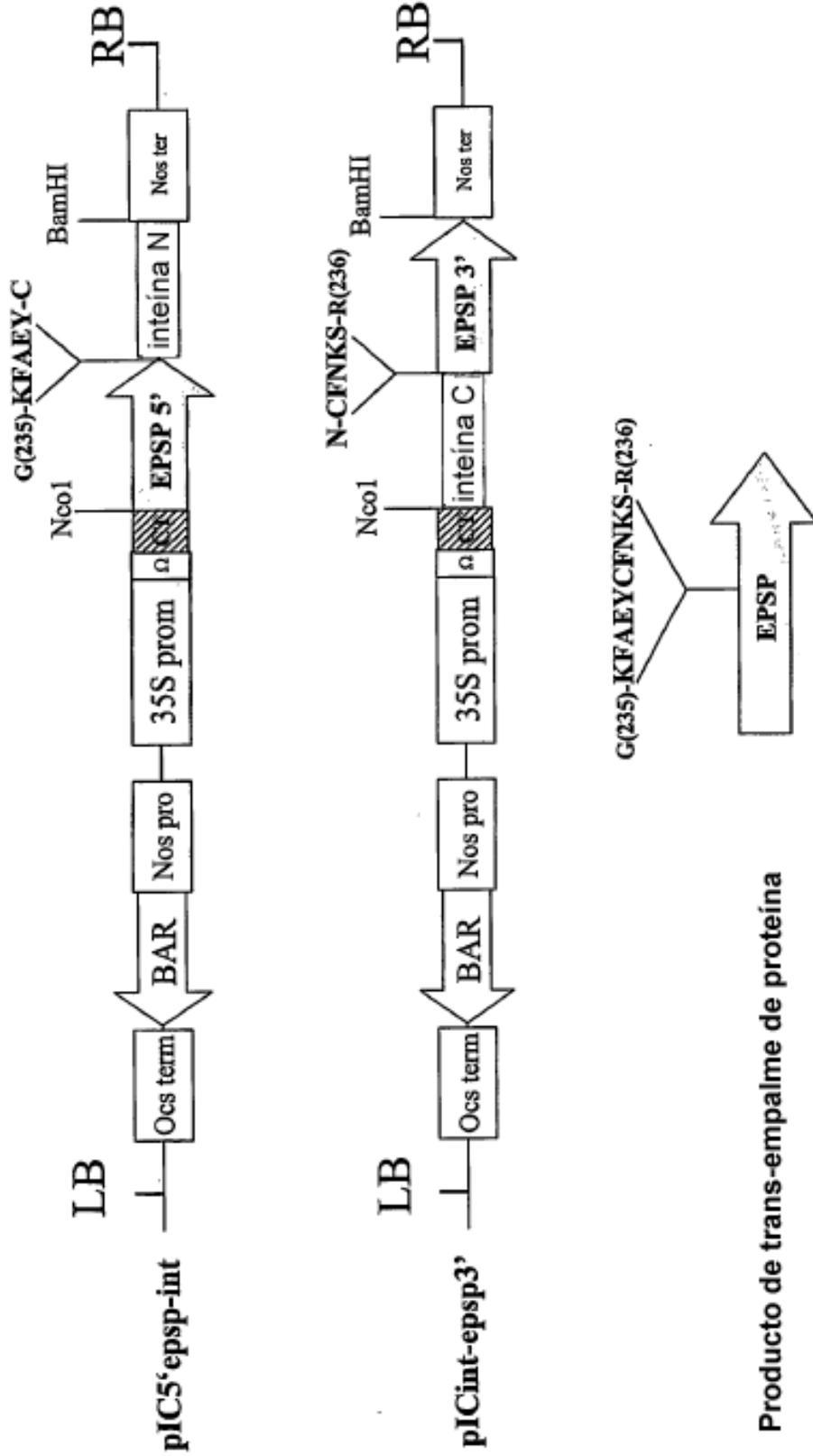
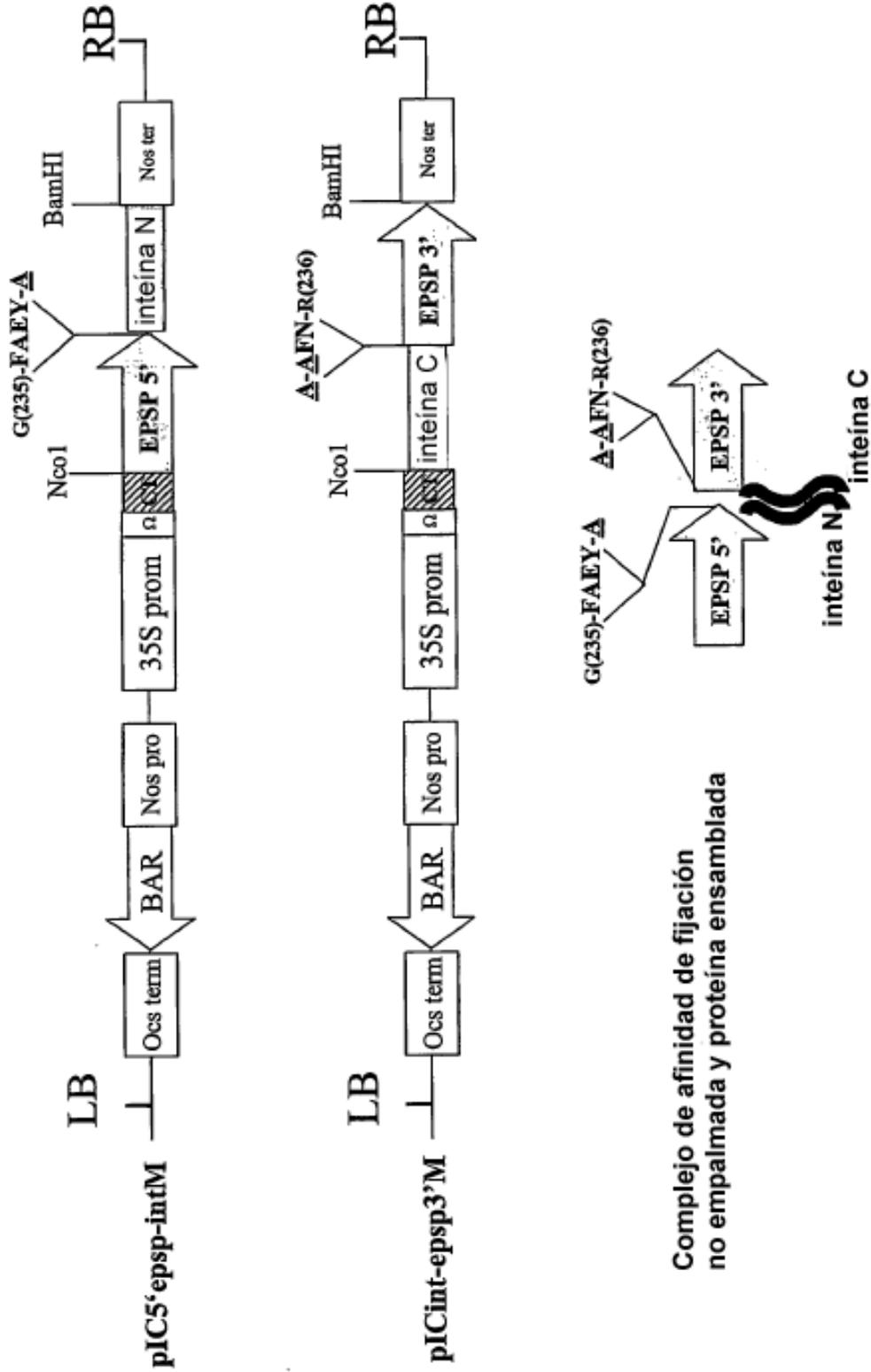


Fig. 4



Complejo de afinidad de fijación no empalmada y proteína ensamblada

Fig. 5

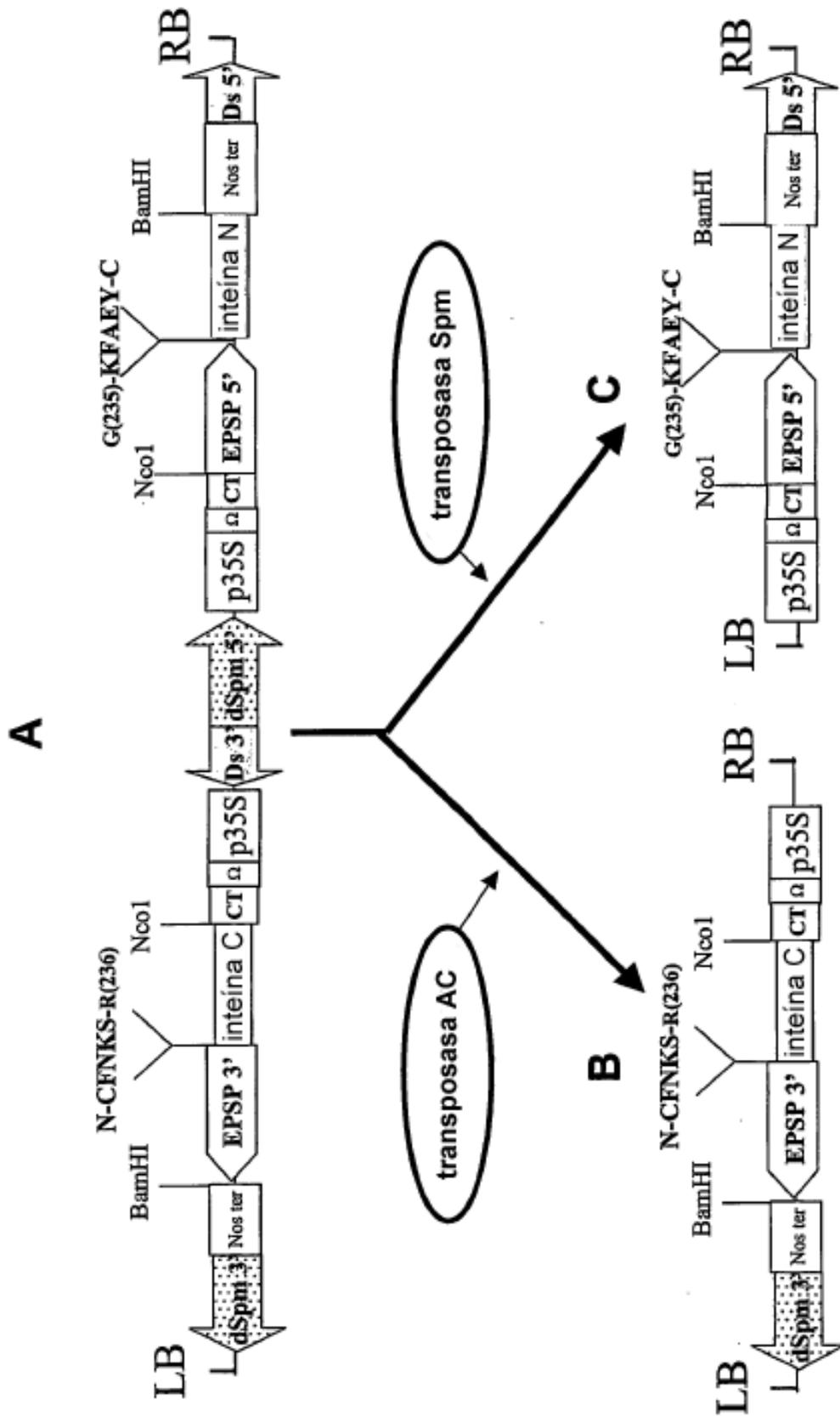


Fig. 6

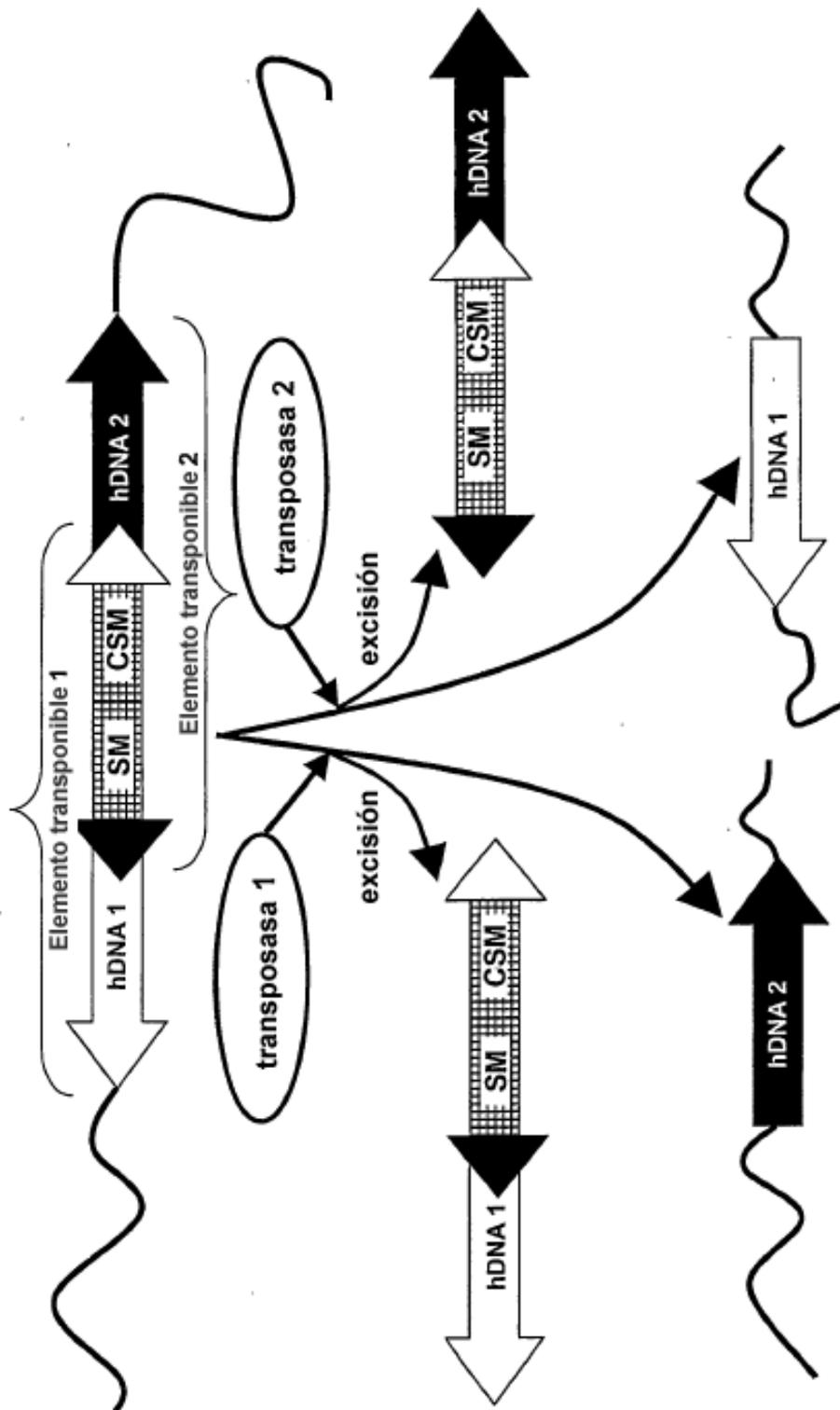


Figura 7

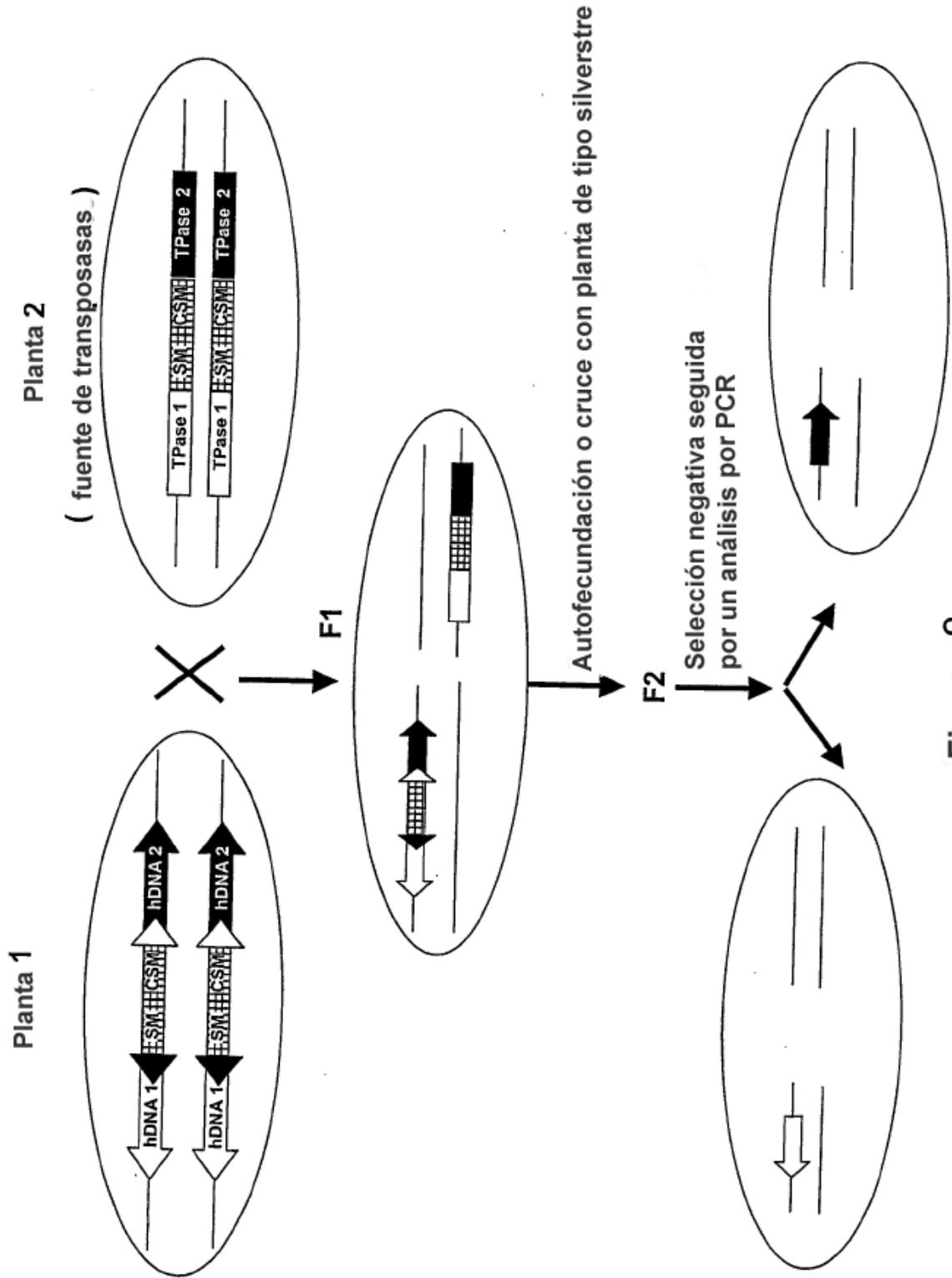


Figura 8

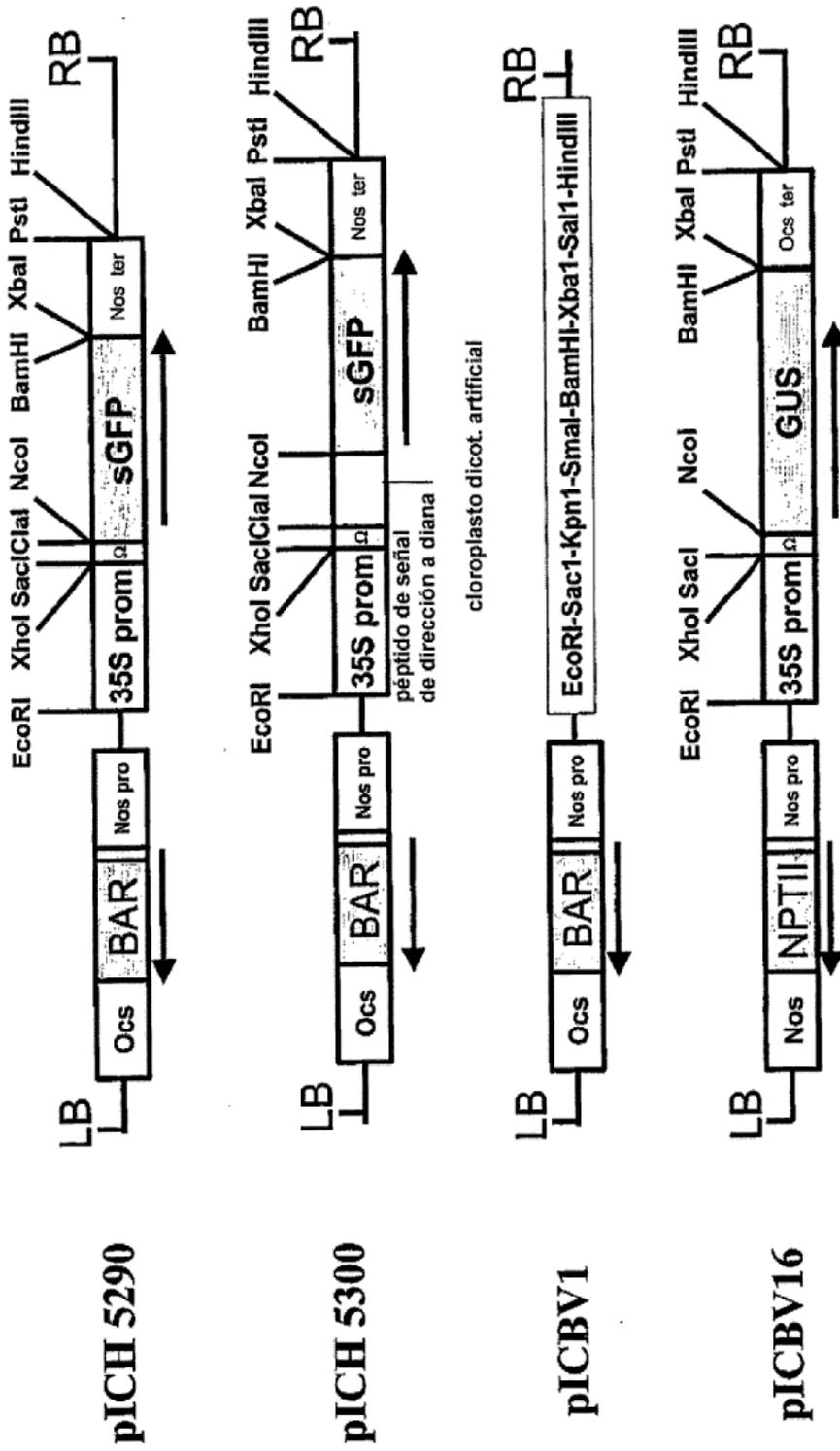


Fig. 9

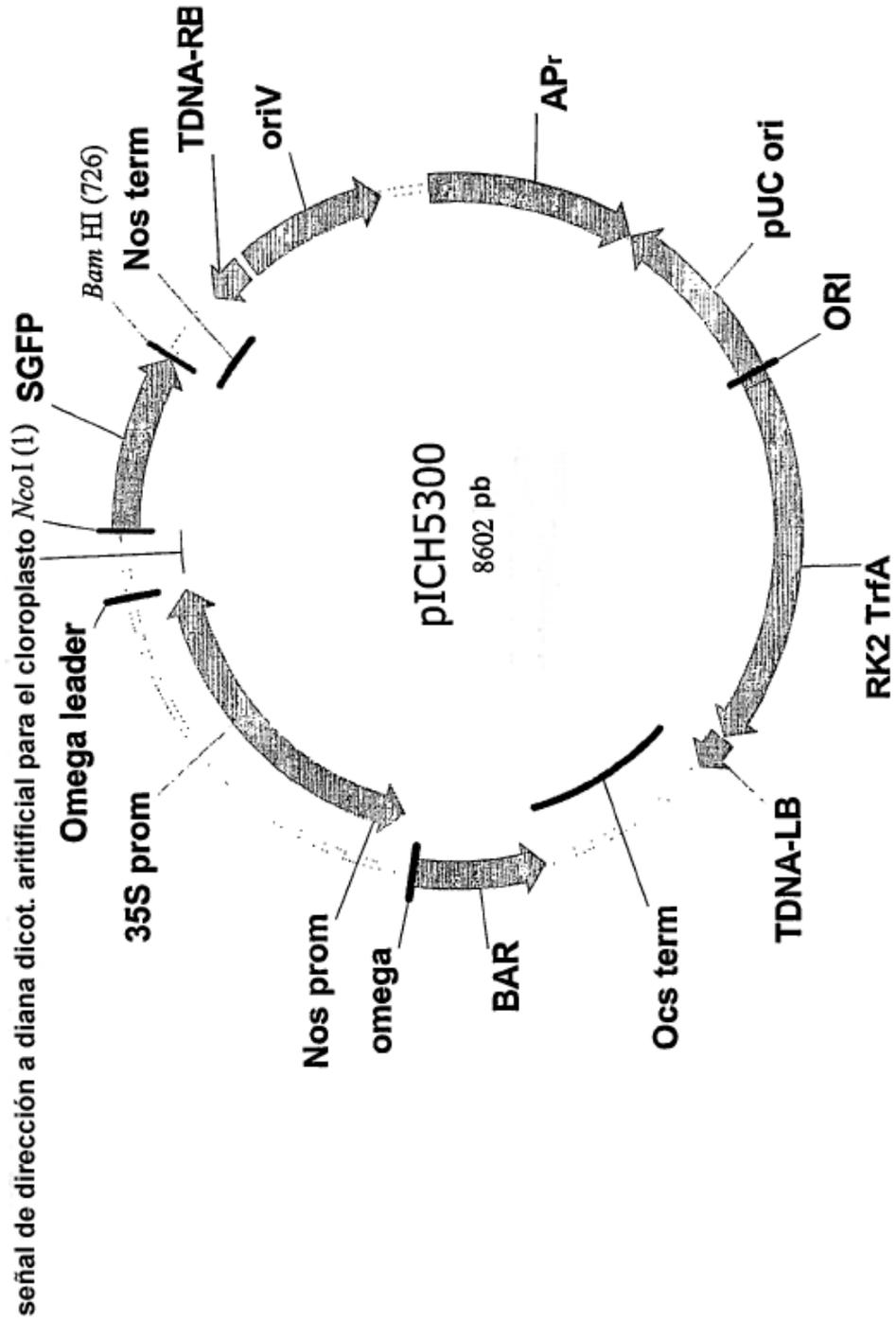


Fig. 10

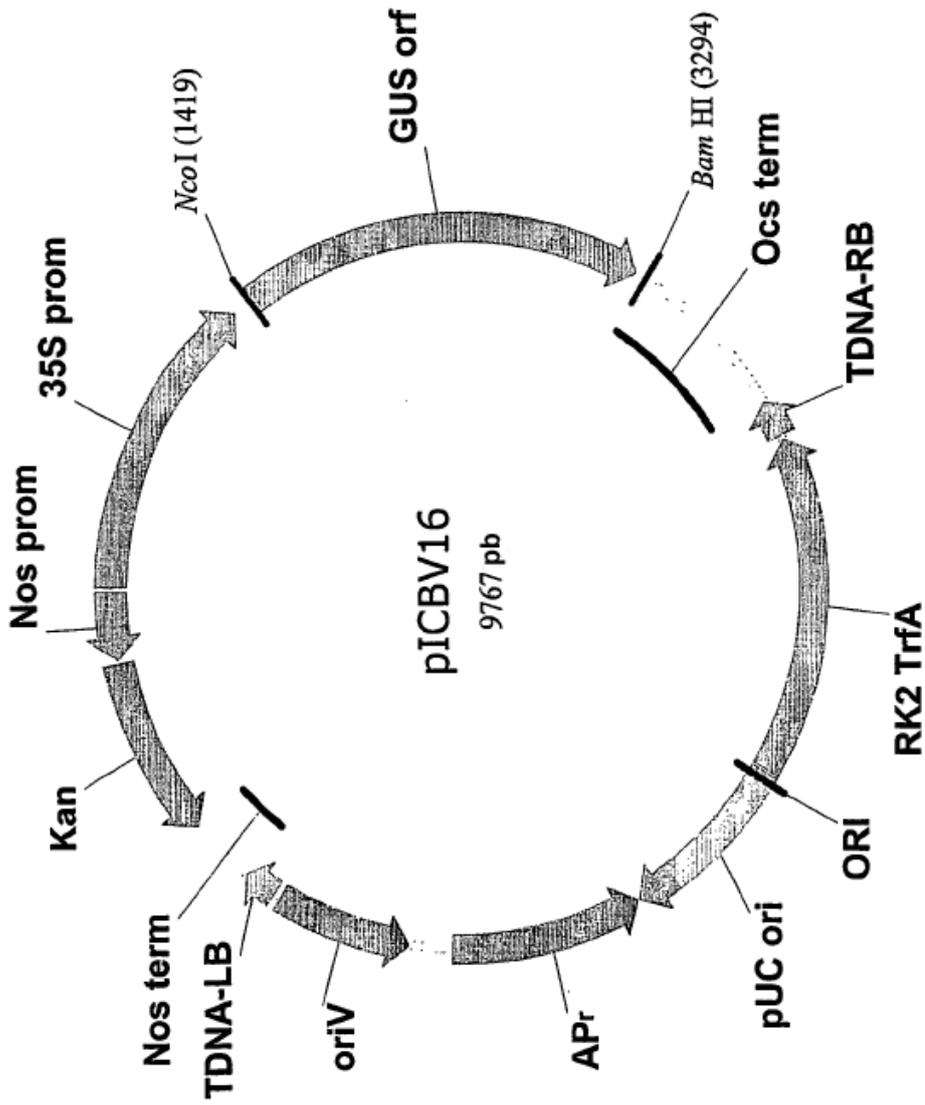


Fig. 11

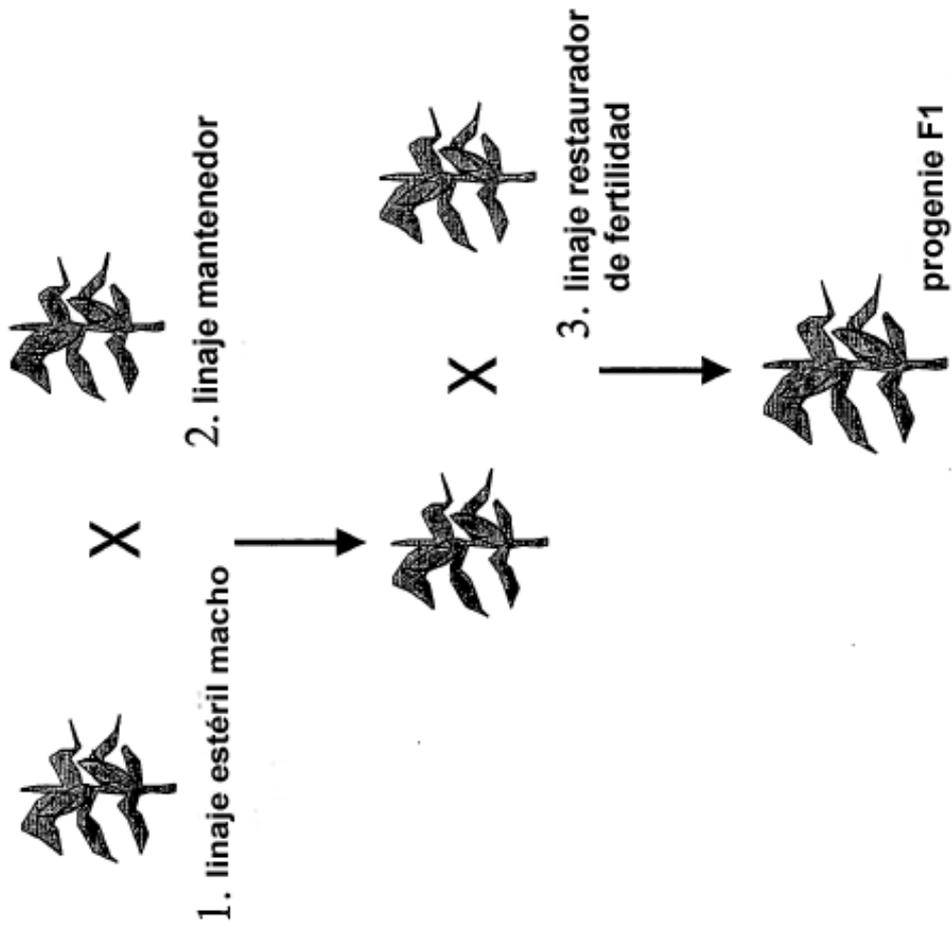


Fig. 12

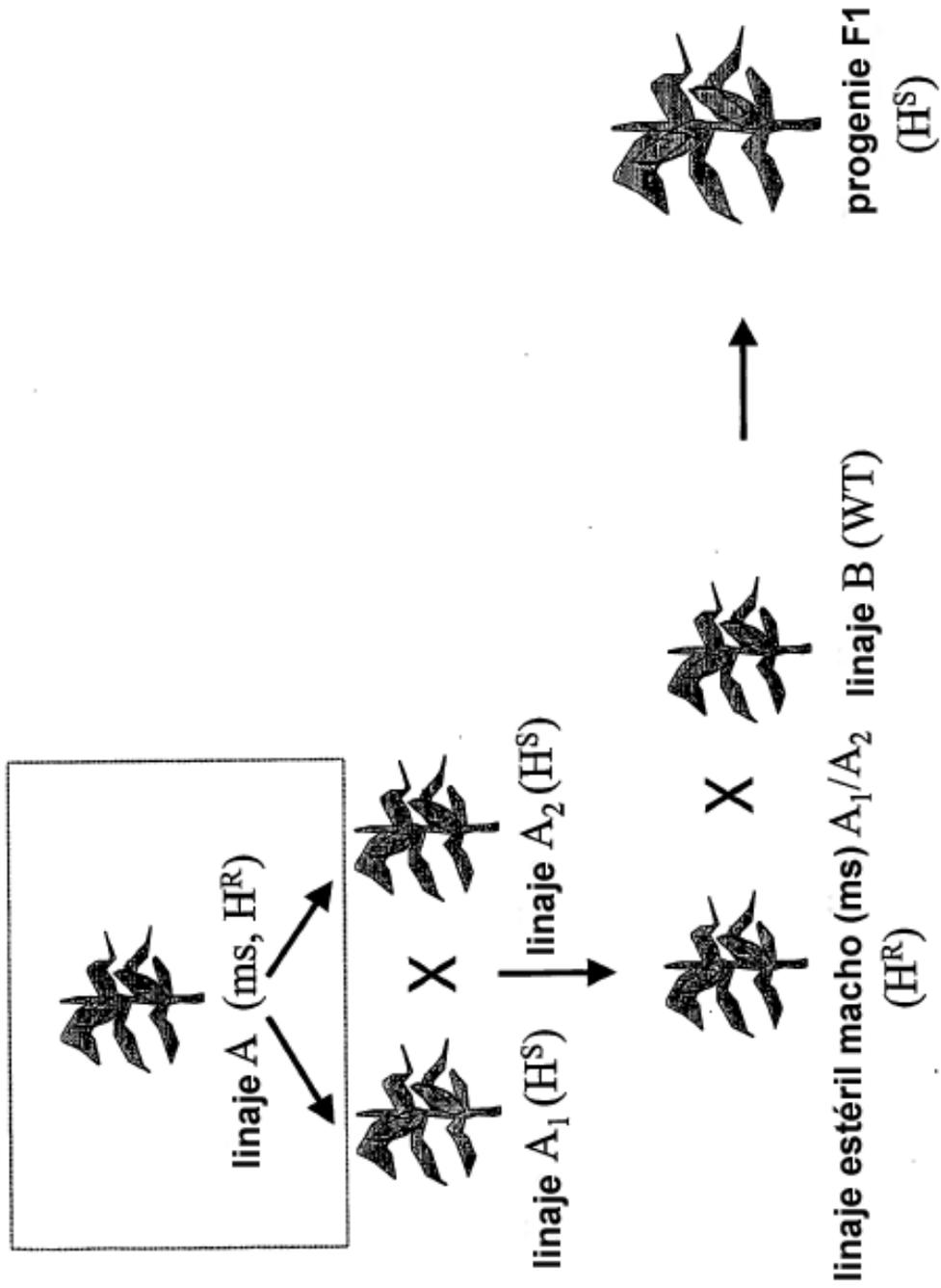


Fig. 13

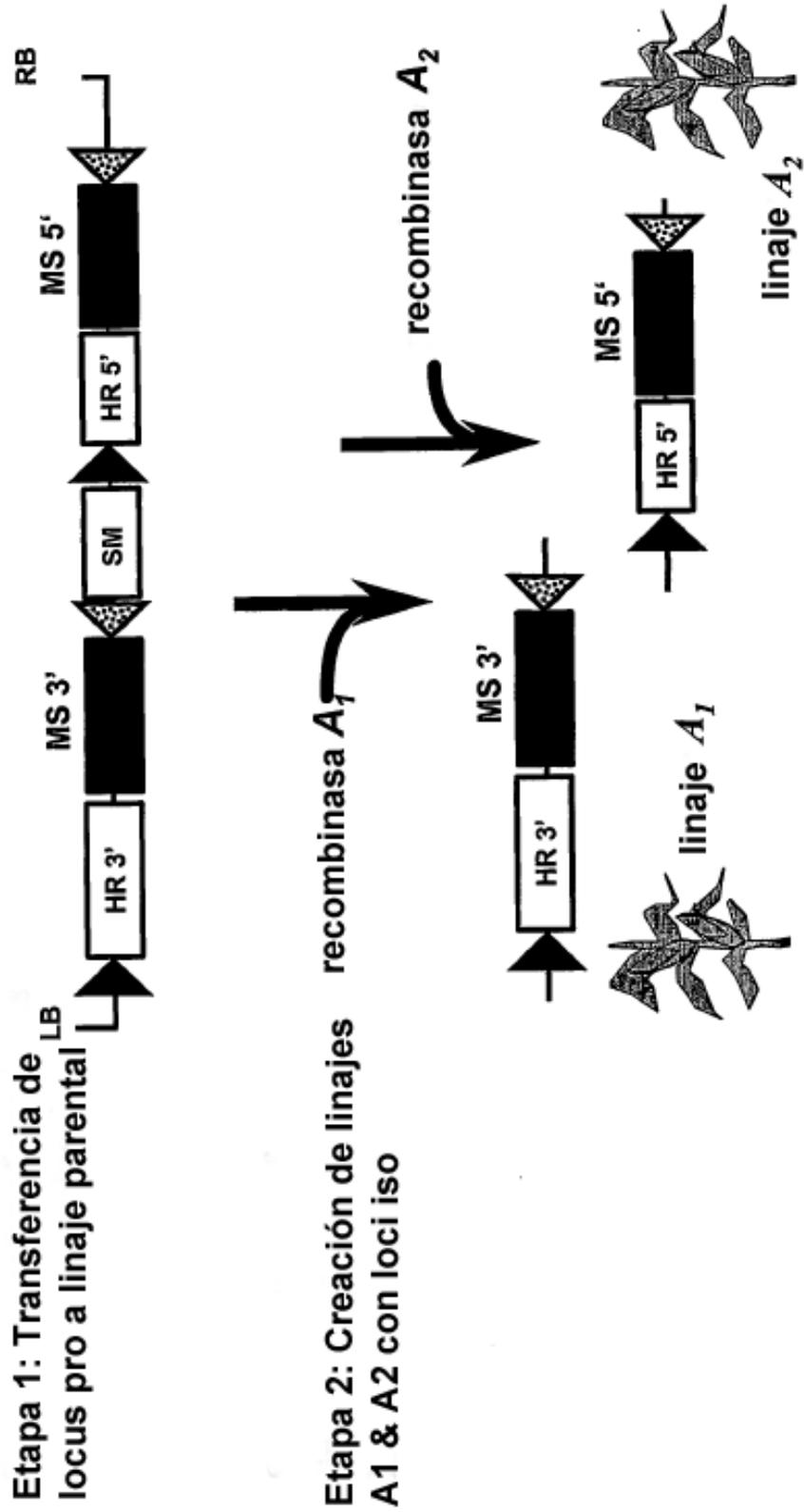


Fig. 14A

Etapa 3: Creación de parental estéril macho

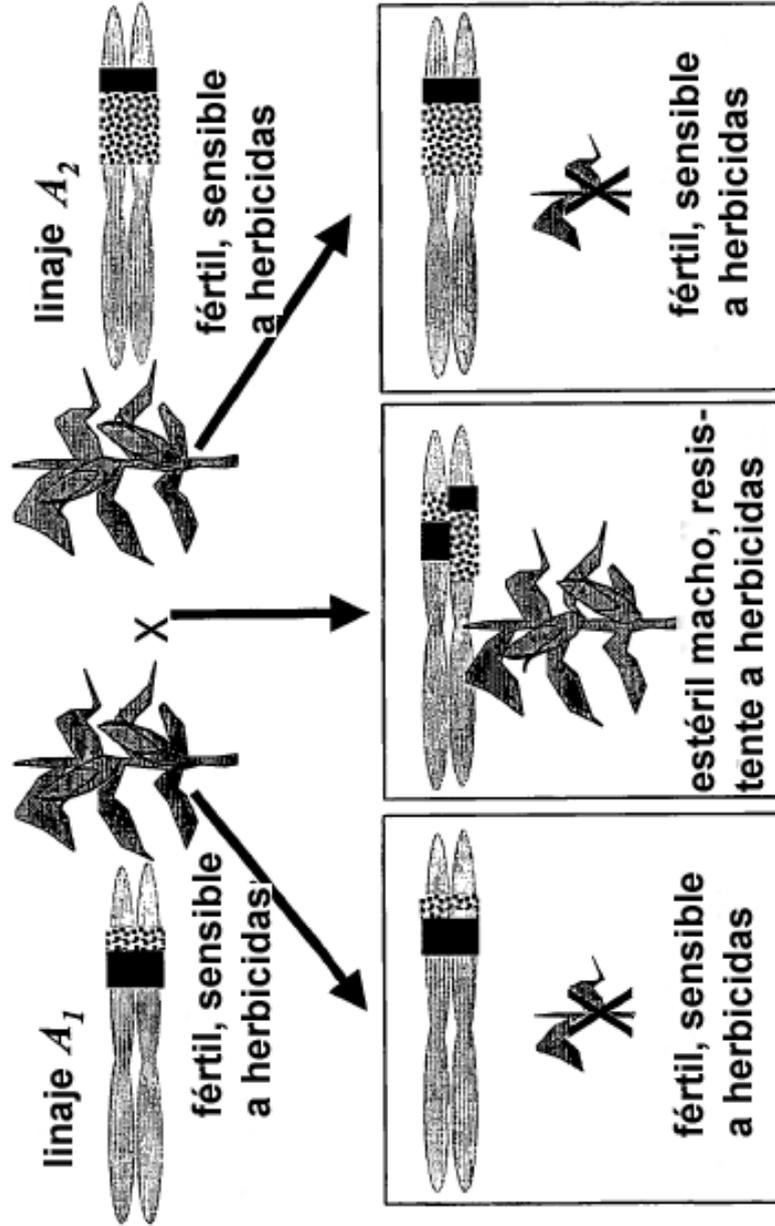


Fig. 14B

Etapa 4: Producción de una semilla híbrida

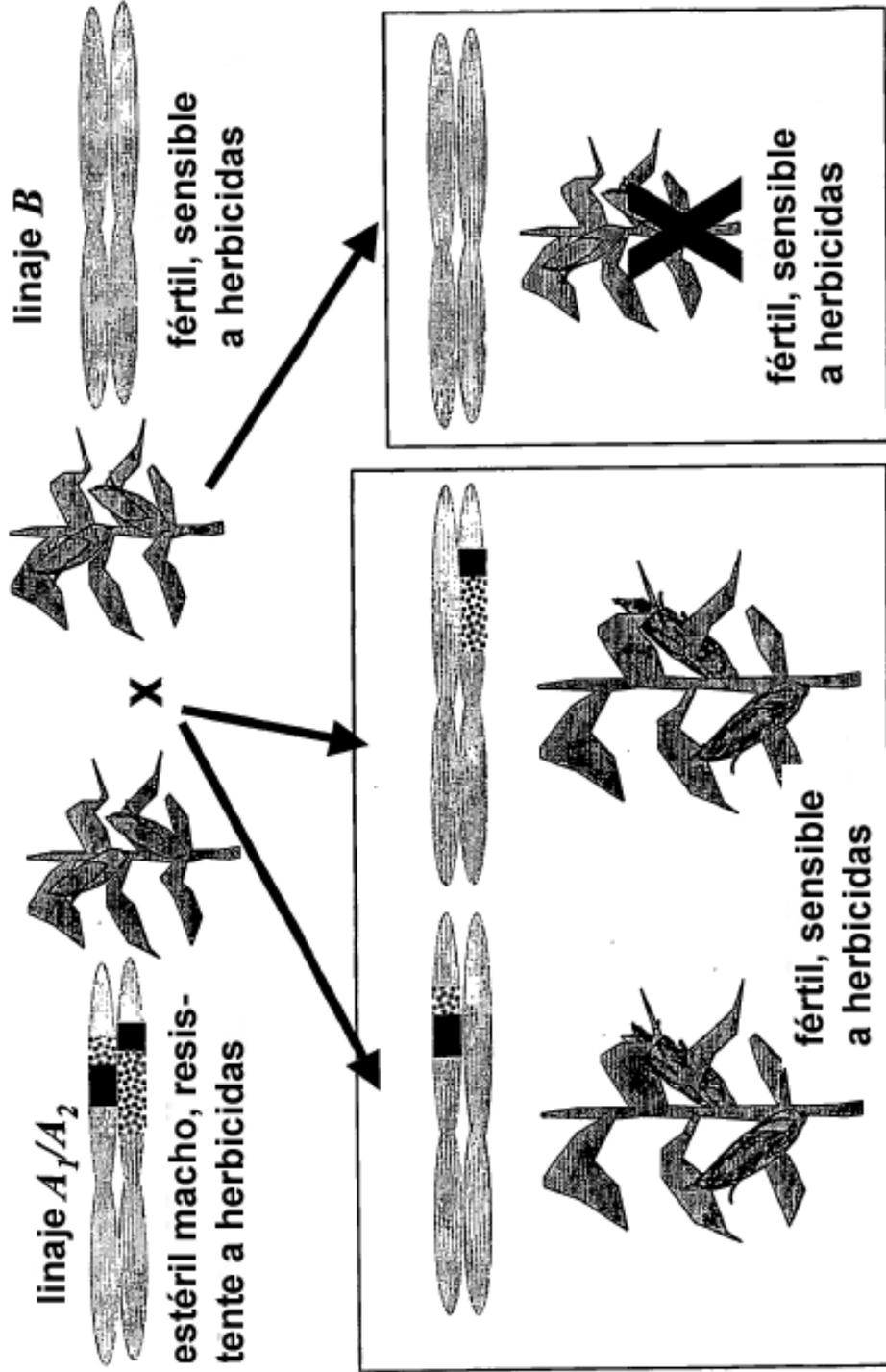


Fig. 14C

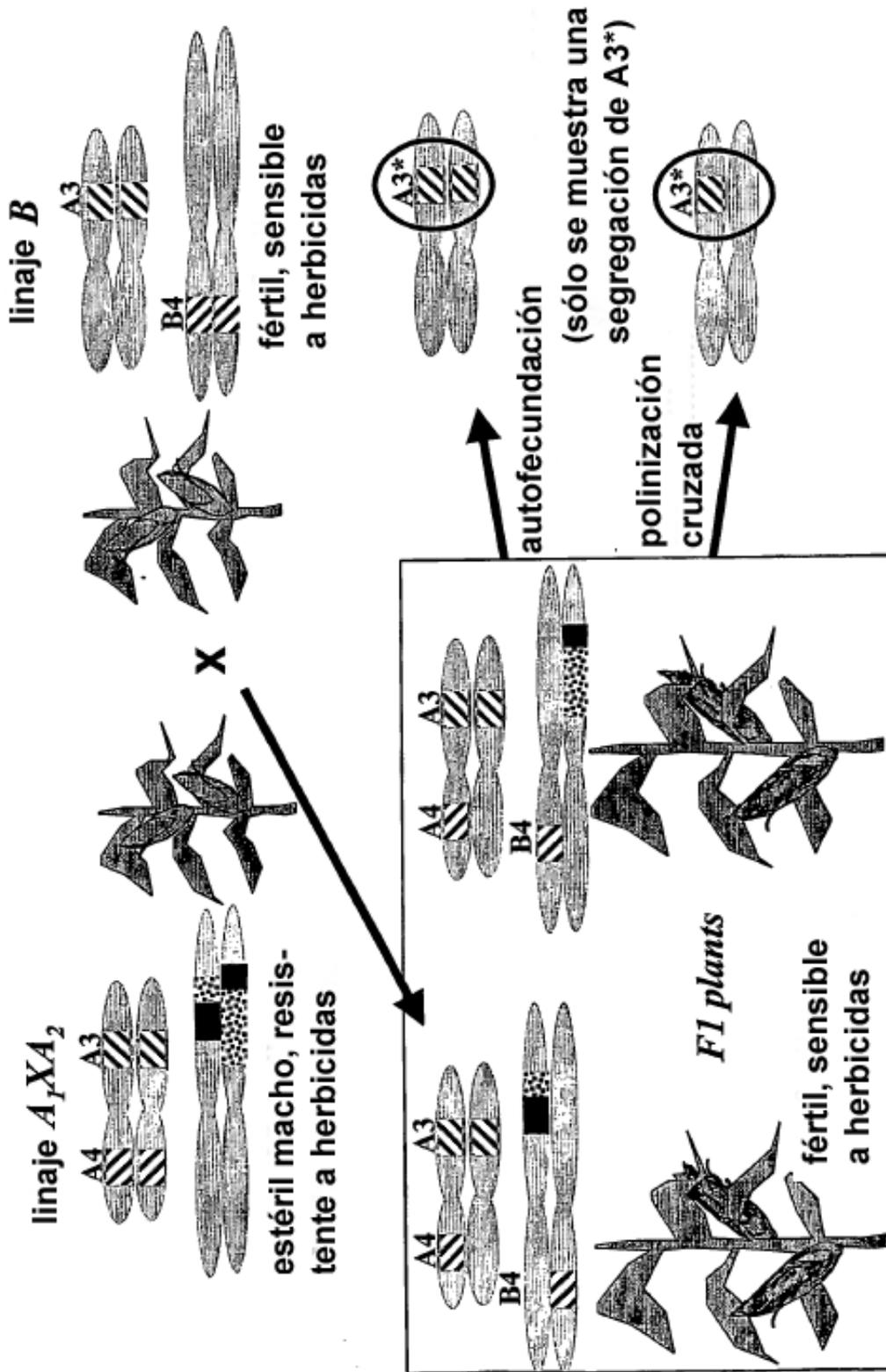


Fig. 14D

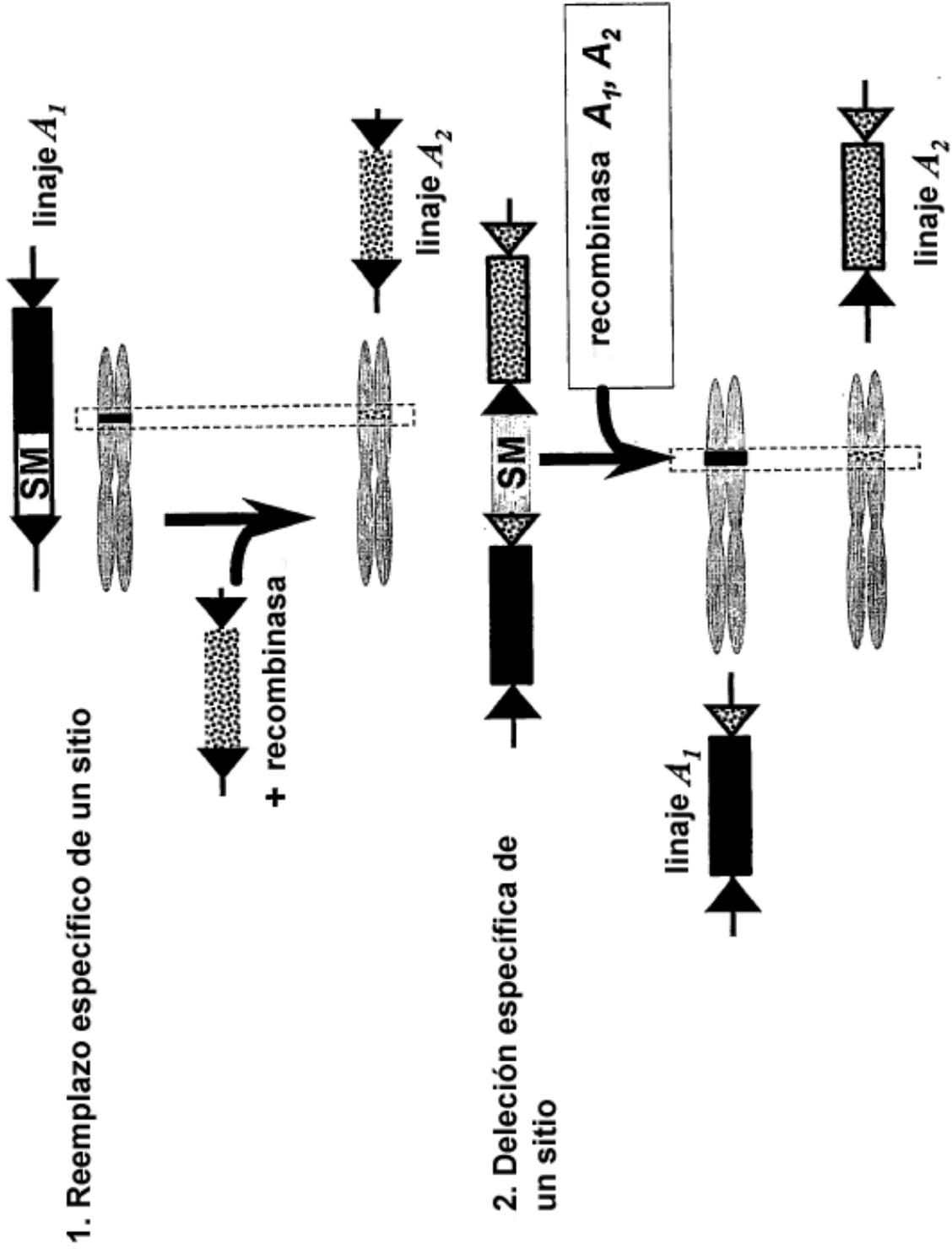


Fig. 15

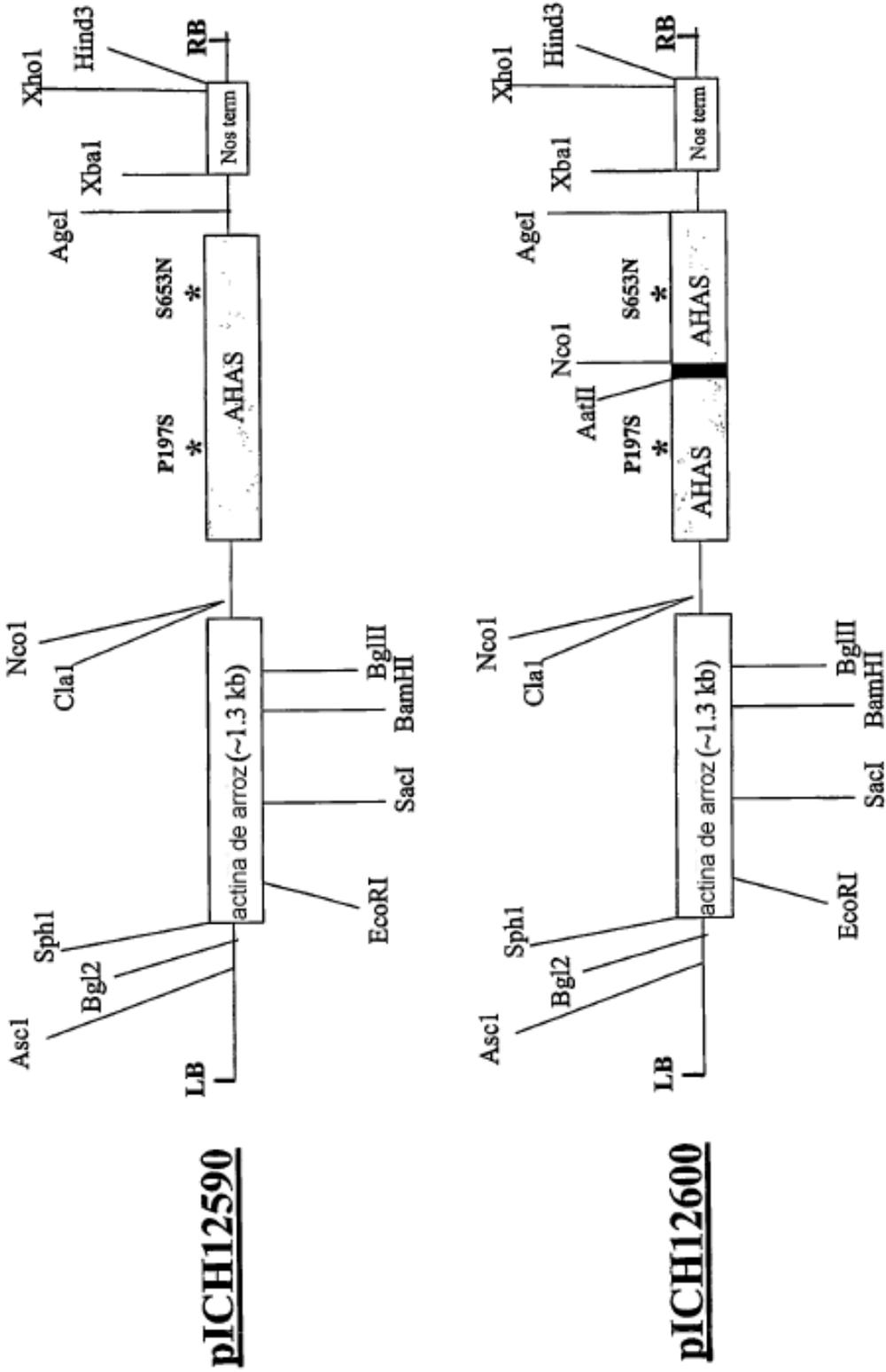


Fig. 16

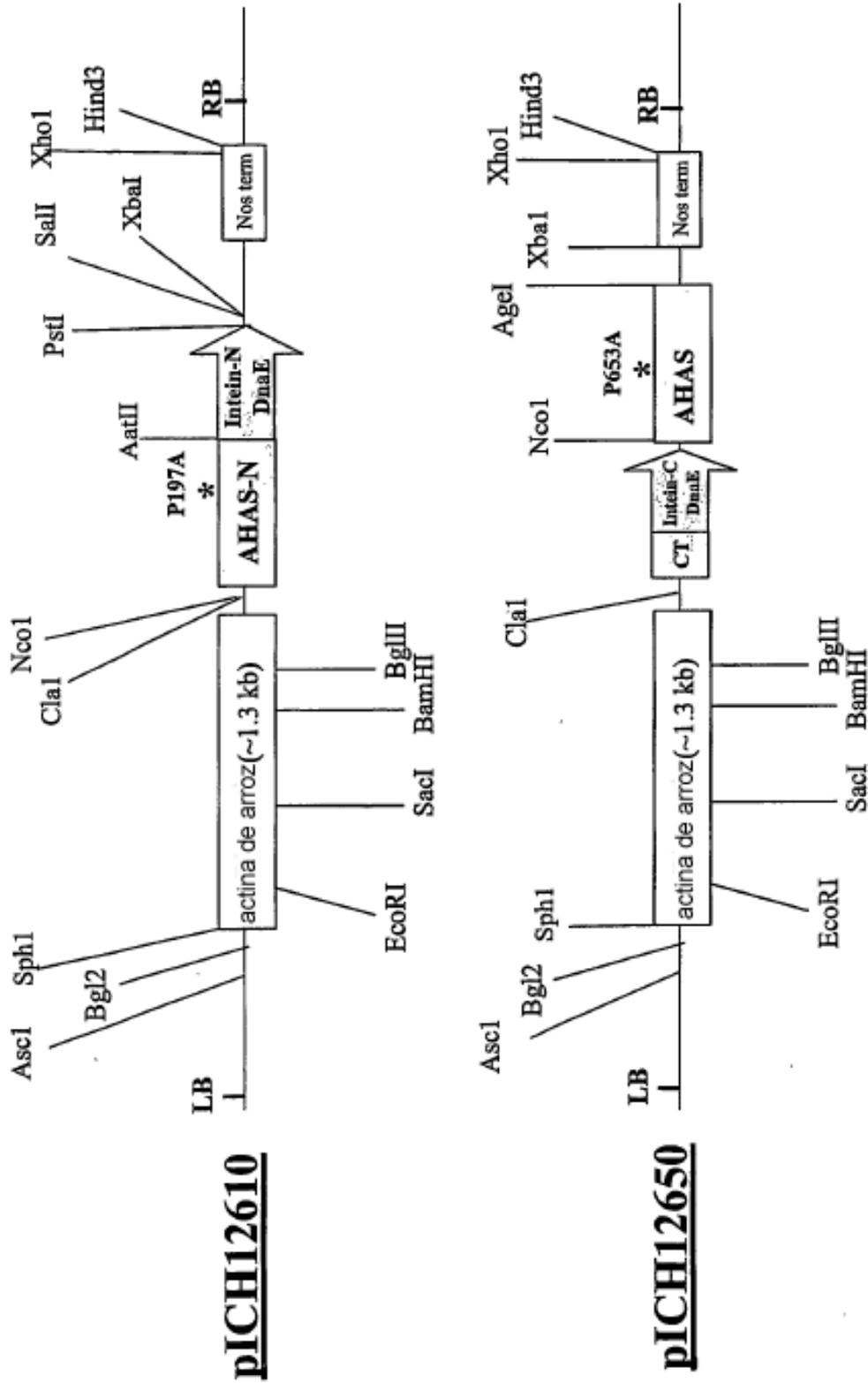


Fig. 17

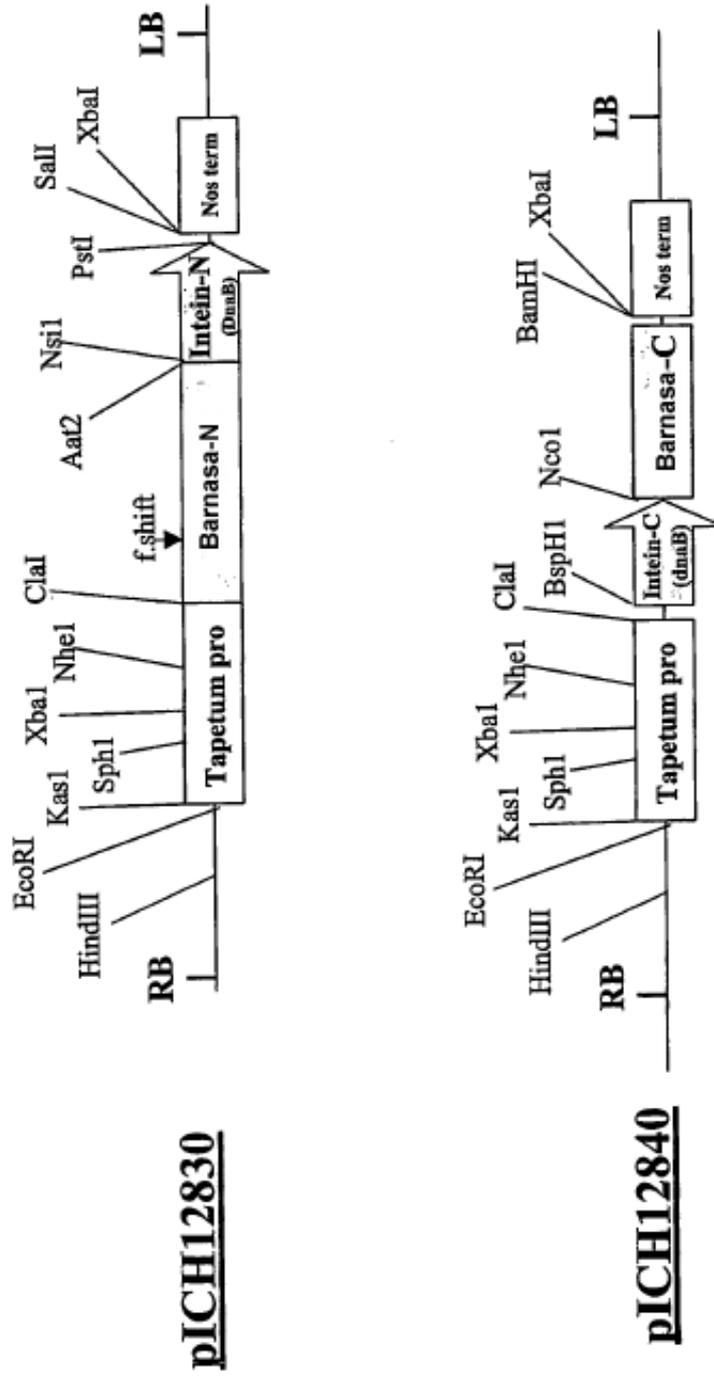
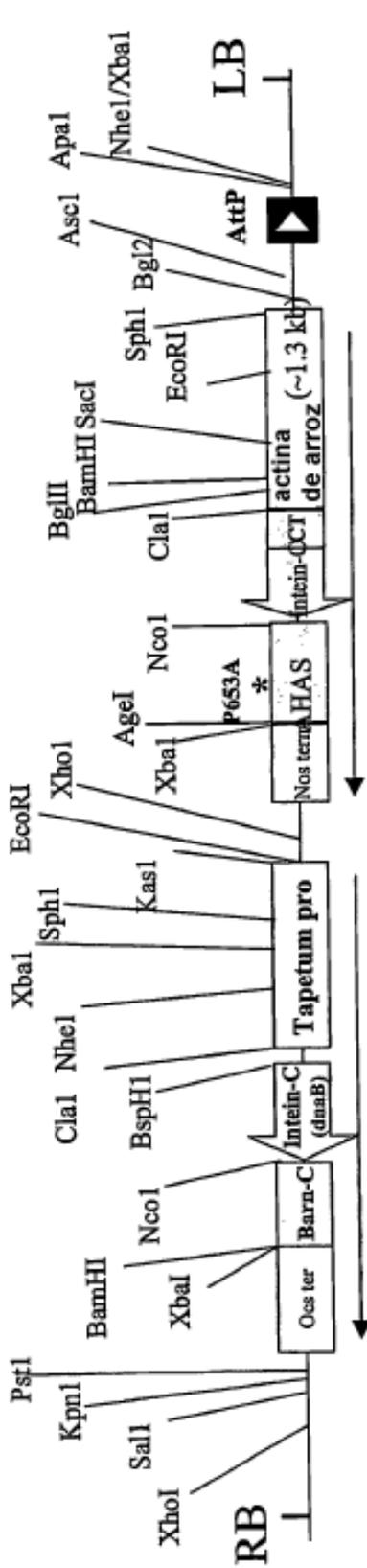


Fig. 18

pICH12910



pICH12950

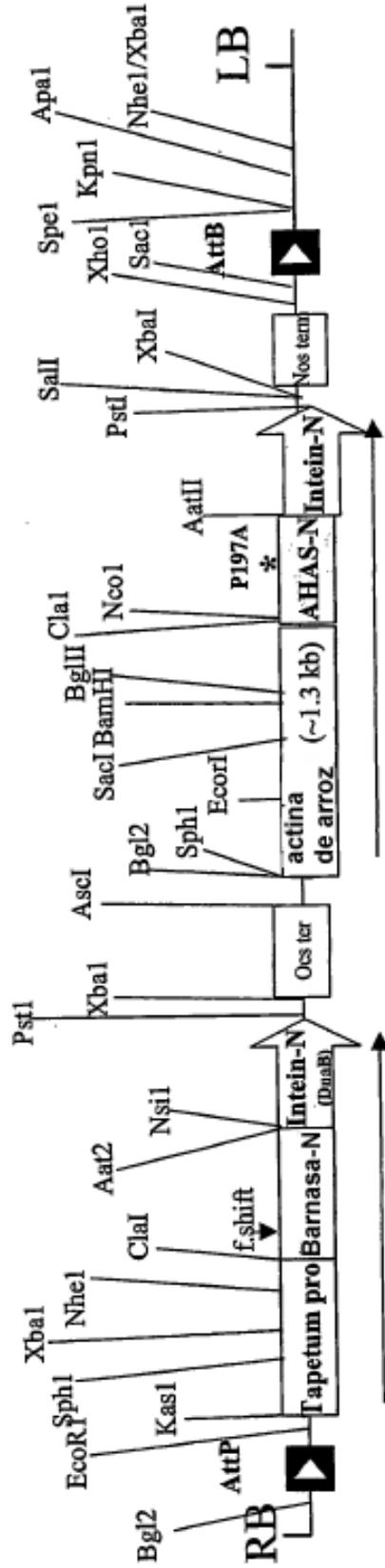


Fig. 19

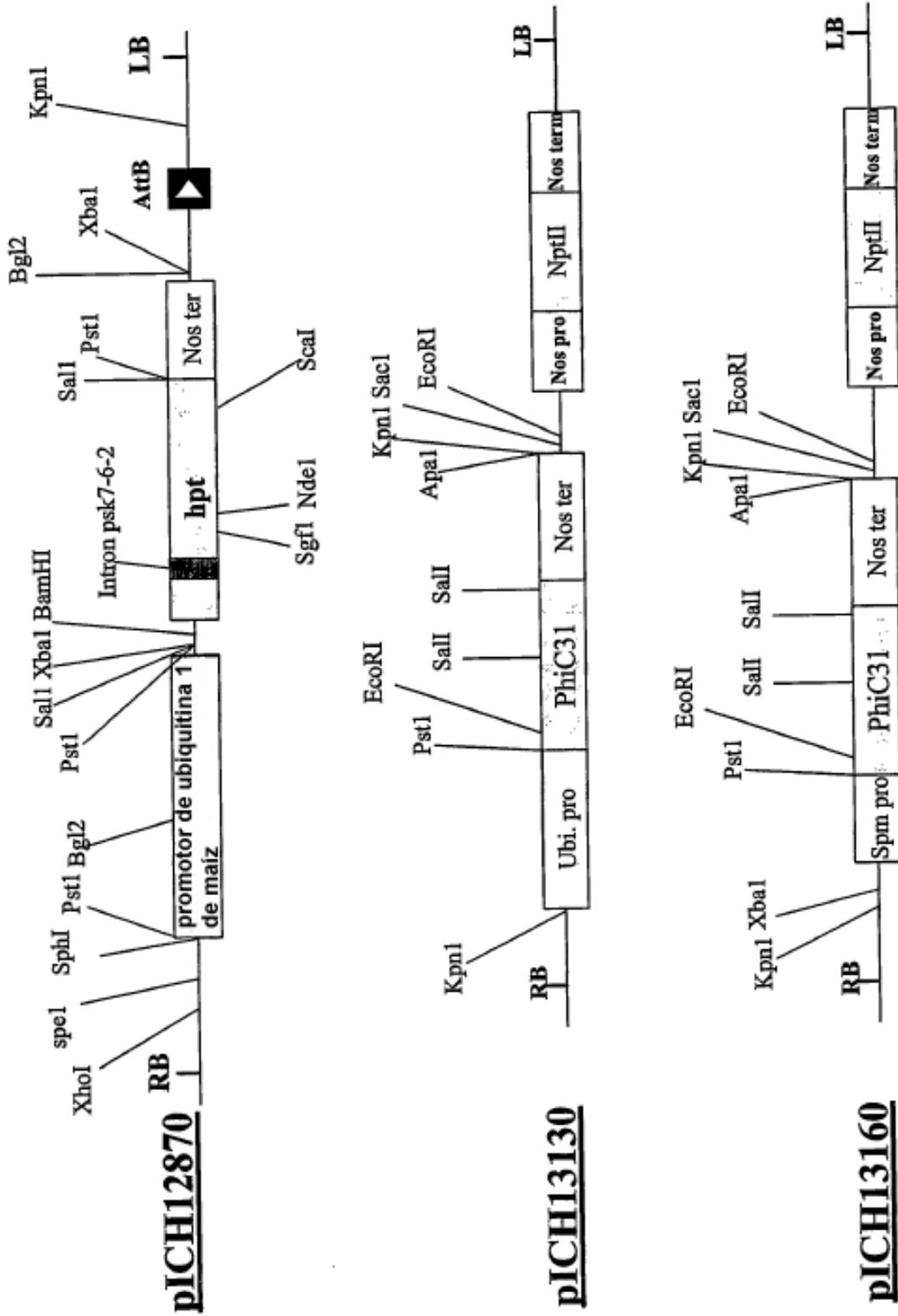
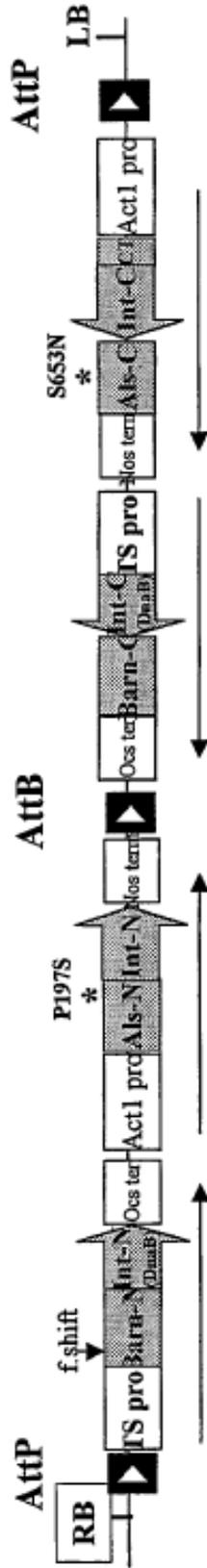


Fig. 20

pICH12960



pICH12970

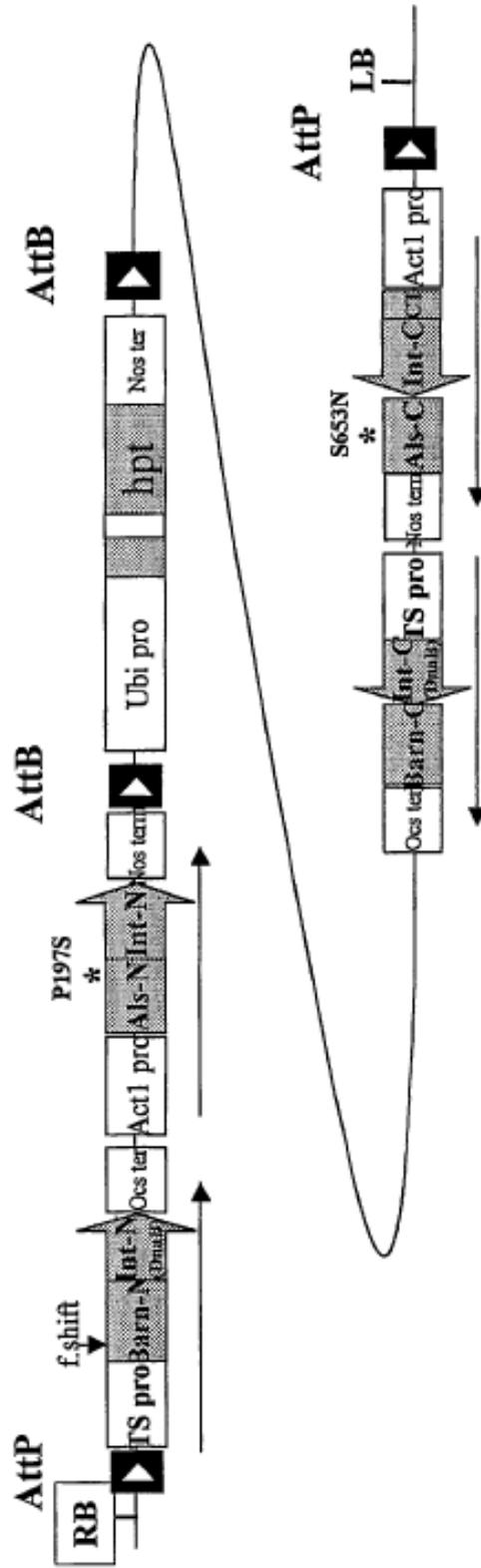


Fig. 21

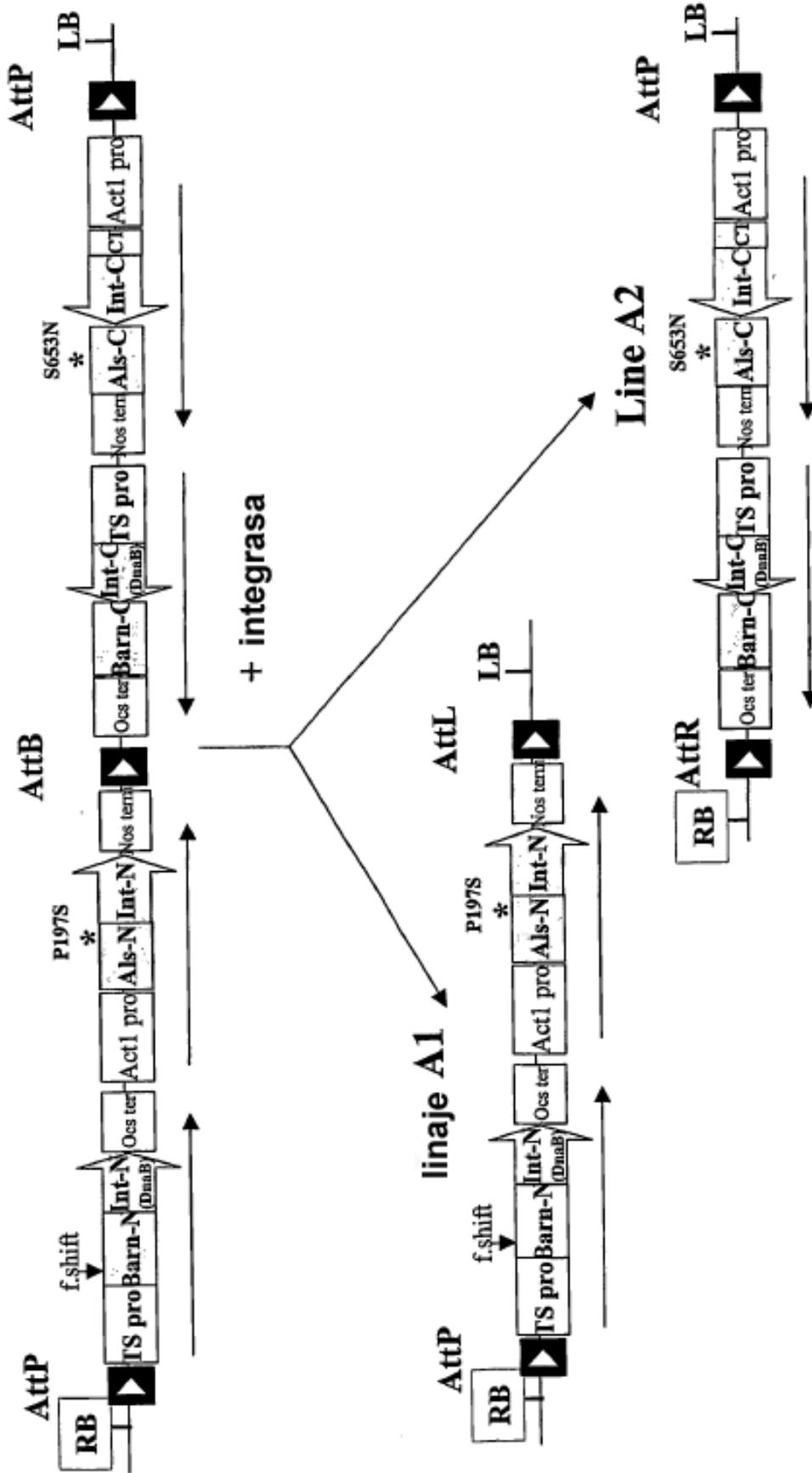


Fig. 22