

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 104**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08743883 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 2126097**

54 Título: **Transgenes de supresión de genes dominantes y métodos para usar los mismos**

30 Prioridad:

14.03.2007 US 685956

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.02.2013

73 Titular/es:

**PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL INC.
(100.0%)
7100 N.W. 62ND AVENUE
JOHNSTON, IA 50131-1014, US**

72 Inventor/es:

**CIGAN, ANDREW M.;
FOX, TIM W.;
HERSHEY, HOWARD P.;
UNGER, ERICA y
WU, YONGZHONG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 396 104 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

Transgenes de supresión de genes dominantes y métodos para usar los mismos

Campo de la invención

5 La invención se refiere al control de la expresión de una variante alélica de un gen de interés en una planta o célula de planta.

Antecedentes de la invención

WO 2005/059121 describe composiciones y métodos para la supresión de genes dominantes. Cigan et al. (2005) Plant Journal 43: 929-940 describe el silenciamiento transcripcional de genes como una herramienta para descubrir la función génica en el maíz.

10 Descripción breve de las figuras

La Figura 1 proporciona la identificación de información respecto a los genes y/o promotores MS45, MS26, 5126 y BS7 de *Zea mays*, *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana*.

La Figura 2 representa el mantenimiento de la mutación homocigota recesiva en plantas androestériles para la producción de híbridos.

15 La Figura 3 muestra que pIR de MS45 de arroz es eficaz en la supresión del promotor correspondiente de arroz pero no de maíz.

La Figura 4 es un esquema de un vector genérico de complementación/supresión.

La Figura 5 es un esquema de un ejemplo de un vector de complementación/supresión de MS45.

La Figura 6 es un esquema que muestra el diseño de un vector para el mantenimiento de genes letales recesivos.

20 Resumen de la invención

La invención proporciona un método para controlar la expresión de una variante alélica de un gen de interés en una planta o célula de planta, que comprende:

(a) silenciar dicho gen de interés usando una construcción pIR dirigida al promotor que dirige la expresión de dicho gen de interés; y

25 (b) expresar recombinantemente dicha variante alélica unida operativamente a un segundo promotor; preferiblemente en el que dicho gen de interés es un gen endógeno.

La invención también proporciona una pareja de plantas en el que la primera planta comprende:

(a) un primer promotor unido operativamente a un gen de interés;

(b) una construcción pIR dirigida a dicho primer promotor;

30 (c) una construcción que comprende un segundo promotor unido operativamente a una variante alélica del gen de interés; y

la segunda planta comprende una construcción pIR dirigida al segundo promotor.

La notación ARN_{hp} tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula de ARN en horquilla de promotor y puede usarse indistintamente con la notación "pIR" para repetición invertida de promotor.

35 Un método de la invención puede llevarse a la práctica usando células únicas que contienen el gen de interés, o puede llevarse a la práctica usando un organismo que contiene la célula. El organismo puede ser cualquier organismo de interés en el que se expresa el gen de interés. En una realización, la célula es una célula de planta, que puede ser una célula de planta *in vitro* o puede ser una o más células de una planta *in situ*. En una realización, el organismo es una planta transgénica, que contiene la primera molécula de ácido nucleico exógena integrada de manera estable en su genoma. En un aspecto de esta realización, la planta transgénica contiene además, integrada en su genoma, una
40 segunda molécula de ácido nucleico exógena (que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido

codificado por el gen de interés) unida operativamente a un segundo promotor heterólogo, en el que, después de la expresión de la segunda molécula de ácido nucleico exógena a partir del segundo promotor heterólogo, se restaura el fenotipo salvaje.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 Como se ha discutido anteriormente, la invención se refiere a un método para controlar la expresión de una variante alélica de un gen de interés en una planta o célula de planta y para una pareja de plantas como se ha definido anteriormente.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "endógeno", cuando se usa en referencia a un gen, significa un gen que está presente normalmente en el genoma de las células de un organismo especificado y está presente en su estado normal en las células (es decir, está presente en el genoma en el estado en el que está presente normalmente en la naturaleza). El término "exógeno" se usa en la presente memoria para referirse a cualquier material que se introduce en una célula. El término "molécula de ácido nucleico exógena" o "transgén" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que no está presente normalmente en el genoma de una célula o se introduce en una célula. Dichas moléculas de ácido nucleico exógenas son generalmente moléculas de ácido nucleico recombinantes, que se generan usando métodos de ADN recombinante como se describe en la presente memoria o conocidos de otra manera en la técnica. En varias realizaciones, un organismo no humano transgénico como se describe en la presente memoria, puede contener, por ejemplo, un primer transgén y un segundo transgén. Dichos primer y segundo transgenes pueden introducirse en una célula, por ejemplo, una célula progenitora de un organismo transgénico, bien como moléculas de ácido nucleico individuales o como una única unidad (por ejemplo, contenidas en diferentes vectores o contenidas en un único vector, respectivamente). En cualquier caso, puede confirmarse que una célula de la que se va a obtener el organismo transgénico contiene ambos transgenes usando métodos rutinarios y muy conocidos tales como expresión de genes marcadores o hibridación de ácido nucleico o análisis por PCR. Alternativamente, o adicionalmente, la confirmación de la presencia de transgenes puede ocurrir más tarde, por ejemplo, después de la regeneración de una planta a partir de una célula potencialmente transformada.

25 Como ejemplo, la inactivación de los genes de fertilidad endógenos puede efectuarse por la expresión de moléculas de ARN en horquilla (ARNhp) en células de los órganos reproductores de una planta (por ejemplo, células del estambre en las que los genes de la fertilidad endógenos que se van a inactivar son genes de la fertilidad masculina). El estambre, que comprende el órgano reproductor masculino de las plantas, incluye varios tipos de células, incluyendo, por ejemplo, el filamento, antera, tapete y polen. Los ARNhp útiles para los propósitos de la presente invención se diseñan para incluir repeticiones invertidas de un promotor del gen endógeno que se va a inactivar; se han descrito ARNhp que tienen la capacidad de suprimir la expresión de un gen (véase, por ejemplo, Matzke, et al., (2001) Curr. Opin. Genet. Devel. 11: 221-227; Scheid, et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99: 13659-13662; Waterhouse y Helliwell (2003) Nature Reviews Genetics 4: 29-38; Aufsatz, et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99(4): 16499-16506; Sijen, et al., (2001) Curr. Biol. 11: 436-440). Como se describe en la presente memoria, el uso de promotores específicos del estambre o preferidos del estambre, incluyendo promotores específicos de la antera, promotores específicos del polen, promotores específicos del tapete y semejantes, permite la expresión de ARNhp en plantas (particularmente en células reproductoras masculinas de la planta), en el que el ARNhp suprime la expresión de un gen de fertilidad endógeno, inactivando de esta manera la expresión del gen de fertilidad endógeno. Como tal, la supresión usando un ARNhp específico de un promotor que dirige la expresión de un gen de fertilidad proporciona un medio para inactivar un gen de fertilidad endógeno.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "molécula de ácido nucleico" o "polinucleótido" o "secuencia de nucleótidos" se refiere ampliamente a una secuencia de dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que están unidos entre sí por un enlace fosfodiéster. Como tal, los términos incluyen ARN y ADN, que pueden ser un gen o una parte de éste, un ADNc, una secuencia de ácido polidesoxirribonucleico sintética, o semejantes, y puede ser monocatenario o bicatenario, así como un híbrido ADN/ARN. Además, los términos se usan en la presente memoria para incluir moléculas de ácido nucleico naturales, que pueden aislarse de una célula, así como moléculas sintéticas, que pueden prepararse, por ejemplo, por métodos de síntesis química o por métodos enzimáticos tales como por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El término "recombinante" se usa en la presente memoria para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico que se manipula fuera de una célula, incluyendo dos o más secuencias de nucleótidos heterólogas unidas. El término "heterólogo" se usa en la presente memoria para hacer referencia a secuencias de nucleótidos que normalmente no están unidas en la naturaleza o, si están unidas, están unidas de una manera diferente a la descrita. Por ejemplo, la referencia a un transgén que comprende una secuencia codificadora unida operativamente a un promotor heterólogo significa que el promotor es uno que normalmente no dirige la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula especificada en la naturaleza.

55 En general, los nucleótidos que comprenden una molécula de ácido nucleico exógena (transgén) son desoxirribonucleótidos naturales, tales como adenina, citosina, guanina o timidina unidos a 2'-desoxirribosa o

ribonucleótidos tales como adenina, citosina, guanina o uracilo unidos a ribosa. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos también puede contener análogos de nucleótidos, incluyendo nucleótidos sintéticos no naturales o nucleótidos naturales modificados. Dichos análogos de nucleótidos son muy conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, como lo están los polinucleótidos que contienen dichos análogos de nucleótidos (Lin, et al., Nucl. Acids Res. 22: 5220-5234, 1994; Jellinek, et al., (1995) Biochemistry 34: 11363-11372; Pagratis, et al., (1997) Nature Biotechnol. 15: 68-73). De manera similar, la unión por enlace covalente de los nucleótidos de una secuencia de nucleótidos generalmente es un enlace fosfodiéster, pero también puede ser, por ejemplo, un enlace tiodiéster, un enlace fósforotioato, un enlace semejante a peptídico o cualquier otro enlace conocido para los expertos en la técnica como útil para unir nucleótidos para producir polinucleótidos sintéticos (véase, por ejemplo, Tam, et al., (1994) Nucl. Acids Res. 22: 977-986; Ecker y Crooke, (1995) BioTechnology 13: 351-360). La incorporación de análogos de nucleótidos o enlaces no naturales para unir los nucleótidos o análogos puede ser particularmente útil cuando la molécula de ácido nucleico se va a exponer a un entorno que puede contener una actividad nucleolítica, incluyendo, por ejemplo, un medio de cultivo de tejido vegetal o en una célula de planta, ya que las moléculas modificadas pueden ser menos susceptibles a la degradación.

Una secuencia de nucleótidos que contiene nucleótidos y enlaces fosfodiéster no naturales puede sintetizarse químicamente o puede producirse usando métodos de ADN recombinante, usando un polinucleótido apropiado como molde. En comparación, una secuencia de nucleótidos que contiene análogos de nucleótidos o enlaces covalentes distintos de enlaces fosfodiéster generalmente se sintetiza químicamente, aunque una enzima tal como polimerasa T7 puede incorporar determinados tipos de análogos de nucleótidos en un polinucleótido y, por lo tanto, puede usarse para producir dicho polinucleótido recombinantemente a partir de un molde apropiado (Jellinek, *et al.*, *supra*, 1995).

Una molécula de ácido nucleico exógena puede comprender secuencias de nucleótidos unidas operativamente tal como un promotor unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un ARNhp o un promotor unido a una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de fertilidad masculina. El término "unido operativamente" se usa en la presente memoria para hacer referencia a dos o más moléculas que, cuando están unidas entre sí, generan una molécula que comparte características que son características de cada una de las moléculas individuales. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a un promotor (u otro elemento regulador) y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico, el término "unido operativamente" significa que el elemento regulador esta situado respecto a la segunda secuencia de nucleótidos de manera tal que la transcripción o traducción de la secuencia de nucleótidos aislada está bajo la influencia del elemento regulador. Cuando se usa en referencia a una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y uno o más polipéptidos adicionales, el término "unido operativamente" significa que cada componente polipeptídico de la proteína de fusión (quimérica) presenta parte o toda una función que es característica del componente polipeptídico (por ejemplo, un dominio de localización en un compartimento celular y una actividad enzimática). En otro ejemplo, dos secuencias de nucleótidos unidas operativamente, cada una de las cuales codifica un polipéptido, puede ser tal que las secuencias codificadoras están en marco y, por lo tanto, después de la transcripción y la traducción, resulta en la producción de dos polipéptidos, que pueden ser dos polipéptidos separados o una proteína de fusión.

Cuando una molécula de ácido nucleico exógena incluye un promotor unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN o polipéptido de interés, la molécula de ácido nucleico exógena puede referirse como una molécula de ácido nucleico exógena expresable (o transgén). El término "expresable" se usa en la presente memoria porque, aunque dicha secuencia de nucleótidos puede expresarse a partir del promotor, no es necesario que realmente se exprese en un punto particular de tiempo. Por ejemplo, cuando un promotor de un transgén expresable es un promotor inducible que carece de actividad basal, una secuencia de nucleótidos unida operativamente que codifica un ARN o polipéptido de interés se expresa sólo después de la exposición a un agente inductor apropiado.

Los promotores transcripcionales actúan generalmente de manera dependiente de la posición y orientación y habitualmente están situados a o en el intervalo de aproximadamente cinco nucleótidos a aproximadamente cincuenta nucleótidos 5' (en dirección 5') del sitio de inicio de la transcripción de un gen en la naturaleza. En comparación, los potenciadores pueden actuar de una manera relativamente dependiente de la posición u orientación y pueden estar situados varios cientos o miles de nucleótidos en 5' o 3' de un sitio de inicio de la transcripción o en un intrón en la región codificadora de un gen, y estar aún así unidos operativamente a la región codificadora para potenciar la transcripción. Las posiciones y orientaciones relativas de varios elementos reguladores además de un promotor, incluyendo la posición de una secuencia reguladora transcrita tal como un sitio de entrada de ribosomas interno, o un elemento regulador traducido tal como un dominio de compartimentalización celular en un marco de lectura apropiado, son muy conocidas, y los métodos para unir operativamente dichos elementos son rutinarios en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, et al., "Molecular Cloning: A laboratory manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Ausubel, et al., "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley and Sons, Baltimore MD 1987 y suplementos hasta 1995)).

Los promotores útiles para expresar una molécula de ácido nucleico de interés pueden ser cualquiera de un rango de promotores naturales conocidos por ser operativos en plantas o animales, según se desee. Los promotores que dirigen

la expresión en células de órganos reproductores masculinos o femeninos de una planta son útiles para generar una planta transgénica o pareja de plantas reproductoras de la invención. Los promotores útiles en la presente invención pueden incluir promotores constitutivos, que generalmente son activos en la mayor parte o todos los tejidos de una planta; promotores inducibles, que generalmente son inactivos o presentan un nivel basal bajo de expresión, y pueden inducirse a una actividad relativamente alta después del contacto de las células con un agente inductor apropiado; promotores específicos de tejido (o preferidos de tejido), que generalmente se expresan sólo en uno o muy pocos tipos celulares particulares (por ejemplo, células de la antera de plantas); y promotores específicos de desarrollo o estado, que son activos sólo durante un periodo definido durante el crecimiento o desarrollo de una planta. Frecuentemente, los promotores pueden modificarse, si es necesario, para variar el nivel de expresión. Determinadas realizaciones comprenden promotores exógenos a las especies que se están manipulando. Por ejemplo, el gen Ms45 introducido en el germoplasma ms45ms45 de maíz puede estar dirigido por un promotor aislado de otra especie de planta; una construcción en horquilla puede diseñarse entonces para estar dirigida al promotor exógeno de la planta, reduciendo la posibilidad de interacción de la horquilla con promotores de maíz endógenos que no son diana.

Los promotores constitutivos ejemplares incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S (Odell, et al., (1985) Nature 313: 810-812), el promotor de la ubiquitina de maíz (Christensen, et al., (1989) Plant Mol. Biol. 12: 619-632 y Christensen, et al., (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675-689); el promotor central del promotor Rsyn7 y otros promotores constitutivos descritos en WO 99/43838 y Patente U.S. No. 6.072.050; actina de arroz (McElroy, et al., (1990) Plant Cell 2: 163-171); pEMU (Last, et al., (1991) Theor. Appl. Genet. 81: 581-588); MAS (Velten, et al., (1984) EMBO J. 3: 2723-2730); promotor ALS (Patente U.S. No. 5.659.026); promotor de la actina de arroz (Pat. U.S. No. 5.641.876; WO 00/70067), promotor de la histona de maíz (Brignon, et al., (1993) Plant Mol Bio 22(6): 1007-1015; Rasco-Gaunt, et al., (2003) Plant Cell Rep. 21(6): 569-576) y semejantes. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, los descritos en las Patentes U.S. Números 5.608.144 y 6.177.611 y la publicación PCT WO 03/102198.

Los elementos reguladores específicos de tejido, preferidos de tejido o específicos de estado incluyen además, por ejemplo, el elemento regulador *AGL81 FRUITFULL*, que se activa después de la inducción floral (Hempel, et al., (1997) Development 124: 3845-3853); elementos reguladores específicos de raíces tales como los elementos reguladores del gen RCP1 y el gen LRP1 (Tsugeki y Fedoroff, (1999) Proc. Natl. Acad., USA 96: 12941-12946, Smith y Fedoroff, (1995) Plant Cell 7: 735-745); elementos reguladores específicos de flores tales como los elementos reguladores del gen *LEAFY* o el gen *APETALA1* (Blazquez, et al., (1997) Development 124: 3855-3844; Hempel, et al., supra, 1997); elementos reguladores específicos de semilla tales como el elemento regulador del gen de oleosina (Plant et al., (1994) Plant Mol. Biol. 25: 193-205) y el elemento regulador específico de la zona de dehiscencia. Los elementos reguladores adicionales específicos de tejido o específicos de estado incluyen el promotor Zn13, que es un promotor específico del polen (Hamilton, et al., (1992) Plant Mol. Biol. 18: 211-218); el promotor de *ÓRGANOS FLORALES INUSUALES (UFO)*, que es activo en el meristemo apical del brote; el promotor activo en meristemos de brotes (Atanassova, et al., (1992) Plant J. 2: 291), el promotor *cdc2* y el promotor *cyc07* (véase, por ejemplo, Ito, et al., (1994) Plant Mol. Biol. 24: 863-878; Martinez, et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89: 7360); los promotores preferidos meristemáticos *meri-5* y *H3* (Medford, et al., (1991) Plant Cell 3: 359; Terada, et al., (1993) Plant J. 3: 241); los promotores preferidos meristemáticos y de floema de los genes relacionados con *Myb* en cebada (Wissenbach, et al., (1993) Plant J. 4: 411); *cyc3aAt* y *cyc1At* de *Arabidopsis* (Shaul, et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 4868-4872); las ciclinas *CYS* y *CYM* de *C. roseus* (Ito, et al., (1997) Plant J. 11: 983-992); y *CiclinaB1* de *Nicotiana* (Trehin, et al., (1997) Plant Mol. Biol. 35: 667-672); el promotor del gen *APETALA3*, que es activo en los meristemos florales (Jack, et al., (1994) Cell 76: 703; Hempel, et al., supra, 1997); un promotor de un miembro de la familia semejante a *agamous* (AGL), por ejemplo, *AGL8*, que es activo en el meristemo del brote después de la transición a floración (Hempel, et al., supra, 1997); los promotores de la zona de abscisión floral; los promotores específicos L1; el promotor de la poligalacturonasa de tomate potenciado por maduración (Nicholass, et al., (1995) Plant Mol. Biol. 28: 423-435), el promotor E8 (Deikman, et al., (1992) Plant Physiol. 100: 2013-2017) y el promotor específico de fruto 2A1, los promotores de ARNs_n U2 y U5 de maíz, el promotor Z4 de un gen que codifica la proteína zeína Z4 de 22 kD, el promotor Z10 de un gen que codifica una proteína zeína de 10 kD, un promotor Z27 de un gen que codifica una proteína zeína de 27 kD, el promotor A20 del gen que codifica una proteína zeína de 19 kD, y semejantes. Los promotores específicos de tejido adicionales pueden aislarse usando métodos muy conocidos (véase, por ejemplo, la Patente U.S. Número 5.589.379). Los promotores preferidos del brote incluyen promotores preferidos de meristemo del brote tales como los promotores descritos en Weigel, et al., (1992) Cell 69: 843-859 (No. de Registro M91208); No. de Registro AJ131822; No. de Registro Z71981; No. de Registro AF049870 y los promotores preferidos de brote descritos en McAvoy, et al., (2003) Acta Hort. (ISHS) 625: 379-385. Los promotores preferidos de inflorescencia incluyen el promotor de la chalcona sintasa (Van der Meer, et al., (1992) Plant J. 2(4): 525-535), LAT52 específico de antera (Twell, et al., (1989) Mol. Gen. Genet. 217: 240-245), Bp4 específico de polen (Albani, et al., (1990) Plant Mol. Biol. 15: 605, gen específico de polen de maíz Zm13 (Hamilton, et al., (1992) Plant Mol. Biol. 18: 211-218; Guerrero, et al., (1993) Mol. Gen. Genet. 224: 161-168), promotores específicos de microspora tales como el promotor del gen *apg* (Twell, et al., (1993) Sex. Plant Reprod. 6: 217-224) y los promotores específicos de tapete tales como el promotor del gen TA29 (Mariani, et al., (1990) Nature 347: 737; Patente U.S. Número 6.372.967), y otros promotores específicos de estambre tales como el promotor del gen MS45, el promotor del gen 5126, promotor del gen BS7,

promotor del gen PG47 (US 5.412.085; US 5.545.546; Plant J 3(2): 261-271 (1993)), promotor del gen SGB6 (US 5.470.359), promotor del gen G9 (5.8937.850; 5.589.610), promotor del gen SB200 (WO 02/26789) o semejantes (véase, el Ejemplo 1). Los promotores preferidos de tejido de interés incluyen además un gen expresado en polen de girasol SF3 (Baltz, et al., (1992) The Plant Journal 2: 713-721), los genes específicos de polen de *B. napus* (Arnoldo, et al., (1992) J. Cell. Biochem, Resumen No. Y101204). Los promotores preferidos de tejido incluyen además los publicados por Yamamoto, et al., (1997) Plant J. 12(2): 255-265 (psaDb); Kawamata, et al., (1997) Plant Cell Physiol. 38(7): 792-803 (PsPAL1); Hansen, et al., (1997) Mol. Gen. Genet. 254(3): 337-343 (ORF13); Russell, et al., (1997) Transgenic Res. 6(2): 157-168 (waxy o ZmGBS; zeína de 27 kDa, ZmZ27; osAGP; osGT1); Rinehart, et al., (1996) Plant Physiol. 112(3): 1331-1341 (Fbl2A de algodón); Van Camp, et al., (1996) Plant Physiol. 112(2): 525-535 (SodA1 y SodA2 de *Nicotiana*); Canevascini, et al., (1996) Plant Physiol. 112(2): 513-524 (ltp1 de *Nicotiana*); Yamamoto, et al., (1994) Plant Cell Physiol. 35(5): 773-778 (promotor cab-6 de *Pinus*); Lam (1994) Results Probl. Cell Differ. 20: 181-196; Orozco, et al., (1993) Plant Mol. Biol. 23(6): 1129-1138 (rubisco activasa de espinaca (Rca)); Matsuoka, et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(20): 9586-9590 (promotor PPK); y Guevara-Garcia, et al., (1993) Plant J. 4(3): 495-505 (promotor pmas de *Agrobacterium*). Un promotor específico de tejido que es activo en las células de los órganos reproductores masculino o femenino puede ser particularmente útil en determinados aspectos de la presente invención.

Los promotores "preferidos de semilla" incluyen los promotores "específicos de semilla" (aquellos promotores activos durante el desarrollo de la semilla tales como los promotores de las proteínas de almacenamiento de la semilla) así como los promotores "de germinación de la semilla" (aquellos promotores activos durante la germinación de la semilla). Véase, por ejemplo, Thompson, et al., (1989) BioEssays 10: 108. Dichos promotores preferidos de semilla incluyen, pero no están limitados a, Cim1 (mensaje inducido por citoquinina), cZ19B1 (zeína de 19 kDa de maíz), mi1ps (mio-inositol-1-fosfato sintasa); véase WO 00/11177 y La Patente U.S. Número 6.225.529. La zeína gamma es un promotor específico del endospermo. Globulina-1 (Glob-1) es un promotor específico de embrión representativo. Para las dicotiledóneas, los promotores específicos de semilla incluyen, pero no están limitados a, β -faseolina de judía, napina, β -conglucina, lectina de soja, cruciferina y semejantes. Para las monocotiledóneas, los promotores específicos de semilla incluyen, pero no están limitados a, zeína de 15 kDa de maíz, zeína de 22 kDa, zeína de 27 kDa, gamma-zeína, waxy, shrunken-1, shrunken-2, globulina 1, etc. Véase, también, WO 00/12733 y Patente US 6.528.704, en la que se describen promotores preferidos de semilla de los genes *end1* y *end2*. Los promotores específicos de embrión adicionales se describen en Sato, et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 8117-8122 (homeodominio de arroz, OSH1); y Postma-Haarsma, et al., (1999) Plant Mol. Biol. 39: 257-71 (genes de arroz KNOX). Los promotores específicos de endospermo adicionales se describen en Albani, et al., (1984) EMBO 3: 1405-15; Albani, et al., (1999) Theor. Appl. Gen. 98: 1253-62; Albani, et al., (1993) Plant J. 4: 343-55; Mena, et al., (1998) The Plant Journal 116: 53-62 (DOF de cebada); Opsahl-Ferstad, et al., (1997) Plant J 12: 235-46 (Esr de maíz); y Wu, et al., (1998) Plant Cell Physiology 39: 885-889 (GluA-3, GluB-1, NRP33, RAG-1, de arroz).

Un elemento regulador inducible es uno que es capaz de activar directamente o indirectamente la transcripción de una o más secuencias de ADN o genes en respuesta a un inductor. El inductor puede ser un agente químico tal como una proteína, metabolito, regulador del crecimiento, herbicida o compuesto fenólico; o un estrés fisiológico, tal como el impuesto directamente por calor, frío, sal o elementos tóxicos o indirectamente a través de la acción de un patógeno o agente patológico tal como un virus; u otro agente biológico o físico o condición medioambiental. Una célula de planta que contiene un elemento regulador inducible puede exponerse a un inductor por la aplicación externa del inductor a la célula o planta tal como por pulverización, riego, calentamiento o métodos similares. Un agente inductor útil para inducir la expresión a partir de un promotor inducible se selecciona tomando como base el elemento regulador inducible particular. En respuesta a la exposición a un agente inductor, la transcripción a partir del elemento regulador inducible se inicia generalmente *de novo* o se incrementa por encima de un nivel basal o constitutivo de expresión. Típicamente, el factor proteico que se une específicamente a un elemento regulador inducible para activar la transcripción está presente en una forma inactiva a partir de la cual es convertido directamente o indirectamente a la forma activa por el inductor. Cualquier promotor inducible puede usarse en la presente invención (Véase, Ward, et al., (1993) Plant Mol. Biol. 22: 361-366).

Los ejemplos de elementos reguladores inducibles incluyen un elemento regulador de metalotioneína, un elemento regulador inducible por cobre o un elemento regulador inducible por tetraciclina, la transcripción a partir de los cuales puede efectuarse en respuesta a iones metálicos divalentes, cobre o tetraciclina, respectivamente (Furst, et al., (1988) Cell 55: 705-717; Mett, et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90: 4567-4571; Gatz, et al., (1992) Plant J. 2: 397-404; Roder, et al., (1994) Mol. Gen. Genet. 243: 32-38). Los elementos reguladores inducibles también incluyen un elemento regulador de ecdisona o un elemento regulador de glucocorticoides, la transcripción a partir de los cuales puede efectuarse en respuesta a ecdisona u otro esteroide (Christopherson, et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89: 6314-6318; Schena, et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88: 10421-10425; Patente U.S. Número 6.504.082); un elemento regulador de respuesta al frío o un elemento regulador de choque térmico, la transcripción a partir de los cuales puede efectuarse en respuesta al frío o el calor, respectivamente (Takahashi, et al., (1992) Plant Physiol. 99: 383-390); el promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa (Gerlach, et al., (1982) PNAS USA 79: 2981-2985; Walker, et al., (1987)

PNAS 84(19): 6624-6628), inducible por condiciones anaeróbicas; y el promotor inducible por la luz derivado del gen de guisante *rbcS* o el gen de guisante *psaDb* (Yamamoto, et al., (1997) *Plant J.*12(2): 255-265); un elemento regulador inducible por la luz (Feinbaum, et al., (1991) *Mol. Gen. Genet.* 226: 449; Lam y Chua, (1990) *Science* 248: 471; Matsuoka, et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20): 9586-9590; Orozco, et al., (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6): 1129-1138), un elemento regulador inducible por hormonas de plantas (Yamaguchi-Schinozaki, et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 15: 905; Kares, et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 15: 225), y semejantes. Un elemento regulador inducible también puede ser el promotor del gen de maíz *In2-1* o *In2-2*, que responde a protectores frente a herbicidas bencenosulfonamida (Hershey, et al., (1991) *Mol. Gen. Gene.* 227: 229-237; Gatz, et al., (1994) *Mol. Gen. Genet.* 243: 32-38) y el represor Tet del transposón *Tn10* (Gatz, et al., (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227: 229-237). Los promotores inducibles por estrés incluyen los promotores inducibles por estrés de sal/agua tales como *P5CS* (Zang, et al., (1997) *Plant Sciences* 129: 81-89); promotores inducibles por el frío, tales como, *cor15a* (Hajela, et al., (1990) *Plant Physiol.* 93: 1246-1252), *cor15b* (Wilhem, et al., (1993) *Plant Mol Biol* 23: 1073-1077), *wsc120* (Ouellet, et al., (1998) *FEBS Lett.* 423: 324-328), *ci7* (Kirch, et al., (1997) *Plant Mol Biol.* 33: 897-909), *ci21A* (Schneider, et al., (1997) *Plant Physiol.* 113: 335-45); promotores inducibles por la sequía, tales como, *Trg-31* (Chaudhary, et al., (1996) *Plant Mol. Biol.* 30: 1247-57), *rd29* (Kasuga, et al., (1999) *Nature Biotechnology* 18: 287-291); promotores inducibles por ósmosis, tales como, *Rab17* (Vilardell, et al., (1991) *Plant Mol. Biol.* 17: 985-93) y *osmotina* (Raghothama, et al., (1993) *Plant Mol Biol* 23: 1117-28); y promotores inducibles por calor, tales como las proteínas de choque térmico (Barros, et al., (1992) *Plant Mol.* 19: 665-75; Marrs, et al., (1993) *Dev. Genet.* 14: 27-41), *smHSP* (Waters, et al., (1996) *J. Experimental Botany* 47: 325-338) y el elemento inducible por choque térmico del promotor de ubiquitina de perejil (WO 03/102198). Otros promotores inducibles por estrés incluyen *rip2* (Patente U.S. No. 5.332.808 y Publicación U.S. No. 2003/0217393) y *rd29a* (Yamaguchi-Schinozaki, et al., (1993) *Mol. Gen. Genetics* 236: 331-340). Determinados promotores son inducibles por lesión, incluyendo el promotor *pmas* de *Agrobacterium* (Guevara-Garcia, et al., (1993) *Plant J.* 4(3): 495-505) y el promotor *ORF13* de *Agrobacterium* (Hansen, et al., (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3): 337-343).

Los elementos reguladores adicionales activos en células de plantas y útiles en los métodos o composiciones de la invención incluyen, por ejemplo, el elemento regulador del gen de la nitrito reductasa de espinaca (Back, et al., *Plant Mol. Biol.* 17: 9, 1991); un promotor de zeína gamma, un promotor de oleosina *ole16*, un promotor de globulina I, un promotor de actina I, un promotor de actina cl, un promotor de sacarosa sintetasa, un promotor de *INOPS*, un promotor de *EXM5*, un promotor de globulina2, un promotor de *b-32*, *ADPG*-pirofosforilasa, un promotor de *Ltp1*, un promotor de *Ltp2*, un promotor de oleosina *ole17*, un promotor de oleosina *ole18*, un promotor de actina 2, un promotor de proteínas específicas de polen, un promotor del gen de la pectato liasa específico de polen o un promotor del gen *PG47*, un promotor del gen *RTS2* específico de antera, promotor del gen *SGB6* o promotor del gen *G9*, un promotor del gen *RAB24* específico de tapete, un promotor de la subunidad alfa de la antranilato sintasa, un promotor de zeína alfa, un promotor de la subunidad beta de la antranilato sintasa, un promotor de dihidrodipicolinato sintasa, un promotor de *Thi I*, un promotor de la alcohol deshidrogenasa, un promotor de de la proteína de unión cab, un promotor de *H3C4*, un promotor de la enzima de ramificación del almidón *RUBISCO SS*, un promotor de actina3, un promotor de actina7, un promotor de la proteína reguladora *GF14-12*, un promotor de la proteína ribosomal *L9*, un promotor de enzimas biosintéticas de la celulosa, un promotor de la *S*-adenosil-L-homocisteína hidrolasa, un promotor de la superóxido dismutasa, un promotor de del receptor *C*-quinasa, un promotor de la fosfoglicerato mutasa, un promotor del *ARNm* de *RCc3* específico de raíz, un promotor de la glucosa-6-fosfato isomerasa, un promotor de la pirofosfato-fructosa-6-fosfato-I-fosfotransferasa, un promotor de la beta-cetoacil-ACP sintasa, un promotor del fotosistema 11 de 33 kDa, un promotor de la proteína productora de oxígeno, un promotor de la subunidad de *ATPasa* vacuolar de 69 kDa, un promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, un promotor de la proteína semejante inducible por *ABA* y maduración, un promotor de la fenilalanina amoniaco liasa, un promotor de la adenosina trifosfatasa *S*-adenosil-L-homocisteína hidrolasa, un promotor de la chalcona sintasa, un promotor de zeína, un promotor de globulina-1, un promotor de la proteína de unión a auxina, un promotor del gen de la *UDP* glucosa flavonoide glicosil-transferasa, un promotor de *NTI*, un promotor de actina y un promotor de opaque 2.

Una molécula de ácido nucleico exógena puede introducirse en una célula como una molécula de ADN desnuda, puede incorporarse en una matriz tal como un liposoma o una partícula tal como una partícula viral, o puede incorporarse en un vector. La incorporación del polinucleótido en un vector puede facilitar la manipulación del polinucleótido o la introducción del polinucleótido en una célula de planta. De acuerdo con esto, el vector puede obtenerse a partir de un plásmido o puede ser un vector viral tal como un vector *T*-ADN (Horsch, et al., (1985) *Science* 227: 1229-1231). Si se desea, el vector puede incluir componentes de un elementos transponible de una planta, por ejemplo, un transposón *Ds* (Bancroft y Dean, (1993) *Genetics* 134: 1221-1229) o un transposón *Spm* (Aarts, et al., (1995) *Mol. Gen. Genet.* 247: 555-564). Además de contener el transgén de interés, el vector también puede contener varias secuencias de nucleótidos que facilitan, por ejemplo, el rescate del vector de una célula de planta transformada; el paso del vector a una célula huésped, que puede ser una célula huésped de planta, animal, bacteriana o de insecto; o la expresión de una secuencia de nucleótidos codificadora en el vector, incluyendo toda o una parte de una región codificadora rescatada. Como tal, un vector puede contener cualquier número de elementos de transcripción y traducción adicionales, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, potenciadores y semejantes (véase, por ejemplo, Bitter, et al., (1987) *Meth. Enzymol.* 153:

516-544). Por ejemplo, un vector puede contener elementos útiles para el paso, crecimiento o expresión en un sistema bacteriano, incluyendo un origen de replicación bacteriano; un promotor, que puede ser un promotor inducible; y semejantes. Un vector también puede contener uno o más sitios de reconocimiento y escisión de endonucleasa de restricción, incluyendo, por ejemplo, una secuencia policonectora, para facilitar la inserción o eliminación de un transgén.

5 En determinadas realizaciones, el vector de expresión contiene un gen que codifica un marcador de selección que está unido funcionalmente a un promotor que controla el inicio de la transcripción. Para una descripción general de vectores de expresión y genes informadores de plantas, véase, Gruber, et al., "Vectors for Plant Transformation" en *Methods of Plant Molecular Biology and Biotechnology* 89-119 (CRC Press, 1993). Cuando se usa el término, se quiere incluir todos los tipos de marcadores de selección, ya sean valorables o selectivos. La expresión de dicha secuencia de nucleótidos puede proporcionar un medio para seleccionar una célula que contiene la construcción, por ejemplo, confiriendo un fenotipo deseable a una célula de planta que contiene la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos adicional puede ser, o codificar, un marcador seleccionable, que, cuando está presente o se expresa en una célula de planta, proporciona un medio para identificar la célula de planta que contiene el marcador.

10 Un marcador seleccionable proporciona un medio para cribar una población de organismos o células de un organismo (por ejemplo, plantas o células de plantas) para identificar aquellas que tienen el marcador y, por lo tanto, el transgén de interés. Un marcador seleccionable confiere generalmente una ventaja selectiva a la célula, o a un organismo (por ejemplo, una planta) que contiene la célula, por ejemplo, la capacidad de crecer en presencia de un agente selectivo negativo tal como un antibiótico o, para una planta, un herbicida. Una ventaja selectiva también puede deberse, por ejemplo, a una capacidad aumentada o nueva para utilizar un compuesto añadido como un nutriente, factor de crecimiento o fuente de energía. Una ventaja selectiva puede ser conferida por un único polinucleótido, o su producto de expresión, o por una combinación de polinucleótidos cuya expresión en una célula de planta proporciona a la célula una ventaja selectiva positiva, una ventaja selectiva negativa, o ambas. Debe admitirse que la expresión del transgén de interés (por ejemplo, que codifica un ARNhp) también proporciona un medio para seleccionar células que contienen la secuencia de nucleótidos codificadora. Sin embargo, el uso de un marcador seleccionable adicional, que, por ejemplo, permite a una célula de planta sobrevivir bajo condiciones de otra manera tóxicas, proporciona un medio para enriquecer con células de planta transformadas que contienen el transgén deseado. Los ejemplos de genes valorables o de selección adecuados conocidos en la técnica pueden encontrarse, por ejemplo, en Jefferson, et al., (1991) en *Plant Molecular Biology Manual*, ed. Gelvin, et al., (Kluwer Academic Publishers), p. 1-33; DeWet, et al., (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7: 725-737; Goff, et al., (1990) *EMBO J.* 9: 2517-2522; Kain, et al., (1995) *BioTechniques* 19: 650-655; y Chiu, et al., (1996) *Curr. Biol.* 6: 325-330.

15 Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a antimetabolitos tales como herbicidas o antibióticos, por ejemplo, dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia a metotrexato (Reiss, *Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)* 13: 143-149, 1994, véase, también, Herrera Estrella, et al., (1983) *Nature* 303: 209-213; Meijer, et al., (1991) *Plant Mol. Biol.* 16: 807-820); neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a los aminoglicósidos neomicina, kanamicina y paromicina (Herrera-Estrella, (1983) *EMBO J.* 2: 987-995) e higro, que confiere resistencia a higromicina (Marsch, (1984) *Gene* 32: 481-485; véase también, Waldron, et al., (1985) *Plant Mol. Biol.* 5: 103-108; Zhijian, et al., (1995) *Plant Science* 108: 219-227); *trpB*, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano; *hisD*, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85: 8047); manosa-6-fosfato isomerasa que permite a las células utilizar manosa (WO 94/20627); ornitina descarboxilasa, que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina (DFMO; McConlogue, 1987, En: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, ed.); y desaminasa de *Aspergillus terreus*, que confiere resistencia a Blastidina S (Tamura, (1995) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2336-2338). Los marcadores seleccionables adicionales incluyen, por ejemplo, una EPSPV-sintasa mutante, que confiere resistencia a glifosato (Hinchee, et al., (1998) *BioTechnology* 91: 915-922), una acetolactato sintasa mutante, que confiere resistencia a imidazolinona o sulfonilurea (Lee, et al., (1988) *EMBO J.* 7: 1241-1248), una *psbA* mutante, que confiere resistencia a atrazina (Smeda, et al., (1993) *Plant Physiol.* 103: 911-917) o una protoporfirinógeno oxidasa mutante (véase la Patente U.S. Número 5.767.373) u otros marcadores que confieren resistencia a un herbicida tal como glufosinato. Los ejemplos de genes de marcadores seleccionables adecuados incluyen, pero no están limitados a, los genes que codifican resistencia a cloranfenicol (Herrera Estrella, et al., (1983) *EMBO J.* 2: 987-991); estreptomycinina (Jones, et al., (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210: 86-91); espectinomycinina (Bretagne-Sagnard, et al., (1996) *Transgenic Res.* 5: 131-137); bleomicina (Hille, et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 7: 171-176); sulfonamida (Guerineau, et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 15: 127-136); bromoxinilo (Stalker, et al., (1988) *Science* 242: 419-423); glifosato (Shaw, et al., (1986) *Science* 233: 478-481); fosfinotricina (DeBlock, et al., *EMBO J.* (1987) 6: 2513-2518) y semejantes. Una opción para usar un gen selectivo es un ADN que codifica resistencia a glufosinato y en una realización puede ser la fosfinotricina acetil transferasa ("PAT"), gen de PAT optimizado de maíz o gen *bar* bajo el control de los promotores CaMV 35S o de ubiquitina. Los genes que confieren resistencia a bialafos. Véase, Gordon-Kamm, et al., *Plant Cell* (1990) 2: 603; Uchimiya, et al., (1993) *BioTechnology* 11: 835; White, et al., (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 1062; Spencer, et al., (1990) *Theor. Appl. Genet.* 79: 625-631; y Anzai, et al., (1989) *Mol. Gen. Gen.* 219: 492). Una versión del gen PAT es el gen PAT optimizado de maíz, descrito en la Patente U.S. Número 6.096.947.

Además, los marcadores que facilitan la identificación de una célula de planta que contiene el polinucleótido que codifica el marcador incluyen, por ejemplo, luciferasa (Giacomin, (1996) *Plant Sci.* 116: 59-72; Scikantha, (1996) *J. Bacteriol.* 178: 121), proteína verde fluorescente (Gerdes, (1996) *FEBS Lett.* 389: 44-47; Chalfie, et al., (1994) *Science* 263: 802) y otras variantes proteicas fluorescentes o β -glucuronidasa (Jefferson, (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387; Jefferson, et al., (1987) *EMBO J.* 6: 3901-3907; Jefferson, (1989) *Nature* 342(6251): 837-838); los genes de maíz que regulan la producción de pigmentos (Ludwig, et al., (1990) *Science* 247: 449; Grotewold, et al., (1991) *PNAS* 88: 4587-4591; Cocciolone, et al., (2001) *Plant J* 27(5): 467-478; Grotewold, et al., (1998) *Plant Cell* 10: 721-740); β -galactosidasa (Teeri, et al., (1989) *EMBO J.* 8: 343-350); luciferasa (Ow, et al., (1986) *Science* 234: 856-859); cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) (Lindsey y Jones, (1987) *Plant Mol. Biol.* 10: 43-52); y varios adicionales como se describe en la presente memoria o se conocen de otra forma en la técnica. Dichos marcadores también pueden usarse como moléculas informadoras. Muchas variaciones en los promotores, marcadores seleccionables y otros componentes de la construcción están disponibles para un experto en la técnica.

El término "planta" se usa ampliamente en la presente memoria para incluir a cualquier planta en cualquier estado del desarrollo, o a parte de una planta, incluyendo un esqueje de planta, una célula de planta, un cultivo de células de planta, un órgano de planta, una semilla de planta, y una plántula. Una célula de planta es la unidad estructural y fisiológica de la planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. Una célula de planta puede estar en la forma de una única célula aislada o agregado de células tales como un callo friable, o una célula cultivada, o puede ser parte de una unidad organizada superior, por ejemplo, una tejido de planta, órgano de planta o planta. Así, una célula de planta puede ser un protoplasto, una célula productora de gametos, o una célula o colección de células que pueden regenerar una planta completa. Como tal, una semilla, que comprende múltiples células de planta y que es capaz de regenerar una planta completa, se considera una célula de planta para los propósitos de esta descripción. Un tejido de planta u órgano de planta puede ser una semilla, protoplasto, callo, o cualesquiera otros grupos de células de planta que están organizados en una unidad estructural o funcional. Las partes particularmente útiles de una planta incluyen partes cosechables y partes útiles para la propagación de las plantas de la progenie. Una parte cosechable de una planta puede ser cualquier parte útil de una planta, por ejemplo, flores, polen, plántulas, tubérculos, hojas, tallos, fruto, semillas, raíces y semejantes. Una parte de una planta útil para la propagación incluye, por ejemplo, semillas, frutos, esquejes, plántulas, tubérculos, rizomas y semejantes.

Una planta transgénica puede regenerarse a partir de una célula de planta genéticamente modificada, es decir, una planta completa puede regenerarse a partir de una célula de planta; un grupo de células de planta; un protoplasto; una semilla; o una parte de una planta tal como una hoja, un cotiledón o un esqueje. La regeneración a partir de protoplastos varía entre las especies de plantas. Por ejemplo, una suspensión de protoplastos puede prepararse y, en determinadas especies, la formación del embrión puede inducirse a partir de la suspensión de protoplastos, al estado de maduración y germinación. El medio de cultivo contiene generalmente varios componentes necesarios para el crecimiento y regeneración, incluyendo, por ejemplo, hormonas tales como auxinas y citoquininas; y aminoácidos tales como ácido glutámico y prolina, dependiendo de la especie de planta particular. La regeneración eficaz dependerá, en parte, del medio, el genotipo y la historia del cultivo y es reproducible si estas variables se controlan.

La regeneración puede ocurrir a partir del callo, explantes, órganos de la planta o partes de la planta. La transformación puede realizarse en el contexto de la regeneración de órganos o parte de la planta. (véase *Meth. Enzymol.* Vol. 118; Klee, et al., (1987) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 467). Utilizando el método de la regeneración-transformación de discos de la hoja, por ejemplo, los discos se cultivan en medio selectivo, seguido de formación de brote en aproximadamente dos a cuatro semanas (véase, Horsch, *et al.*, *supra*, 1985). Los brotes que se desarrollan se escinden de los callos y se transplantan en medio selectivo inductor de raíces apropiado. Las plántulas con raíces se transplantan en tierra tan pronto como es posible después de la aparición de las raíces. Las plántulas pueden cambiarse de maceta según se requiera, hasta alcanzar la madurez. Ésta es la generación T0.

En los cultivos propagados por semillas, las plantas T0 maduras pueden auto-polinizarse. Las semillas resultantes pueden crecerse y las plantas de la progenie ensayarse para la presencia del transgén, frecuentemente por cribado de la expresión de un gen marcador unido. Estas plantas transgénicas representan la generación T1. Pueden producirse múltiples generaciones (T2, T3, etc.) para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene de manera estable y se hereda y las semillas pueden recogerse. De esta manera, la presente invención proporciona una semilla transformada (también referida como una "semilla transgénica") que tiene un polinucleótido de la invención, por ejemplo, un casete de expresión de la invención, incorporado de manera estable en su genoma. Los métodos para auto-polinización, selección y cultivo cruzado adicionales de las plantas que tienen las características deseables u otras características de interés incluyen los descritos en la presente memoria y otros muy conocidos para los cultivadores de plantas. La progenie, variantes y mutantes de las plantas regeneradas también se incluyen en el alcance de la invención, siempre que comprendan los polinucleótidos introducidos.

En varios aspectos de la presente invención, uno o más transgenes se introducen en las células. Cuando se usa en referencia a un transgén, el término "introducir" significa transferir la molécula de ácido nucleico exógena en una célula.

Una molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula de planta por una variedad de métodos. Por ejemplo, el transgén puede estar contenido en un vector, puede introducirse en una célula de planta usando un método de transferencia génica directa tal como electroporación o transformación mediada por microproyectiles o usando transformación mediada por *Agrobacterium*. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "transformada" se refiere a una célula de planta que contiene una molécula de ácido nucleico introducida exógenamente.

Una o más moléculas de ácido nucleico exógenas pueden introducirse en células de plantas usando cualquiera de los numerosos métodos muy conocidos y rutinarios para la transformación de plantas, incluyendo protocolos de transformación de plantas biológicas y físicos (véase, por ejemplo, Miki, et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants"; En *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick y Thompson, Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) páginas 67-88). Además, los vectores de expresión y los métodos de cultivo *in vitro* para la transformación de una célula o tejido de planta y la regeneración de plantas son rutinarios y muy conocidos (véase, por ejemplo, Gruber, et al., "Vectors for Plant Transformation"; Id. en las páginas 89-119).

Los métodos adecuados para transformar células de plantas incluyen microinyección, Crossway, et al., (1986) *Biotechniques* 4: 320-334; electroporación, Riggs, et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602-5606; transformación mediada por *Agrobacterium*, véase por ejemplo, Townsend, et al., Patente U.S. Número 5.563.055; transferencia génica directa, Paszkowski, et al., (1984) *EMBO J.* 3: 2717-2722; y aceleración de partículas balísticas, véase por ejemplo, Sanford, et al., Patente U.S. Número 4.945.050; Tomes, et al., (1995) en *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg y Phillips (Springer-Verlag, Berlín); y McCabe, et al., (1988) *Biotechnology* 6: 923-926. Véase, también, Weissinger, et al., (1988) *Annual Rev. Genet.* 22: 421-477; Sanford, et al., (1987) *Particulate Science and Technology* 5: 27-37 (cebolla); Christou, et al., (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-674 (soja); McCabe, et al., (1988) *BioTechnology* 6: 923-926 (soja); Datta, et al., (1990) *Biotechnology* 8: 736-740 (arroz); Klein, et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309 (maíz); Klein, et al., (1988) *Biotechnology* 6: 559-563 (maíz); Klein, et al., (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (maíz); Fromm, et al., (1990) *Biotechnology* 8: 833-839; Hooydaas-Van Slogteren, et al., (1984) *Nature (Londres)* 311: 763-764; Bytebier, et al., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5345-5349 (Liliaceae); De Wet, et al., (1985) en *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. G.P. Chapman, et al., (Longman, Nueva York), p. 197-209 (polen); Kaeppler, et al., (1990) *Plant Cell Reports* 9: 415-418; y Kaeppler, et al., (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84: 560-566 (transformación mediada por fibra); D. Halluin, et al., (1992) *Plant Cell* 4: 1495-1505 (electroporación); Li, et al., (1993) *Plant Cell Reports* 12: 250-255 y Christou, et al., (1995) *Annals of Botany* 75: 407-413 (arroz); Osjoda, et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750 (maíz a través de *Agrobacterium tumefaciens*).

La transformación mediada por *Agrobacterium* proporciona un método útil para introducir un transgén en las plantas (Horsch, et al., (1985) *Science* 227: 1229). *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo patógenas de plantas que transforman genéticamente las células de plantas. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta (véase, por ejemplo, Kado, (1991) *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 1; véase, también, Moloney, et al., (1989) *Plant Cell Reports* 8: 238; Patente U.S. Número 5.591.616; WO 99/47552; Weissbach y Weissbach, "Methods for Plant Molecular Biology" (Academic Press, NY 1988), sección VIII, páginas 421-463; Grierson y Corey, "Plant Molecular Biology" 2ª Ed. (Blackie, Londres 1988), Capítulos 7-9; véase, también, Horsch, et al., *supra*, 1985).

Respecto a *A. tumefaciens*, la forma de tipo salvaje contiene un plásmido Ti, que dirige la producción del crecimiento tumorigénico de agallas del tallo en las plantas huésped. La transferencia de la región T-ADN inductora de tumores del plásmido Ti al genoma de la planta requiere los genes de virulencia codificados por el plásmido Ti así como los extremos de T-ADN, que son un conjunto de repeticiones directas de ADN que delimitan la región que se va a transferir. Un vector basado en *Agrobacterium* es una forma modificada de un plásmido Ti, en el que las funciones inductoras de tumores se reemplazan por una secuencia de nucleótidos de interés que se quiere introducir en la planta huésped. Los métodos para usar la transformación mediada por *Agrobacterium* incluyen el cocultivo de *Agrobacterium* con protoplastos aislados cultivados; transformación de células o tejidos de la planta con *Agrobacterium*; y transformación de las semillas, ápices o meristemas con *Agrobacterium*. Además, en las plantas la transformación con *Agrobacterium* puede realizarse usando infiltración en vacío de una suspensión de células de *Agrobacterium* (Bechtold, et al., (1993) *C.R. Acad. Sci. París* 316: 1194).

La transformación mediada por *Agrobacterium* puede emplear vectores cointegrados o sistemas de vectores binarios, en los que los componentes del plásmido Ti se dividen entre un vector auxiliar, que reside permanentemente en el huésped *Agrobacterium* y porta los genes de virulencia, y un vector lanzadera, que contiene el gen de interés unido por secuencias T-ADN. Los vectores binarios son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, De Framond, (1983) *BioTechnology* 1: 262; Hoekema, et al., (1983) *Nature* 303: 179) y están disponibles comercialmente (Clontech; Palo Alto CA). Para la transformación, *Agrobacterium* puede cocultivarse, por ejemplo, con células de planta o tejido dañado tal como tejido de la hoja, explantes de raíz, hipocótilos, cotiledones, partes del tallo o tubérculos (véase, por ejemplo, Glick y Thompson, "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (Boca Raton FL, CRC Press 1993)). Las células dañadas en el tejido de la planta que se han infectado con *Agrobacterium* pueden desarrollar órganos *de novo* cuando

se cultivan bajo las condiciones apropiadas; los brotes transgénicos resultantes dan lugar eventualmente plantas transgénicas que contienen el polinucleótido introducido.

La transformación mediada por *Agrobacterium* se ha usado para producir una variedad de plantas transgénicas, incluyendo, por ejemplo, plantas crucíferas transgénicas tales como *Arabidopsis*, mostaza, semilla de colza y lino; plantas leguminosas transgénicas tales como alfalfa, guisante, soja, trébol y trébol blanco; y plantas solanáceas transgénicas tales como berenjena, petunia, patata, tabaco y tomate (véase, por ejemplo, Wang, et al., "Transformation of Plants and Soil Microorganisms" (Cambridge, University Press 1995)). Además, la transformación mediada por *Agrobacterium* puede usarse para introducir una molécula de ácido nucleico exógena en manzano, álamo temblón, belladona, grosella negra, zanahoria, apio, algodón, pepino, uva, rábano, lechuga, corregüela, melón, nim, álamo, fresa, remolacha, girasol, nogal, espárrago, arroz, trigo, sorgo, cebada, maíz y otras plantas (véase, por ejemplo, Glick y Thompson, *supra*, 1993; Hiei, et al., (1994) Plant J. 6: 271-282; Shimamoto, (1995) Science 270: 1771-1773).

Las cepas de *A. tumefaciens* y los vectores adecuados así como la transformación de *Agrobacterium* y los medios de crecimiento y de selección apropiados son muy conocidos en la técnica (GV3101, pMK90RK), Koncz, (1986) Mol. Gen. Genet. 204: 383-396; (C58C1, pGV3850kan), Deblaere, (1985) Nucl. Acid Res. 13: 4777; Bevan, (1984) Nucleic Acid Res. 12: 8711; Koncz, (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8467-8471; Koncz, (1992) Plant Mol. Biol. 20: 963-976; Koncz, Specialized vectors for gene tagging and expression studies. En: Plant Molecular Biology Manual Vol. 2, Gelvin y Schilperoort (Eds.), Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publ. (1994), 1-22; Patente Europea A-1 20 516; Hoekema: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985), Capítulo V; Fraley, Crit. Rev. Plant Sci., 4: 1-46; An, (1985) EMBO J. 4: 277-287).

Los métodos de transferencia génica directa también pueden usarse para introducir el transgén (o transgenes) deseado en las células, incluyendo células de planta que son refractarias a la transformación mediada por *Agrobacterium* (véase, por ejemplo, Hiei, et al., (1994) Plant J. 6: 271-282; Patente U.S. Número 5.591.616). Dichos métodos incluyen la transferencia génica directa (véase, la Patente Europea A 164 575), inyección, electroporación, métodos biolísticos tales como bombardeo de partículas, transformación mediada por polen, transformación mediada por ARN de virus de plantas, transformación mediada por liposomas, transformación usando embriones inmaduros dañados o degradados con enzimas o callo embriogénico dañado o degradado con enzimas y semejantes. Los métodos de transferencia génica directa incluyen métodos de transformación mediados por microproyectiles (biolísticos), en los que el transgén se porta en la superficie de microproyectiles que miden 1 a 4 mm. Un vector, particularmente un vector de expresión que contiene el transgén o transgenes de interés, se introduce en los tejidos de la planta con un dispositivo biolístico que acelera los microproyectiles hasta velocidades de 300 a 600 m/s, suficiente para penetrar las paredes celulares y membranas de la planta (véase, por ejemplo, Sanford, et al., (1987) Part. Sci. Technol. 5: 27; Sanford, (1988) Trends Biotech. 6: 299, Klein, et al., (1988) BioTechnology 6: 559-563; Klein, et al., (1992) BioTechnology 10: 268). En el maíz, por ejemplo, varios tejidos diana pueden bombardearse con microproyectiles recubiertos con ADN con el fin de producir plantas transgénicas, incluyendo, por ejemplo, callos (Tipo I o Tipo II), embriones inmaduros y tejido de meristemo.

Otros métodos para la administración física de un transgén en plantas utiliza la sonicación de las células diana (Zhang, et al., (1991) BioTechnology 9: 996); liposomas o fusión de esferoplastos (Deshayes, et al., (1985) EMBO J: 4: 2731; Christou, et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84: 3962); precipitación con CaCl_2 o incubación con alcohol polivinílico o poli-L-ornitina (Hain, et al., (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 61; Draper, et al., (1982) Plant Cell Physiol. 23: 451); y electroporación de protoplastos y células y tejidos completos (Donn, et al., (1990) En "Abstracts of VIIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture" IAPTC, A2-38, p. 53; D'Halluin, et al., (1992) Plant Cell 4: 1495-1505; Spencer, et al., (1994) Plant Mol. Biol. 24: 51-61).

Un método de transferencia génica directa tal como electroporación puede ser particularmente útil para introducir moléculas de ácido nucleico exógenas en una célula tal como una célula de planta. Por ejemplo, los protoplastos de planta pueden electroporarse en presencia de una molécula de ácido nucleico recombinante, que puede estar en un vector (Fromm, et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 5824). Los impulsos eléctricos de alta fuerza de campo permeabilizan reversiblemente las membranas permitiendo la introducción del ácido nucleico. Los protoplastos de planta electroporados vuelven a formar la pared celular, se dividen y forman un callo de planta. La microinyección puede realizarse como se describe en Potrykus y Spangenberg (eds.), Gene Transfer To Plants, Springer Verlag, Berlín, NY (1995). Una célula de planta transformada que contiene la molécula de ácido nucleico recombinante introducida puede identificarse debido a la presencia de un marcador seleccionable incluido en la construcción.

Como se ha mencionado anteriormente, la transformación mediada por microproyectiles también proporciona un método útil para introducir moléculas de ácido nucleico exógenas en una célula de planta (Klein, et al., (1987) Nature 327: 70-73). Este método utiliza microproyectiles tales como oro o tungsteno, que están recubiertos con la molécula de ácido nucleico deseada por precipitación con cloruro de calcio, espermidina o polietileno glicol. Las partículas del microproyectil se aceleran a alta velocidad en un tejido de planta usando un dispositivo tal como la pistola de partículas BIOLISTIC PD-1000 (BioRad; Hercules CA). La administración mediada por microproyectiles ("bombardeo de partículas") es

especialmente útil para transformar células de planta que son difíciles de transformar o regenerar usando otros métodos. Los métodos para la transformación usando métodos biolísticos son muy conocidos (Wan, (1984) *Plant Physiol.* 104: 37-48; Vasil, (1993) *BioTechnology* 11: 1553-1558; Christou, (1996) *Trends in Plant Science* 1: 423-431). La transformación mediada por microproyectiles se ha usado, por ejemplo, para generar una variedad de especies de plantas transgénicas, incluyendo algodón, tabaco, maíz, trigo, avena, cebada, sorgo, arroz, álamo híbrido y papaya (véase, Glick y Thompson, *supra*, 1993; Duan, et al., (1996) *Nature Biotech.* 14: 494-498; Shimamoto, (1994) *Curr. Opin. Biotech.* 5: 158-162).

Un sistema de transformación regeneración rápido para la producción de plantas transgénicas tal como un sistema que produce trigo transgénico en dos a tres meses (véase, la Patente Europea Número EP 0709462A2) también puede ser útil para producir una planta transgénica según un método de la invención, permitiendo así una identificación más rápida de funciones génicas. La transformación de la mayor parte de las plantas dicotiledóneas es posible con los métodos descritos anteriormente. La transformación de plantas monocotiledóneas también pueden transformarse usando, por ejemplo, métodos biolísticos como se ha descrito anteriormente, transformación de protoplastos, electroporación de células parcialmente permeabilizadas introducción de ADN usando fibras de vidrio, transformación mediada por *Agrobacterium* y semejantes.

La transformación de plástidos también puede usarse para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula de planta (Patentes U.S. Números 5.451.513, 5.545.817 y 5.545.818; WO 95/16783; McBride, et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91: 7301-7305). La transformación de cloroplastos implica la introducción de regiones de ADN de plástido clonadas flanqueando una secuencia de nucleótidos deseada, por ejemplo, un marcador seleccionable junto con el polinucleótido de interés, en un tejido diana adecuado, usando, por ejemplo, un método de transformación biolístico o de protoplastos (por ejemplo, transformación mediada por cloruro de calcio o PEG). Las regiones flanqueantes de una a 1,5 kb ("secuencias de direccionamiento") facilitan la recombinación homóloga con el genoma del plástido, y permiten el reemplazo o modificación de regiones específicas del plástido. Usando este método, mutaciones puntuales en el ARNr 16S y los genes rps 12 del cloroplasto, que confieren resistencia a espectinomicina y estreptomycinina y que pueden utilizarse como marcadores seleccionables para la transformación (Svab, et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 87: 8526-8530; Staub y Maliga, (1992) *Plant Cell* 4: 39-45), resultó en transformantes homoplásmicos estables, a una frecuencia de aproximadamente uno por 100 bombardeos de las hojas diana. La presencia de sitios de clonación entre estos marcadores permitió la creación de un vector de direccionamiento de plástido para la introducción de genes extraños (Staub y Maliga, (1993) *EMBO J.* 12: 601-606). Se obtienen incrementos sustanciales en la frecuencia de la transformación por el reemplazo del ARNr recesivo o los genes de la r-proteína de resistencia a antibiótico por un marcador seleccionable dominante, el gen bacteriano *aadA* que codifica la enzima de detoxificación de espetinomicina aminoglicosidasa-3'-adeniltransferasa (Svab y Maliga, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90: 913-917). Generalmente, se requieren aproximadamente 15 a 20 ciclos de división celular después de la transformación para alcanzar un estado homoplásmico. La expresión de los plástidos, en los que los genes se insertan por recombinación homóloga en todos los varios miles de copias del genoma circular del plástido presentes en cada célula de la planta, se aprovecha de la ventaja del enorme número de copias sobre los genes expresados en el núcleo para permitir niveles de expresión que pueden superar fácilmente el 10% de la proteína soluble total de la planta.

Las células que se han transformado pueden convertirse en plantas según los medios convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick, et al., (1986) *Plant Cell Reports* 5: 81-84. Estas plantas pueden crecerse y polinizarse con la misma cepa transformada o diferentes cepas y las plantas resultantes que tienen la expresión de la característica fenotípica deseada pueden identificarse. Dos o más generaciones pueden crecerse para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene de manera estable y se hereda.

Una "planta objeto" o "célula de planta objeto" es una en la que la alteración genética, tal como transformación, se ha efectuado respecto a un gen de interés, o es una planta o célula de planta que desciende de una planta o célula de planta así alterada y que comprende la alteración. Un "control" o "planta control" o "célula de planta control" proporciona un punto de referencia para medir cambios en la planta o célula de planta objeto.

Una planta control o célula de planta control puede comprender, por ejemplo: (a) una planta o célula de planta de tipo salvaje, es decir, del mismo genotipo que el material de partida para la alteración genética que resultó en la planta objeto o célula de planta objeto; (b) una planta o célula de planta del mismo genotipo que el material de partida pero que se ha transformado con una construcción nula (es decir, con una construcción que no tiene ningún efecto conocido en el rasgo de interés, tal como una construcción que comprende un gen marcador); (c) una planta o célula de planta que es un segregante no transformado entre la progenie de una planta objeto o célula de planta objeto; (d) una planta o célula de planta genéticamente idéntica a la planta objeto o célula de planta objeto pero que no está expuesta a las condiciones o estímulos que inducirían la expresión del gen de interés; o (e) la planta objeto o célula de planta objeto en sí misma, bajo condiciones en las que el gen de interés no se expresa.

En determinadas especies, tal como maíz, las plantas control y referencia pueden representar dos híbridos, en los que el primer híbrido se produce a partir de dos líneas parentales endogámicas y el segundo híbrido se produce a partir de las

mismas dos líneas parentales endogámicas excepto que una de las líneas parentales endogámicas contiene una construcción de ADN recombinante. El rendimiento del segundo híbrido se mediría típicamente respecto al primer híbrido.

5 Además, cuando una planta que comprende una construcción de ADN recombinante se evalúa o mide respecto a una planta control que no comprende el ADN recombinante pero que de otra manera tiene un contenido genético comparable a la planta, la planta control y referencia pueden compartir al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad de secuencia del material genético nuclear. Existen muchas técnicas basadas en laboratorio disponibles para el análisis, comparación y caracterización de contenidos genéticos de plantas; entre éstas están la electroforesis de isozimas, Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), ADN Polimórficos Amplificados Aleatoriamente (RAPD), Reacción en Cadena de la Polimerasa Cebada Arbitrariamente (AP-PCR), Amplificación de Huellas de ADN (DAF), Amplificación de Regiones de Secuencia Caracterizada (SCAR), Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) y Secuencias Simples Repetidas (SSR) que también se refieren como microsátélites.

10 Las plantas adecuadas para los propósitos de la presente invención pueden ser monocotiledóneas o dicotiledóneas e incluyen, pero no están limitadas a, maíz, trigo, cebada, heno, batata, judías, guisante, achicoria, lechuga, col, coliflor, brócoli, nabo, rábano, espinaca, espárrago, cebolla, ajo, pimienta, puerro, calabacín amarillo, calabaza, cáñamo, calabacín, manzana, pera, membrillo, melón, ciruela, cereza, melocotón, nectarina, albaricoque, fresa, uva, frambuesa, grosella negra, piña, aguacate, papaya, mango, plátano, soja, tomate, sorgo, caña de azúcar, remolacha, girasol, semilla de colza, trébol, tabaco, zanahoria, algodón, alfalfa, arroz, patata, berenjena, pepino, *Arabidopsis thaliana* y plantas leñosas tales como coníferas y árboles caducos. Así, una planta transgénica o célula de planta genéticamente modificada de la invención puede ser una angiosperma o gimnosperma.

15 Las angiospermas se dividen en dos clases amplias tomando como base el número de cotiledones, que son cotiledones que generalmente almacenan o absorben alimento; una angiosperma monocotiledónea tiene un único cotiledón, y una angiosperma dicotiledónea tiene dos cotiledones. Las angiospermas producen una variedad de productos útiles incluyendo materiales tales como madera, caucho y papel; fibras tales como algodón y lino; hierbas y medicinas tales como quinina y vinblastina; flores ornamentales tales como rosas y, cuando se incluyen en el alcance de la presente invención, orquídeas; y productos alimenticios tales como granos, aceites, frutos y hortalizas. Las angiospermas engloban una variedad de plantas con flor, incluyendo, por ejemplo, plantas de cereales, plantas leguminosas, plantas oleaginosas, árboles de madera dura, plantas que presentan frutos y flores ornamentales, clases generales que no son necesariamente excluyentes. Las plantas de cereales, que producen un grano comestible, incluyen, por ejemplo, maíz, 20 arroz, trigo, cebada, avena, heno, dátilo, hierba de guinea y sorgo. Las plantas leguminosas incluyen miembros de la familia del guisante (*Fabaceae*) y producen un fruto característico conocido como legumbre. Los ejemplos de plantas leguminosas incluyen, por ejemplo, soja, guisante, garbanzo, marenchal, habas, alubia riñón, alubia lima, lenteja, caupí, alubia seca y cacahuete así como alfalfa, cuernecillo, trébol y esparceta. Las plantas oleaginosas, que tienen semillas que son útiles como una fuente de aceite, incluyen soja, girasol, semilla de soja (canola) y semilla de algodón. Las angiospermas también incluyen árboles de madera dura, que son plantas leñosas perennes que generalmente tienen un único tallo (tronco). Los ejemplos de dichos árboles incluyen aliso, fresno, álamo temblón, tilo (tilo), haya, abedul, cerezo, chopo, olmo, eucalipto, nogal americano, algarrobo, arce, roble, caqui, álamo, sicómoro, nogal, sequoia y sauce. Los árboles son útiles, por ejemplo, como una fuente de pulpa, papel, material estructural y combustible.

25 Las angiospermas producen semillas contenidas en un ovario maduro, madurado. Un fruto de angiosperma puede ser adecuado para el consumo humano o animal o para la recolección de semillas para propagar la especie. Por ejemplo, los lúpulos son un miembro de la familia de las moreras, que se valoran por su sabor en el licor de malta. Las angiospermas que presentan frutos también incluyen los árboles vid, naranjo, limonero, pomelo, aguacate, dátil, melocotonero, cerezo, olivo, ciruelo, cocotero, manzano y peral y las plantas grosella negra, arándano, frambuesa, fresa, 30 piña, tomate, pepino y berenjena. Una flor ornamental es una angiosperma cultivada por su flor decorativa. Los ejemplos de flores ornamentales comercialmente importantes incluyen rosa, lila, tulipán y crisantemo, boca de dragón, camelia, clavel y petunia y pueden incluir orquídeas. Se reconocerá que la presente invención también puede llevarse a la práctica usando gimnospermas, que no producen semillas en un fruto.

35 La invención contempla el uso de promotores que proporcionan expresión preferida de tejido, incluyendo los promotores que se expresan preferentemente en el tejido de gametos, masculinos o femeninos, de la planta. La invención no requiere que ningún promotor preferido de tejido de gameto particular se use en el proceso, y puede emplearse cualquiera de muchos de dichos promotores conocidos para un experto en la técnica. Como ejemplo, pero no limitación, uno de dichos promotores es el promotor 5126, que dirige preferentemente la expresión del gen al que está unido en el tejido masculino de las plantas, como se describe en las Patentes U.S. Números 5.837.851 y 5.689.051. Otros ejemplos incluyen el promotor MS45 descrito en la Patente U.S. Número 6.037.523; el promotor SF3 descrito en la Patente U.S. Número 6.452.069; el promotor BS92-7 o BS7 descrito en WO 02/063021; el promotor SBMu200 descrito en WO 02/26789; un elemento regulador SGB6 descrito en la Patente U.S. Número 5.470.359, y TA39 (Koltunow, et al., (1990)

"Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development". Plant Cell 2: 1201-1224; Goldberg, et al., (1993) Anther development basic principles and practical applications. Plant Cell 5: 1217-1229; y Patente U.S. Número 6.399.856. Véase, también, Nadeau, et al., (1996) Plant Cell 8(2): 213-39; y Lu, et al., (1996) Plant Cell 8(12): 2155-68.

5 Los métodos y construcciones de la presente invención pueden usarse para la transformación de cualquier especie de planta, incluyendo, pero no limitado a, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ejemplos de especies de plantas de interés incluyen, pero no están limitados a, maíz (*Zea mays*), *Brassica* sp. (por ejemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente aquellas especies de *Brassica* útiles como fuentes de aceite de semilla, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (10 (*Oryza sativa*), heno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), millet (por ejemplo, mijo perla) (*Pennisetum glaucum*), mijo común (*Panicum miliaceum*), mijo cola de zorra (*Setaria italica*), mijo dedo (*Eleusine coracana*), girasol (*Helianthus annuus*), alazor (*Carthamus tinctoris*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuets (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* sp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), árboles cítricos (*Citrus* sp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camelia sinensis*), plátano (*Musa* 15 sp.), aguacate (*Persea americana*), ficus (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendro (*Prunus amygdalus*), remolachas (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum* sp.), avenas, cebada, hortalizas, ornamentales, hierbas y coníferas.

20 Las hortalizas incluyen tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (por ejemplo, *Lactuca sativa*), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), alubia lima (*Phaseolus limensis*), guisantes (*Lathyrus* sp.) y miembros del género *Cucumis* tales como pepino (*C. sativus*), cantalupo (*C. cantalupensis*) y melón (*C. melo*). Las ornamentales incluyen azalea (*Rhododendron* sp.), hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* sp.), tulipanes (*Tulipa* sp.), narcisos (*Narcissus* sp.), petunias (*Petunia hybrida*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), flor de pascua (*Euphorbia pulcherrima*) y crisantemo.

25 En realizaciones específicas, las plantas de la presente invención son plantas cultivadas (por ejemplo, maíz (maíz), alfalfa, girasol, *Brassica*, soja, algodón, alazor, cacahuete, sorgo, trigo, mijo, tabaco, etc.). En determinadas realizaciones, las plantas de maíz y de soja son óptimas y en determinadas realizaciones las plantas se maíz son óptimas.

30 Otras plantas de interés incluyen plantas de grano que proporcionan semillas de interés, plantas con semillas oleaginosas y plantas leguminosas. Las semillas de interés incluyen semillas de grano, tales como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, heno, etc. Las plantas con semillas oleaginosas incluyen algodón, soja, alazor, girasol, *Brassica*, maíz, alfalfa, palma, coco, etc. Las plantas leguminosas incluyen judías y guisantes. Las judías incluyen guar, judía de algarrobo, fenogreco, soja, judías de jardín, caupí, frijol mungo, haba lima, haba, lentejas, garbanzo, etc.

35 El promotor P67 mostrado en SEQ ID NO: 1 tiene una longitud de 1.112 nucleótidos. Este promotor se aisló de un clon genómico correspondiente a una secuencia EST de maíz. La secuencia mostró una homología limitada con la pectina metilesterasa putativa.

40 La especificidad de polen de la expresión de P67 se ha confirmado por RT-PCR y análisis por transferencia Northern de muestras de ARN de diferentes tejidos incluyendo hoja, raíz, granos de polen de la antera/maduros, panoja en el estado de vacuola, espiguilla, mazorca, chala, seda y embrión. Los resultados indican un alto nivel de especificidad para la expresión en polen en desarrollo, particularmente en el estado uninucleado medio.

45 El promotor P95 mostrado en SEQ ID NO: 2 tiene una longitud de 1.092 nucleótidos. Este promotor se aisló de un clon genómico correspondiente a una secuencia EST de maíz. La secuencia mostró una homología limitada con la L-ascorbato oxidasa putativa.

La especificidad de polen de la expresión de P95 se ha confirmado por RT-PCR y análisis por transferencia Northern de muestras de ARN de diferentes tejidos incluyendo hoja, raíz, granos de polen de la antera/maduros, panoja en el estado de vacuola, espiguilla, mazorca, chala, seda y embrión. Los resultados indican un alto nivel de especificidad para la expresión en polen en desarrollo, particularmente en el estado uninucleado medio.

50 Se conocen muchas secuencias de nucleótidos que inhiben la formación o función o dispersión del polen, y cualquiera de las secuencias que logran esta inhibición servirá. Una discusión de los genes que pueden influir en el desarrollo o función apropiada se incluye en la Patente U.S. Número 6.399.856 e incluye genes dominantes negativos tales como genes de citotoxina, genes de metilasa y genes de inhibición del crecimiento. Los genes dominantes negativos incluyen el gen de la cadena A de la toxina de la difteria (Czako y An (1991) Plant Physiol. 95: 687-692); mutantes de la división del ciclo celular tales como CDC en maíz (Colasanti, et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3377-3381); el gen WT (Farmer, et al., (1994) Hum. Mol. Genet. 3: 723-728); y P68 (Chen, et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 315-319). Un

gen adecuado también puede codificar una proteína implicada en la inhibición del desarrollo del pistilo, interacciones polen estigma, crecimiento o fertilización del tubo polínico, o una combinación de éstos. Además, los genes que interfieren con la acumulación normal del almidón en el polen o influyen en el equilibrio osmótico en el polen también pueden ser adecuados. Éstos pueden incluir, por ejemplo, el gen de la alfa-amilasa de maíz, gen de la beta-amilasa de maíz, enzimas desramificantes tales como Sugary1 y pululanasa, glucanasa y SacB.

En una realización ilustrativa, se usa el gen de la metilasa DAM, cuyo producto de expresión cataliza la metilación de residuos de adenina en el ADN de la planta. Las adeninas metiladas no influirán en la viabilidad celular y se encontrarán sólo en los tejidos en los que se expresa el gen de la metilasa DAM, porque dichos residuos metilados no se encuentran endógenamente en el ADN de la planta. Los ejemplos de los denominados genes "citotóxicos" se discuten *supra* y pueden incluir, pero no están limitados a, gen de pectato liasa pelE, de *Erwinia chrysanthemi* (Kenn, et al., (1986) J. Bacteriol. 168: 595); gen de la cadena A de la toxina de la difteria (Greenfield, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6853, Palmiter, et al., (1987) Cell 50: 435); gen T-urf13 de los genomas mitocondriales cms-T de maíz (Braun, et al., (1990) Plant Cell 2: 153; Dewey, et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5374); gen de la toxina CytA de *Bacillus thuringiensis Israeliensis* que causa la disrupción de la membrana celular (McLean, et al., (1987) J. Bacteriol. 169: 1017, Patente U.S. Número 4.918.006); ADNasas, ARNasas (Patente U.S. Número 5.633.441); proteasas o genes que expresan ARN antisentido.

Esta invención tiene utilidad para una variedad de genes, no limitados a los que influyen en la capacidad reproductora. Las categorías generales de genes de interés incluyen, por ejemplo, los genes implicados en información, tales como dedos de cinc, los implicados en comunicación, tales como quinasas y los implicados en mantenimiento, tales como proteínas de choque térmico. Las categorías más específicas de transgenes, por ejemplo, incluyen genes que codifican rasgos importantes para agronomía, arquitectura de la planta, programa temporal del desarrollo e inicio del crecimiento reproductor, resistencia a insectos, resistencia a enfermedades, resistencia a herbicidas, esterilidad, características del grano y productos comerciales. Los genes de interés incluyen, generalmente, los implicados en el metabolismo del aceite, almidón, carbohidratos o nutrientes así como los que influyen en el tamaño de la semilla, carga de sacarosa y semejantes. Los rasgos agrónomicamente importantes tales como contenido en aceite, almidón y proteínas pueden alterarse genéticamente además de usar métodos de cultivo tradicionales. Las modificaciones incluyen contenido incrementado de ácido oleico, aceites saturados e insaturados, niveles incrementados de lisina y azufre, proporcionar aminoácidos esenciales y también modificación del almidón. Las modificaciones de la proteína hordotionina se describen en las Patentes U.S. Números 5.703.049, 5.885.801, 5.885.802 y 5.990.389. Otro ejemplo es proteína de la semilla rica en lisina y/o azufre codificada por la albúmina 2S de soja descrita en la Patente U.S. Número 5.850.016 y el inhibidor de quimi tripsina de cebada, descrito en Williamson, et al., (1987) Eur. J. Biochem. 165: 99-106. Otros genes importantes codifican factores de crecimiento y factores de transcripción.

Los rasgos agrónomicos pueden mejorarse alterando la expresión de genes que: influyen en el crecimiento y desarrollo, especialmente durante estrés medioambiental. Éstos incluyen, por ejemplo, genes que codifican enzimas de la biosíntesis de citoquininas, tales como isopentenil transferasa; genes que codifican enzimas catabólicas de citoquininas, tales como citoquinin oxidasa; genes que codifican polipéptidos implicados en la regulación del ciclo celular, tales como CiclinaD o cdc25; genes que codifican receptores o sensores de citoquininas, tales como CRE1, CK11 y CK12, histidina fosfo-transmisora o reguladores de la respuesta de citoquininas.

Los ejemplos adicionales incluyen resistencia a enfermedades o herbicidas (por ejemplo, genes de detoxificación de fumonisina (Patente U.S. No. 5.792.931); genes de avirulencia y resistencia a enfermedades (Jones et al. (1994) Science 266: 789; Martin et al. (1993) Science 262: 1432; Mindrinos et al. (1994) Cell 78: 1089); mutantes de acetolactato sintasa (ALS) que dan lugar a resistencia a herbicidas tales como las mutaciones S4 y/o Hra; inhibidores de la glutamina sintasa tales como fosfotricina o basta (por ejemplo, el gen bar); y resistencia a glifosato (gen EPSPS)); fijación del carbono, tales como fosfoenolpiruvato carboxilasa (PepC) o ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Activasa Rubisco, RCA); rasgos deseables para el procesamiento o productos procesados tales como aceite alto (por ejemplo, Patente U.S. No. 6.232.529); aceites modificados (por ejemplo, genes de ácido graso desaturasa (Patente U.S. No. 5.952.544; WO 94/11516)); almidones modificados (por ejemplo, ADPG pirofosforilasas (AGPasa), almidón sintasas (SS), enzimas ramificantes del almidón (SBE) y enzimas desramificantes del almidón (SDBE)); y polímeros o bioplásticos (por ejemplo, Patente U.S. No. 5.602.321; beta-cetotiolasa, polihidroxibutirato sintasa y acetoacetil-CoA reductasa (Schubert et al. (1988) J. Bacteriol. 170: 5837-5847) facilitan la expresión de polihidroxialcanoatos (PHA)). Los métodos de la presente invención también podrían combinarse con métodos para tecnología de transformación, tales como regulación del ciclo celular o direccionamiento de genes (por ejemplo, WO 99/61619, WO 00/17364 y WO 99/25821).

Los genes de resistencia a insectos pueden codificar resistencia a plagas que tienen un gran impacto negativo en el rendimiento tales como gusano de la raíz, gusano cortador, Barrenador Europeo del Maíz y semejantes. Dichos genes incluyen, por ejemplo: genes de la endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, Patentes U.S. Números 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; Geiser, et al., (1986) Gene 48: 109; lectinas, Van Damme, et al., (1994) Plant Mol. Biol. 24: 825; y semejantes.

Los genes que codifican rasgos de resistencia a enfermedades incluyen: genes de destoxificación, tales como frente a fumonisina (WO 9606175 presentada el 7 de junio, 1995); genes de avirulencia (*avr*) y de resistencia a enfermedades (*R*), Jones, et al., (1994) *Science* 266: 789; Martin, et al., (1993) *Science* 262: 1432; Mindrinos, et al., (1994) *Cell* 78: 1089; y semejantes.

5 Los rasgos comerciales también pueden estar codificados por un gen o genes que podrían alterarse o incrementarse, por ejemplo, almidón para la producción de papel, textiles y etanol, o proporcionar expresión de proteínas con otros usos comerciales. Otro uso comercial importante de las plantas transformadas es la producción de polímeros y bioplásticos tales como los descritos en la Patente U.S. Número 5.602.321 presentada el 11 de febrero, 1997. Los genes tales como B-Cetotiolasa, PHBasa (polihidroxibutirato sintasa) y acetoacetyl-CoA reductasa (véase, Schubert, et al., (1988) *J. Bacteriol* 170(12): 5837-5847) facilitan la expresión de polihidroxialcanoatos (PHA).

10 Los productos exógenos incluyen enzimas y productos de planta así como aquellos de otras fuentes incluyendo procariontes y otros eucariotes. Dichos productos incluyen enzimas, cofactores, hormonas y semejantes. El nivel de proteínas en la semilla, particularmente proteínas de semilla modificadas que tienen una distribución mejorada de aminoácidos para mejorar el valor nutritivo de la semilla puede incrementarse. Esto se consigue por la expresión de dichas proteínas que tienen un contenido aumentado de aminoácidos.

15 Los casetes de expresión de la invención, que comprenden un promotor y una secuencia de nucleótidos aislada de interés, también pueden incluir, en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos aislada de interés, una región de terminación de la transcripción y la traducción funcional en plantas. La región de terminación puede ser nativa con la secuencia de nucleótidos promotora del casete, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés o puede obtenerse de otra fuente.

20 Otras regiones de terminación convenientes están disponibles a partir del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de la octopina sintasa y la nopalina sintasa. Véase, también, Guerineau, et al., (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262: 141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64: 671-674; Sanfacon, et al., (1991) *Genes Dev.* 5: 141-149; Mogen, et al., (1990) *Plant Cell* 2: 1261-1272; Munroe, et al., (1990) *Gene* 91: 151-158; Ballas, et al., (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7891-7903; Joshi, et al., (1987) *Nucleic Acid Res.* 15: 9627-9639.

25 Los casetes de expresión pueden contener adicionalmente secuencias líder 5'. Dichas secuencias líder pueden actuar para aumentar la traducción. Los líderes de traducción son conocidos en la técnica e incluyen: líderes de picornavirus, por ejemplo: líder EMCV (región no codificadora 5' de encefalomiocarditis), Elroy-Stein, et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6126-6130; líderes de potivirus, por ejemplo, líder TEV (Virus del Grabado del Tabaco), Allison, et al., (1986); líder MDMV (Virus del Mosaico de Maíz Enano), *Virology* 154: 9-20; proteína de unión de la cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP), Macejak, et al., (1991) *Nature* 353: 90-94; líder no traducido del ARNm de la proteína de la cubierta del virus del mosaico de alfalfa (AMV ARN 4), Jobling, et al., (1987) *Nature* 325: 622-625; líder del virus del mosaico del tabaco (TMV), Gallie, et al., (1989) *Molecular Biology of RNA*, páginas 237-256; y líder del virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) Lommel, et al., (1991) *Virology* 81: 382-385. Véase, también, Della-Cioppa, et al., (1987) *Plant Physiology* 84: 965-968. El casete también puede contener secuencias que aumentan la traducción y/o estabilidad del ARNm tales como intrones.

30 En aquellos casos en los que es deseable tener el producto expresado de la secuencia de nucleótidos aislada dirigido a un orgánulo particular, particularmente el plástido, amiloplasto o el retículo endoplásmico, o secretado en la superficie celular o extracelularmente, el casete de expresión puede comprender además una secuencia codificadora para un péptido de tránsito. Dichos péptidos de tránsito son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a: el péptido de tránsito para la proteína transportadora de acilo, la subunidad pequeña de RUBISCO, EPSP sintasa de plantas y semejantes.

35 En la preparación del casete de expresión, los distintos fragmentos de ADN pueden manipularse, de manera que se proporcionen las secuencias de ADN en la orientación apropiada y, según sea apropiado, en el marco de lectura apropiado. Con este fin, pueden emplearse adaptadores o conectores para unir los fragmentos de ADN o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, eliminación de ADN superfluo, eliminación de sitios de restricción o semejantes. Para este propósito, pueden estar implicadas mutagénesis *in vitro*, reparación de cebadores, digestiones de restricción, hibridación y resustituciones tales como transiciones y transversiones.

40 Pueden producirse grandes cantidades de los ácidos nucleicos de la presente invención por replicación en una célula huésped adecuada. Los fragmentos de ácido nucleico naturales o sintéticos que codifican un fragmento deseado se incorporarán en construcciones de ácido nucleico recombinante, habitualmente construcciones de ADN, capaces de introducirse en y replicarse en una célula procarionte o eucariota. Habitualmente, las construcciones de ácido nucleico serán adecuadas para replicación en un huésped unicelular, tal como levadura o bacteria, pero también pueden

pretenderse para la introducción en (con o sin la integración en el genoma) líneas celulares cultivadas de mamíferos o plantas o de otros eucariotas. La purificación de los ácidos nucleicos producidos por los métodos de la presente invención se describe, por ejemplo, en Sambrook, et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) o Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley and Sons, NY (1992).

Las construcciones de ácido nucleico preparadas para la introducción en un huésped procarionta o eucariota pueden comprender un sistema de replicación reconocido por el huésped, incluyendo el fragmento de ácido nucleico pretendido que codifica la proteína deseada, y también incluirá preferiblemente secuencias reguladoras del inicio de la transcripción y traducción unidas operativamente al segmento que codifica la proteína. Los vectores de expresión pueden incluir, por ejemplo, un origen de replicación o secuencia de replicación autónoma (ARS) y secuencia de control de la expresión, un promotor, un potenciador y sitios necesarios para procesar la información, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación, secuencias terminadoras de la transcripción y secuencias estabilizadoras del ARNm. También pueden incluirse señales de secreción cuando sea apropiado. Dichos vectores pueden prepararse por medio de técnicas recombinantes estándar muy conocidas en la técnica y que se discuten, por ejemplo, en Sambrook, et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) o Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley and Sons, NY (1992).

Los vectores para la introducción de genes tanto para recombinación como mantenimiento extracromosómico se conocen en la técnica y puede usarse cualquier vector adecuado. Los métodos para introducir ADN en células tales como electroporación, co-precipitación con fosfato de calcio y transducción viral son conocidos en la técnica y la elección del método está dentro de la competencia de un experto en la técnica (Robbins, Ed., *Gene Therapy Protocols*, Human Press, NJ (1997)).

Los sistemas de transferencia génica conocidos en la técnica pueden ser útiles en la práctica de la presente invención. Éstos incluyen métodos de transferencia virales y no virales. Se han usado varios virus como vectores de transferencia génica, incluyendo polioma, es decir, SV40 (Madzak, et al., (1992) *J. Gen. Virol.*, 73: 1533-1536), adenovirus (Berkner, et al., (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 39-61; Berkner, et al., (1988) *Bio Techniques*, 6: 616-629; Gorziglia, et al., (1992) *J. Virol.*, 66: 4407-4412; Quantin, et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2581-2584; Rosenfeld, et al., (1992) *Cell*, 68: 143-155; Wilkinson, et al., (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 2233-2239; Stratford-Perricaudet, et al., (1990) *Hum. Gene Ther.* 1: 241-256), virus vaccinia (Mackett, et al., (1992) *Biotechnology* 24: 495-499), virus adeno-asociado (Muzyczka, (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158: 91-123; Ohi, et al., (1990) *Gene* 89: 279-282), virus del herpes incluyendo HSV y EBV (Margolskee, (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158: 67-90; Johnson, et al., (1992) *J. Virol.*, 66: 2952-2965; Fink, et al., (1992) *Hum. Gene Ther.* 3: 11-19; Breakfield, et al., (1987) *Mol. Neurobiol.* 1: 337-371; Fresse, et al., (1990) *Biochem. Pharmacol.* 40: 2189-2199) y retrovirus de origen aviar (Brandyopadhyay, et al., (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4: 749-754; Petropoulos, et al., (1992) *J. Virol.* 66: 3391-3397), murino (Miller, (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158: 1-24; Miller, et al., (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 431-437; Sorge, et al., (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4: 1730-1737; Mann, et al., (1985) *J. Virol.* 54: 401-407) y humano (Page, et al., (1990) *J. Virol.* 64: 5370-5276; Buchschalcher, et al., (1992) *J. Virol.* 66: 2731-2739).

Los métodos de transferencia génica no virales conocidos en la técnica incluyen técnicas químicas tales como coprecipitación con fosfato de calcio (Graham, et al., (1973) *Virology* 52: 456-467; Pellicer, et al., (1980) *Science* 209: 1414-1422), técnicas mecánicas, por ejemplo microinyección (Anderson, et al., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5399-5403; Gordon, et al., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7380-7384; Brinster, et al., (1981) *Cell* 27: 223-231; Constantini, et al., (1981) *Nature* 294: 92-94), transferencia mediada por fusión de membranas mediante liposomas (Felgner, et al., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7417; Wang, et al., (1989) *Biochemistry*, 28: 9508-9514; Kaneda, et al., (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 12126-12129; Stewart, et al., (1992) *Hum. Gene Ther.* 3: 267-275; Nabel, et al., (1990) *Science* 249: 1285-1288; Lim, et al., (1992) *Circulation* 83: 2007-2011) y captación de ADN directa y transferencia de ADN mediada por receptor (Wolff, et al., (1990) *Science* 247: 1465-1468; Wu, et al., (1991) *BioTechniques* 11: 474-485; Zenke, et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3655-3659; Wu, et al., (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 16985-16987; Wolff, et al., (1991) *BioTechniques* 11: 474-485; Wagner, et al., (1990); Wagner, et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4255-4259; Cotton, et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4033-4037; Curiel, et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8850-8854; Curiel, et al., (1991) *Hum. Gene Ther.* 3: 147-154).

Un experto en la técnica aprecia fácilmente que los métodos descritos en la presente memoria son aplicables a otras especies no ejemplificadas específicamente, incluyendo tanto plantas como otros organismos no humanos. Se pretende que los ejemplos siguientes ilustren pero no limiten la invención.

Ejemplo (Referencia) 1

La expresión del ARN en horquilla de promotores afecta a la fertilidad de las plantas

Este ejemplo demuestra que la fertilidad o potencial de fertilidad de las plantas puede alterarse por la expresión de moléculas de ARN en horquilla (ARNhp) específicas para los promotores de genes que codifican proteínas implicadas en las rutas de fertilidad masculina.

- 5 Las construcciones de ARNhp de promotor se generaron uniendo un promotor de ubiquitina a una repetición invertida del promotor deseado, incluyendo un segmento de promotor NOS entre las secuencias repetidas invertidas. La expresión de cada construcción generó un ARNhp específico para uno de los promotores siguientes: MS45, 5126, BS7, SB200 y PG47. Las moléculas de ácido nucleico y los métodos para preparar las construcciones y transformar maíz fueron como se ha descrito previamente (Cigan, et al., (2001) Sex Plant Reprod. 14: 135-142). Se analizó la progenie (generación T1) de plantas transformadas (T0).
- 10 De los 32 eventos de transformación que comprenden ARNhp específico para el promotor del gen MS45, 29 produjeron plantas T0 que eran androestériles.
- De los 32 eventos de transformación que comprenden ARNhp específico para el promotor del gen 5126, 29 produjeron plantas T0 que eran androestériles.
- 15 De los 32 eventos de transformación que comprenden ARNhp específico para el promotor del gen BS7, 23 produjeron plantas T0 que produjeron una pequeña cantidad de polen no viable (fenotipo "rompedor") o eran androfértiles pero produjeron sólo una pequeña cantidad de polen viable (fenotipo "portador").
- De los 31 eventos de transformación que comprenden ARNhp específico para el promotor del gen SB200, 13 produjeron plantas T0 del fenotipo rompedor o portador.
- 20 De los 24 eventos de transformación que comprenden ARNhp específico para el promotor del gen PG47 unido a una construcción para resistencia a herbicidas, 15 revelaron ausencia de transmisión de la resistencia a herbicidas a la plántula T1 cuando se usa polen de los transformantes primarios. Esto es consistente con la expresión post-meiótica esperada de PG47.
- 25 El ARN de antera de plantas que expresan los diferentes ARNhp se analizó por transferencia northern. Para cada diana, se analizaron seis eventos independientes en la generación T1 para determinar si la expresión del ARNhp reducía los niveles de ARN en el estado estacionario de los genes diana. Las anteras se organizaron en la liberación de tétrada al estado uninucleado temprano de desarrollo de microsporas. El ARN poli A+ se aisló, se separó por electroforesis, se transfirió a membranas y se hibridó secuencialmente con sondas específicas para MS45, 5126, BS7, SB200, NOS y actina (control de la carga de ARN). No se detectaron transcritos de MS45, 5126 o BS7 en las plantas que expresan ARNhp específico para estos promotores endógenos. Sólo se observó una pequeña reducción del ARN de SB200 en las plantas que expresan ARNhp de SB200.
- 30 0092También se realizaron análisis de inmunotransferencia de proteínas de antera esencialmente como se ha descrito previamente (Cigan, et al., (2001) Sex Plant Reprod. 14: 135-142). Para cada diana, se analizaron seis eventos independientes en la generación T1 para determinar si la expresión del ARNhp del promotor reducía los niveles en el estado estacionario de las proteínas de los genes diana. Las anteras se organizaron como anteriormente, se molieron en tampón Laemelli, se separaron por electroforesis y se hicieron reaccionar secuencialmente con anticuerpos específicos para la proteína MS45, BS7, SB200 ó 5126. De manera similar a los resultados de las transferencias northern, no se detectaron las proteínas MS45, 5126 o BS7 en las plantas que expresan ARNhp específico para estos promotores endógenos y sólo se observó una pequeña reducción de la proteína SB200 para los eventos que comprenden hpSB200.
- 35 Estos resultados demuestran que la expresión del ARNhp de promotores puede suprimir selectivamente la expresión de genes endógenos en las células de plantas. Además, los resultados demuestran que la supresión de diferentes genes implicados en la esterilidad masculina de las plantas puede afectar de forma diversa el fenotipo de la planta, incluyendo el grado de fertilidad masculina.
- 40

Ejemplo (Referencia) 2

La expresión del producto génico MS45 exógeno restaura la fertilidad

- 45 Este ejemplo demuestra que las plantas convertidas en androestériles por la expresión de una construcción en horquilla de un promotor MS45 pueden recuperar la fertilidad por la expresión de una construcción génica de MS45 exógena.

Se prepararon construcciones que contienen la secuencia codificadora de MS45 unida operativamente a un promotor heterólogo de ubiquitina (UBI), 5126, SB200 o BS7; estas construcciones se introdujeron en células de planta ms45ms45. Las plantas regeneradas y su progenie fueron fértiles, lo que demuestra que el promotor nativo de MS45

puede reemplazarse por un promotor constitutivo o preferido de antera para conferir un fenotipo androfértil a maíz mutante ms45. (Véase, también, Cigan, et al., (2001) Sex Plant Reprod. 14: 135-142).

5 Además, las plantas que contienen la construcción UBI:MS45 ó 5126:MS45 se cruzaron con plantas que eran androestériles debido a la expresión de un ARNhp del promotor del gen MS45. La progenie se ensayó por PCR para la presencia de la construcción hp y UBI-MS45 ó 5126:MS45. Se realizaron análisis de hibridación de ARN y se valoraron los fenotipos de fertilidad.

10 El análisis por transferencia northern del ARN obtenido de las hojas de las plantas de la progenie reveló que MS45 se expresaba a partir del promotor de ubiquitina en 7 de 12 progenie que contiene hp obtenida del cruce UBI-MS45. Además, la expresión de MS45 a partir del promotor UBI se correlacionaba con la fertilidad observada en las plantas de la progenie. Estos resultados indican que MS45 se expresa a partir del promotor de ubiquitina constitutivo y que la expresión constitutiva del producto génico MS45 confiere fertilidad masculina a las plantas de la progenie.

15 Además, se analizó el ARN de las anteras de estas plantas de maíz MS45hp que contienen 5126:MS45, BS7:MS45 o UBI:MS45. Las anteras se organizaron en la liberación de tétrada al estado uninucleado temprano del desarrollo de microsporas y el ARN poli A+ se recogió, se sometió a electroforesis y se hibridó secuencialmente con sondas para MS45, SB200 y BS7. MS45 se expresó en las anteras de las plantas de la progenie con androfértiles ya sea dirigido por el promotor UBI constitutivo o por los promotores específicos de antera 5126 o BS7, afectando probablemente el momento de recogida de las anteras la intensidad de la señal. No se observó ARN de MS45 en las plantas androestériles que contienen sólo horquilla. Estos resultados demuestran que la supresión de la expresión de MS45 debida al ARNhp de MS45 puede superarse por la expresión de MS45 a partir de un promotor heterólogo que dirige la expresión al menos en las células de la antera.

25 El promotor que expresa el gen MS45 puede obtenerse de una fuente distinta del maíz, y puede ser, por ejemplo, cualquier promotor de planta capaz de transcribir MS45 de manera que la expresión de la unidad de transcripción convierte a las plantas en androfértiles. Por ejemplo, los homólogos de arroz y Arabidopsis de los genes MS45, 5126, BS7 y MS26 de maíz se han aislado e identificado. Véase la Figura 1 para las coordenadas cromosómicas que proporcionan información de secuencia para MS45, MS26 y 5126 en arroz y Arabidopsis y BS7 en Arabidopsis. Para BS7 en arroz, véase SEQ ID NO: 3. Globalmente, existe una similitud significativa en la secuencia codificadora entre las especies, con conservación de las regiones intrónicas. De forma importante, los promotores correspondientes de arroz y maíz son aproximadamente 50 a 60% idénticos globalmente, con regiones hasta 85% idénticas, lo que sugiere que estos promotores pueden funcionar suficientemente en el tapete de maíz para transcribir el gen MS45.

30 Para ensayar esto, cada uno de los promotores MS45 de arroz, 5126 de arroz, BS7 de arroz, MS26 de arroz y MS45 de Arabidopsis, 5126 de Arabidopsis y BS7 de Arabidopsis se fusionó con la región codificadora de MS45 de maíz y se ensayó para la capacidad de la construcción de conferir fertilidad cuando se transforma en mutantes ms45ms45. Usando este sistema de ensayo, se observó una alta frecuencia de plantas androfértiles para las cuatro construcciones.

35 En determinados aspectos, es ventajoso usar promotores que no son de maíz para expresar el gen MS45. Por ejemplo, cuando los ARNhp de promotor de la misma especie reducen la función del gen diana de manera que la planta no es viable o no es reproductora, puede usarse un promotor de una especie diferente para expresar transcripcionalmente la función génica complementaria (por ejemplo, MS45), superando así este problema potencial. Además, puede generarse una construcción de ARNhp para dirigir el promotor que no es de maíz usado en el casete de expresión MS45, para suprimir la expresión génica MS45 como un medio para reducir o suprimir la función y convertir a la planta en androestéril. Por ejemplo, una planta homocigota recesiva ms45 puede transformarse con un homólogo del promotor MS45 de arroz que dirige la expresión del gen MS45 (MS45r::MS45), convirtiendo a la planta en androfértil. Para suprimir la expresión de este casete MS45r::MS45, puede generarse una segunda planta de maíz que es heterocigota para la mutación MS45 de maíz y que expresa un ARNhp de promotor de MS45r. Como no hay secuencias diana promotoras endógenas de MS45 de arroz equivalentes en esta planta de maíz, esta planta será androfértil. Esta segunda planta puede cruzarse con la planta homocigota ms45 que contiene la construcción MS45r::MS45 y la progenie homocigota recesiva ms45 cribarse para las construcciones de ARNhp MS45r::MS45 y MS45r. En esta situación, la función génica MS45r::MS45 se suprime por la presencia y expresión del ARNhp de MS45r, lo que resulta en una planta androestéril.

50 El uso de dichas construcciones se ve apoyado por el descubrimiento de que la expresión del hp de promotor de 5126 de arroz en maíz no resulta en plantas androestériles. Esto contrasta con los resultados obtenidos usando un hp de promotor de 5126 de maíz (véase, el Ejemplo 1) y sugiere que la expresión de la horquilla del promotor de 5126 de arroz es incapaz de suprimir el gen 5126 endógeno de maíz.

Ejemplo (Referencia) 3

El ARN en horquilla específico de promotores suprime la transmisión de resistencia a herbicida mediada por transgén

5 Este ejemplo demuestra que el polen de plantas hemicigotas para una construcción en horquilla UBI:PG47 no es viable según se determina por la ausencia de transmisión de resistencia a herbicida a las fertilizaciones cruzadas T1 cuando un gen de resistencia a herbicida se une a la construcción en horquilla de PG47.

10 Un ARNhp específico para el promotor del gen PG47 que comprende una repetición invertida del promotor del gen PG47 dirigida por un promotor de ubiquitina (UBI:PG47hp), unido a una construcción 35S:PAT, se introdujo en células de planta. El polen de las plantas que expresan el transgén, que representa 24 eventos de transformación de bajas copias o copia única, se llevó a mazorcas de plantas de maíz de tipo salvaje. El asentamiento de la semilla en las mazorcas fue muy bueno y comparable con el observado cuando se usó el polen de tipo salvaje. Para cada evento, se plantaron 32 semillas en la tierra y las plántulas se pulverizaron 5 días después de la germinación con herbicida 2X LIBERTY™ para detectar la transmisión de UBI:PG47hp unido a 35S:PAT.

15 Se esperaba que si el ARNhp específico de PG47 funcionaba en la división post-meiótica de las microsporas, la viabilidad sería normal y el 50% del polen portaría el transgén, proporcionando resistencia a herbicida al 50% de la progenie. Sin embargo, si se requiere la función de PG47 para la viabilidad del polen y la construcción en horquilla puede suprimir la expresión del producto génico PG47, entonces el 50% de los granos de polen no sería viable; todo el polen viable carecería del transgén y sería incapaz de transmitir la resistencia a herbicida. Las construcciones UBI:PG47hp no funcionales serían detectables por la presencia de plantas resistentes a herbicida.

20 Quince de 24 eventos ensayados fueron sensibles a herbicida. Este resultado demuestra que las construcciones UBI:PG47hp suprimen la expresión génica de PG47 en el polen, convirtiendo al 50% del polen en no viable y evitando la transmisión de la resistencia a herbicida unida operativamente a la construcción de supresión.

Ejemplo (Referencia) 4

25 **Las plantas que contienen múltiples ARN en horquilla específicos de promotores suprimen múltiples promotores diana**

30 Las plantas que contienen 5126HP (es decir, un transgén que codifica un ARNhp de promotor 5126) se usan como receptores de polen para polen de plantas que expresan BS7HP. En las plantas que contienen tanto 5126HP como BS7HP, la expresión endógena de 5126 y BS7 está suprimida, dando lugar a un fenotipo de esterilidad más fuerte que el observado con cualquiera de las construcciones sola. Se seleccionan las plantas que contienen bien 5126HP o BS7HP o ambos y progresan a madurez, y se determinan los fenotipos de fertilidad de estas plantas resultantes.

35 Alternativamente o además de cruzar como un medio para combinar construcciones en horquilla, una de dichas construcciones, por ejemplo 5126HP, puede ponerse bajo el control transcripcional de un promotor inducible. En ausencia de inducción, estas plantas que contienen BS7HP son capaces de producir suficiente polen para auto-polinizarse. Sin embargo, después de la inducción de 5126HP, estas plantas son androestériles y pueden usarse como hembras durante la producción de híbridos. Este proceso depende de la expresión combinada de las construcciones en horquilla (HP) para convertir a una planta en infértil, mientras que la expresión de sólo uno de los HP no confiere esterilidad.

40 En determinadas realizaciones, la expresión de ambos ARNhp puede ponerse bajo el control transcripcional de un único promotor. Por ejemplo, la región promotora de 5126 puede yuxtaponerse con la región promotora de BS7 y ambas se ponen bajo el control transcripcional de un único promotor de ubiquitina u otro promotor constitutivo, preferido de desarrollo o tejido, lo que resulta en la expresión de un ARN que contiene una horquilla híbrida 5126 y BS7 que dirige la supresión de los dos genes endógenos 5126 y BS7. Cualquier combinación y número de varios promotores dirigidos a múltiples y diferentes promotores puede usarse en el esquema. Por ejemplo, un promotor que regula los genes de altura de la planta y un promotor importante para un proceso reproductor pueden combinarse, lo que resulta en plantas
45 estériles que tienen poca estatura.

Ejemplo (Referencia) 5

Mantenimiento endogámico y producción de híbridos de plantas que contienen ARN en horquilla específicos de promotores que suprimen promotores diana y construcciones de complementación

50 Este ejemplo demuestra cómo una planta endogámica que contiene dos construcciones, una construcción de ARN en horquilla (ARNhp) dominante específica para un promotor y un gen MS45 expresado a partir de un promotor, tal como un

promotor específico de tejido o constitutivo, puede mantenerse y usarse en la producción de hembras androestériles para la producción de híbridos.

5 Las plantas endogámicas A1 y A2 son ambas homocigotas recesivas ms45ms45. La fertilidad se restaura en las plantas endogámicas A1 por la introducción de un transgén que expresa la región codificadora de MS45 unida operativamente al promotor de 5126. Las plantas endogámicas A1 también contienen una construcción que expresa BS7HP. Estas plantas pueden auto-polinizarse y la línea A1, homocigota para los insertos del transgén, se mantiene independientemente de A2 endogámica. En las plantas endogámicas A2, la fertilidad se restaura por la expresión de la región codificadora de MS45 unida operativamente al promotor de BS7. Las plantas endogámicas A2 también contienen una construcción que expresa 5126HP. Estas plantas pueden auto-polinizarse y la línea A2, homocigota para los insertos del transgén, se mantiene independientemente de las plantas endogámicas A1.

10 En algunas realizaciones comprendidas por este ejemplo, se usan los promotores de los ortólogos de arroz (*Oryza sativa*) de los genes de maíz 5126, BS7 y/o MS45. Véase la Tabla 1 para ejemplos. Si no se indica especie, se asume maíz.

Tabla 1.

	Planta A1 (ms45ms45)	Planta A2 (ms45ms45)
Construcción de restauración	arroz5126::MS45	arrozBS7::MS45
Construcción en horquilla	UBI::arrozBS7pIR	UBI::arroz5126pIR
O		
Construcción de restauración	arroz5126::MS45	arrozMS45::MS45
Construcción en horquilla	UBI::arrozMS45pIR	UBI::arroz5126pIR

15 Para generar semillas para endogamias femeninas para la producción de híbridos, A1 endogámicas (que contienen insertos del transgén homocigotos) se despanojaron y fertilizaron con polen de A2 endogámicas (que contienen insertos del transgén homocigoto). La semilla que resulta de este cruce se planta; todas las plantas de la progenie son androestériles debido a la presencia de los alelos ms45 homocigotos y los pIR que suprimen la construcción MS45 correspondiente (por ejemplo arrozMS45pIR suprime arrozMS45::MS45 y arroz5126pIR suprime arroz5126::MS45).
 20 Véase la Figura 2. Estas plantas se usan como hembras en la producción de híbridos y se polinizan con plantas homocigotas para el gen MS45 de tipo salvaje, lo que resulta en semilla híbrida F1. Todas las plantas derivadas de esta semilla son heterocigotas para el gen MS45 y, por lo tanto, son androfértiles.

Este ejemplo demuestra que las plantas que contienen tanto construcciones dominantes de supresión como de restauración pueden mantenerse y usarse en una estrategia de producción de semillas híbridas para generar endogamias femeninas estériles y plantas híbridas fértiles.

Ejemplo (Referencia) 6

Utilidad de plantas que contienen ARN en horquilla específicos de promotores que suprimen promotores diana específicos de polen y construcciones de complementación MS45 para la producción de híbridos y mantenimiento endogámico

30 Este ejemplo demuestra cómo un método que comprende el uso de dos construcciones, una construcción dominante de ARN en horquilla (ARNhp) específica para un promotor específico de polen y un transgén de restauración, permite la propagación de una planta que tiene un rasgo reproductor homocigoto recesivo sin perder la condición homocigota recesiva en la progenie resultante, para uso en la producción de plantas estériles para la producción de híbridos. Esto se consigue introduciendo en una planta al menos una construcción de transgén de restauración, unida operativamente a una primera secuencia de nucleótidos que comprende una copia funcional de un gen que complementa el rasgo
 35 fenotípico mutante producido por la condición homocigota recesiva con una segunda secuencia de nucleótidos funcional que interfiere con la formación, función o dispersión de los gametos masculinos de la planta. Esta construcción se mantiene en el estado hemocigoto y una planta que contiene dicha construcción se refiere como un mantenedor. La interferencia con la formación, función o dispersión del gameto masculino puede conseguirse uniendo las secuencias que interfieren con la formación, función o dispersión del gameto masculino con un promotor preferido de tejido de gameto. Como el transgén está en el estado hemocigoto, sólo la mitad de los granos de polen producidos contienen la construcción del transgén de restauración y ninguno de éstos es viable debido a la acción del segundo gen unido que evita la formación de polen viable. Por lo tanto, cuando la planta mantenedora que contiene dicha construcción unida se usa como donante de polen para fertilizar la planta homocigota recesiva, los únicos gametos masculinos viables

proporcionados a la planta homocigota recesiva son aquellos que contienen el alelo recesivo, pero que no contienen ningún componente de la construcción de transgén. La progenie que resulta de dicho cruce sexual no es transgénica respecto a esta construcción de transgén.

5 Aunque ningún polen viable producido por el mantenedor contiene la construcción de transgén de restauración, el 50% de los óvulos (el gameto femenino) contendrá la construcción de transgén de restauración. Por lo tanto, el mantenedor puede propagarse por auto-fertilización, segregándose la construcción de transgén de restauración de manera que estará contenida en el 50% de las semillas de un mantenedor auto-fertilizado. Mediante la unión de la construcción de transgén de restauración con un marcador seleccionable, el 50% de las semillas que contienen el transgén puede aislarse para propagar la población del mantenedor, que permanece homocigota para el gen recesivo y hemocigota para la construcción de transgén de restauración. En este escenario, puede mantenerse una única endogamia.

10 La A1 endogámica es homocigota recesiva para el gen de fertilidad ms45. Las plantas A1 endogámicas contienen una construcción en la que la fertilidad masculina se restaura por la expresión de la región codificadora de MS45 usando un promotor específico de tejido, por ejemplo el promotor de MS45 nativo. Las plantas A1 endogámicas también contienen una construcción en horquilla dirigida para suprimir un promotor expresado en el polen, en este ejemplo, una construcción que expresa PG47HP unida operativamente a la construcción de restauración MS45; y un marcador seleccionable o cribable, por ejemplo, un marcador que confiere resistencia a herbicidas y/o una construcción que funcione como un marcador visual o detectable para el cribado de las plantas y/o semillas. Estas plantas son fértiles y pueden auto-polinizarse y mantenerse. La semilla en estas plantas se segregará 50:50 para el transgén porque sólo es viable el polen no transgénico y capaz de efectuar la fertilización de un óvulo, el 50% de los cuales contiene la construcción.

15 Para generar semillas para endogamias femeninas para la producción de híbridos, en una fila, sólo se mantienen las plantas no transgénicas de A1 endogámicas; estas plantas son homocigotas recesivas ms45 y androestériles. En una fila adyacente, se crecen tanto las plantas transgénicas como no transgénicas de A1 endogámicas. La fertilidad en esta fila se segrega uno a uno (fértil a estéril); las plantas fértiles se usan para polinizar las plantas estériles en la fila adyacente. La semilla de este cruce es no transgénica para el restaurador unido operativamente, el ARNhp y las construcciones de marcador cribable, y toda la progenie son androestériles debido a la presencia del alelo homocigoto ms45. Estas plantas se usan como hembras en la producción de híbridos y se polinizan con plantas homocigotas para el gen MS45 de tipo salvaje lo que resulta en semilla híbrida F1. Todas las plantas derivadas de esta semilla son heterocigotas para el gen MS45 y, por lo tanto, androfértiles.

20 Este ejemplo demuestra que las plantas que contienen una construcción en horquilla de supresión de polen dominante y una construcción de restauración de la fertilidad pueden mantenerse como endogámicas y usarse en una estrategia de producción de semillas híbridas para generar endogamias femeninas estériles y plantas híbridas fértiles.

Ejemplo (Referencia) 7

Combinaciones

35 Dos o más componentes de la construcción descritos en la presente memoria pueden combinarse de varias maneras para crear sistemas para controlar la expresión génica. Dichas combinaciones pueden hacerse uniendo dichos componentes en un único vector, usando múltiples vectores en transformaciones simultáneas o secuenciales y/o cultivando las plantas que comprenden uno o más componentes. Los componentes posibles se describen a continuación en la Tabla 2. La Tabla 3 proporciona representaciones de combinaciones ilustrativas, pero no exhaustivas, útiles para controlar la fertilidad masculina.

40 Por ejemplo, los componentes pueden incluir promotores o regiones codificadoras distintas de las listadas, y el orden de los componentes en las construcciones puede ser diferente de los mostrados. Además, una construcción podría comprender combinaciones individuales de promotor/secuencia codificadora o un promotor que dirige la transcripción de múltiples componentes de secuencia codificadora. Como un ejemplo de lo último, una construcción podría comprender un promotor constitutivo que dirija la transcripción de una secuencia codificadora de MS45 así como un polinucleótido que codifica un producto génico implicado en la producción o regulación de un marcador cribable (por ejemplo, pigmento) para crear un producto de fusión. Esto permitiría el cribado de transformantes usando cualquier tejido de la planta, mientras que la expresión de la secuencia codificadora de MS45 resulta en fertilidad masculina.

45 En cualquiera de las construcciones, podrían incluirse uno o más componentes en horquilla de promotor, por ejemplo, en un intrón de cualquiera de los genes codificados, o en una región no codificadora 5' ó 3' o como una extensión inicial o terminal. Una horquilla puede estar dirigida a un único promotor, o a dos o más promotores, en un único ARN transcrito. Las configuraciones en horquilla de promotor de polen, y/o los polinucleótidos que codifican polipéptidos que alteran el polen, pueden servir para evitar la transmisión del transgén a través de los gametos masculinos.

Los promotores preferidos de polen o específicos de polen ("Poll-P") incluyen, por ejemplo, PG47, P95 (comienzo entre los estados uninucleados medio y tardío; véase, SEQ ID NO: 2) y P67 (perfil similar a P95, más altamente expresado en el estado uninucleado medio; véase, SEQ ID NO: 1).

5 Los promotores específicos de tapete ("Tisp-P") o preferidos de tapete ("Tap-P") incluyen, por ejemplo, MS45 (Patente U.S. Número 6.037.523); 5126 (Patente U.S. Número 5.837.851); Bs7 (WO 02/063021); y SB200 (WO 02/26789).

Otros promotores específicos de tejido o preferidos de tejido útiles en la invención incluyen, por ejemplo, Br2 (Science 302(5642): 71-1, 2003), CesA8 y LPT2 (Plant J 6: 849-860, 1994).

Los promotores constitutivos ("ConstP") incluyen, por ejemplo, el promotor CaMV 35S (WO 91/04036 y WO 84/02913); y el promotor de ubiquitina de maíz.

10 Los genes de fertilidad masculina ("MF") útiles en la invención incluyen, por ejemplo, MS45 (Cigan, et al., (2001) Sex. Plant Repro. 14: 135-142; Patente U.S. Número 5.478.369) y MS26 (Publicación de Patente U.S. 20030182689, presentada el 19 de diciembre, 2006 como U.S. 7.151.205).

15 Los genes de ablación de polen ("Citotox") útiles en la invención incluyen DAM (GenBank J01600, Nucleic Acids Res. 11: 837-851 (1983); alfa-amilasa (GenBank L25805, Plant Physiol. 105(2): 759-760 (1994)); D8 (Physiol. Plant. 100(3): 550-560 (1997)); SacB (Plant Physiol. 110(2): 355-363 (1996)), lipasas y ribonucleasas. A este respecto, se contempla un único polipéptido, o una fusión de dos o más polipéptidos para generar un producto de fusión. Los sistemas de marcadores seleccionables útiles en la práctica de la invención incluyen, por ejemplo, resistencia a herbicida conferida por PAT o MoPAT.

20 Los sistemas de marcadores cribables útiles en la práctica de la invención, por ejemplo para identificar semillas transgénicas entre la progenie de una línea mantenedora auto-polinizable, incluyen GFP (Gerdes (1996) FEBS Lett. 389: 44-47; Chalfie, et al., (1994) Science 263: 802), RFP, DSred (Dietrich, et al., (2002) Biotechniques 2(2): 286-293), KN1 (Smith, et al., (1995) Dev. Genetics 16(4): 344-348), CRC, P, (Bruce, et al., (2000) Plant Cell 12(1): 65-79 y Sugary1 (Rahman, et al., (1998) Plant Physiol. 117: 425-435; James, et al., (1995) Plant Cell 7: 417-429; U18908).

25 Las configuraciones en horquilla pueden comprender, por ejemplo, PG47hp, P95hp o P67 hp. Una horquilla puede estar dirigida a un único promotor o puede estar dirigida a dos o más promotores mediante un único ARN transcrito. La horquilla podría estar localizada en cualquier posición apropiada en la construcción, tal como en un intrón de cualquiera de los genes codificados o en regiones no codificadoras 5' ó 3'.

Tabla 2

Símbolo	Descripción	Ejemplo
Poll-P	Promotor de Polen	PG47, P95, P67
Tisp-P	Promotor Especifico de Tejido	Br2, CesA8, LTP2
Tap-P	Promotor de Tapete	Ms45, 5126, Bs7, Sb200
ConstP	Promotor Constitutivo	35S, Ubi
MF	Gen de Fertilidad	Ms45, Ms26
Citotox	Gen Citotóxico	DAM, Alfa-Amilasa, D8, SacB
Herb R	Resistencia a Herbicida	PAT, MoPAT
Cribado	Marcador Seleccionable	RFP, GFP, KN1, CRC, Su1
HP	Horquilla	PG47hp, P95hp, P67hp

Tabla 3

Descripción	Componentes
Citotox único + Selección	Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/ConstP:Herb R
Citotox único + Selección + Cribado	Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/ConstP:HerbR/Tisp-P:Cribado

Descripción	Componentes
Citotox Doble + Selección	Poll-P:Citotox/Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/ConstP:Herb R
Citotox único + Cribado	Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/Tisp-P:Cribado
Citotox doble + Cribado	Poll-P:Citotox/Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/Tisp-P:Cribado
Horquilla + Citotox único + Selección	ConstP:HP/Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/ConstP:Herb R
Horquilla + Citotox único + Cribado	ConstP:HP/Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/Tisp-P:Cribado
Horquilla + Selección	ConstP:HP/Tap-P:MF/ConstP:Herb R
Horquilla + Cribado	ConstP:HP/Tap-P:MF/Tisp-P:Cribado
Horquilla/Fusión de fertilidad masculina + Cribado	ConstP:HP + MF/Tisp-P:Cribado
Horquilla/Fusión de fertilidad masculina + Selección	ConstP:HP + MF/ConstP:Herb R
Horquilla con Citotox Único Incluido/Cribado	Poll-P:Citotox/Tap-P:MF/ConstP:HP Incluida en Cribado
Fertilidad Constitutiva/Cribado con Horquilla Incluida	ConstP:(MF + Cribado) HP Incluida Tap-P:Citotox/ConstP:(MF + Cribado) HP Incluida

Ejemplo (Referencia) 8

Selección basada en marcadores visuales

5 Los experimentos descritos a continuación se diseñaron para preguntar si el gen de maíz *p1*, cuando se expresa a partir de varios promotores no *p1*, podría usarse como un marcador visual para las semillas que portan un transgén unido. Como parte del diseño experimental, la coloración de las semillas de la planta transformada, así como la coloración de las semillas generadas por la polinización cruzada de polen de la planta transformada, se ensayó para examinar la herencia materna y paterna de la expresión del gen *p1*.

10 El gen *p1* de maíz es un activador transcripcional relacionado con Myb que se ha demostrado que regula los genes *a1* y *c2* para producir 3-desoxi flavonoides, tales como C-glicosil flavonas, 3-desoxiantocianinas, flavan-4-oles y flobafenos (Grotewold, et al., (1991) PNAS 88: 4587-4591). La síntesis de estos compuestos y compuestos relacionados resulta en la coloración de los órganos florales incluyendo pericarpo, mazorca, sedas, chalas y glumas de panoja (Cocciolone, et al., (2001) Plant J 27(5): 467-478). Típicamente, la expresión de este gen es materna; esto es, la polinización cruzada del gen *p1* no confiere coloración a las partes reproductoras hasta que crece la siguiente generación a partir de la semilla. Como se ha mostrado que el gen *p1* confiere color a los tejidos no reproductores del maíz por la expresión

15 constitutiva en células BMS (Dulce Negro Mejicano) (Grotewold, et al., (1998) PI Cell), se investigó la expresión del gen *p1* poniendo el gen *p1* bajo el control transcripcional de los promotores preferidos de semilla de maíz END2 y LPT2. Los promotores constitutivos de Actina de arroz y Ubiquitina de maíz también se usaron para regular transcripcionalmente el gen *p1*. Estos vectores ensayarán si la expresión del gen *p1* conferirá diferencias en el color suficientes para usarse como un marcador visual.

20 Los vectores siguientes se introdujeron en el maíz por transformación con Agrobacterium y se ensayaron para el color de las semillas de las plantas transformadas y de mazorcas polinizadas con polen de las plantas transformadas.

23030	End2:P1-UbimoPAT
23066	Actina:P1-UBImoPat
23069	LPT2:P1-UBImoPat
23528	End2:P1-35SPAT
23535	LPT2:P1-35S:PAT
23537	UBI:P1-35S:PAT

30 La transformación con PHP23030 y PHP23069 produjo plantas que demuestran semillas coloreadas segregadas tanto en mazorcas de las plantas primarias transformadas como en mazorcas polinizadas con polen de estas plantas transformadas. Para PHP23030, 12 de los 14 eventos independientes usados para la polinización cruzada demostraron granos de color marrón que se segregan entre los granos amarillos a una proporción de segregación de cerca de 1:1. Las mazorcas en los transformantes primarios se polinizaron con polen de plantas no transformadas y los granos de

estas mazorcas también segregaron granos marrones:amarillos a una proporción de cerca de 1:1. Se observaron resultados idénticos con tres de los cuatro eventos generados con PHP23069.

5 Las semillas marrones y amarillas de 5 eventos de única copia de PHP23030 se separaron y plantaron para ensayar la germinación de la semilla marrón y la co-segregación del marcador de resistencia a herbicida ligado, 35SPAT, con los granos coloreados. En este pequeño ensayo, la mayoría (>95%) de las semillas marrones produjeron plantas resistentes a herbicida, mientras que 39 de las 40 plántulas germinadas a partir de semillas amarillas fueron sensibles a herbicida.

10 El examen cuidadoso de las semillas marrones de PHP23030 reveló que la capa aleurona tuvo fluorescencia verde, mientras el endospermo de las semillas marrones de PHP23069 mostró una fluorescencia verde intensa cuando se comparó con las semillas segregantes amarillas derivadas de la misma mazorca. Esto es consistente con la observación de la fluorescencia verde observada en las células BMS bombardeadas con 35S:P1 (Grotewold, et al., (1998) Plant Cell 10(5): 721-740). Además, el examen de los callos transformados con PHP23528 (End2:P1-35SPAT) y PHP23535 (LPT2:P1-35S-PAT) reveló, a diferencia de los callos no transformados GS3, que los callos que contienen PHP23528 y PHP23535 tenían fluorescencia verde. La observación de fluorescencia verde en estos callos transformados y la co-segregación de los granos marrones con el marcador seleccionable de herbicida en las plantas transformadas indica que la expresión de *p1* a partir de al menos promotores preferidos de semilla puede usarse como un marcador visual para identificar los tejidos de maíz transformados.

Ejemplo (Referencia) 9

Alternativas a la citotoxicidad del polen

20 Como se muestra en las Tablas 2 y 3, la disrupción de la función del polen puede conseguirse por cualquiera de numerosos métodos, incluyendo degradación dirigida del almidón en el grano de polen o interferencia con la acumulación de almidón en el polen en desarrollo. Por ejemplo, una construcción que comprende la región codificadora de la alfa-amilasa se une operativamente a un promotor específico de polen. La región del péptido señal secretora nativa puede estar presente; puede eliminarse; o puede reemplazarse por un péptido señal dirigido a amiloplastido. En otras realizaciones, una construcción puede comprender un promotor específico de polen unido operativamente a una región codificadora de beta-amilasa; o de una enzima desramificante tal como *Sugary1* (Rahman, et al., (1998) Plant Physiol. 117: 425-435; James, et al., (1995) Plant Cell 7: 417-429; U18908) o pululanasa (Dinges, et al., (2003) Plant Cell 15(3): 666-680; Wu, et al., (2002) Archives Biochem. Biophys 406(1): 21-32).

Ejemplo (Referencia) 10

Sustitución de promotores ortólogos

30 Los promotores ortólogos de arroz y Arabidopsis (véase, la Figura 1) se aislaron y ensayaron para (1) su capacidad de regular la transcripción del gen restaurador de maíz MS45, como se describe en el Ejemplo 2; (2) el efecto de un pIR basado en ortólogo en la expresión génica endógena; y (3) si un pIR para un promotor ortólogo podría silenciar eficazmente el transgén MS45 unido operativamente a dicho promotor ortólogo.

35 Las secuencias de ADN aisladas de arroz y Arabidopsis se modificaron por PCR para acomodar la construcción de vectores de complementación de MS45 y de repeticiones invertidas. Típicamente, se introdujeron sitios de restricción HindIII y NcoI en los extremos 5' y 3', respectivamente, para los vectores de complementación. Para los vectores con repeticiones invertidas de promotor, se generaron extremos NotI-NcoI y HindIII-EcoRI por PCR y se subclonaron en vectores de expresión como se describe en Cigan, et al., (2005) Plant Journal 43, 929-940.

(1) Capacidad para dirigir el gen restaurador de maíz MS45

40 Se construyeron casetes de expresión, comprendiendo cada uno un promotor del gen MS45 de arroz, 5126 de arroz, BS7 de arroz, MS26 de arroz, MS45 de Arabidopsis, 5126 de Arabidopsis o BS7 de Arabidopsis, unidos operativamente a la región codificadora de MS45 de maíz. Las células de homocigotas recesivas *ms45ms45* de maíz se transformaron y se regeneraron plantas, según los métodos conocidos para los expertos en la técnica. Típicamente, se evaluaron plantas únicas de seis a diez transformantes T0 de copia única para fertilidad masculina. En cada caso, una alta frecuencia (>90%) de las plantas de inserciones TADN independientes demostró la restauración de la fertilidad por el promotor ortólogo que dirige MS45. Además, la restauración de la fertilidad se mantuvo cuando las plantas de estos eventos fértiles se analizaron en generaciones posteriores, (T1, 3 plantas por evento y T2, 3 a 5 plantas por evento).

(2) Efecto de un pIR basado en ortólogo en la expresión génica endógena.

50 Se crearon construcciones que comprenden el promotor de Ubiquitina unido operativamente a un pIR basado en cada uno de los promotores MS45 de arroz, 5126 de arroz, BS7 de arroz, 5126 de Arabidopsis y BS7 de Arabidopsis. Las

células de maíz de tipo salvaje se transformaron y se regeneraron las plantas. Típicamente, se evaluaron plantas únicas de seis a diez transformantes T0 de copia única para defectos en el desarrollo de la planta o la fertilidad masculina. En cada caso, las plantas se desarrollaron normalmente y no se observaron defectos en la fertilidad lo que indica que el pIR ortólogo no afectaba la expresión del gen diana endógeno.

5 (3) Efecto de un pIR basado en ortólogo en la expresión de dicho promotor ortólogo que dirige MS45.

Se usaron plantas androfértiles homocigotas recesivas ms45 que contienen las construcciones descritas en (1) anteriormente para fertilizar plantas androfértiles heterocigotas Ms45/ms45 que contienen el promotor pIR correspondiente descrito en (2) anteriormente. Las plantas de la progenie recesivas ms45 que contienen tanto un promotor ortólogo unido operativamente a MS45 como el pIR correspondiente se evaluaron para fertilidad masculina. Cada pIR silenció la expresión de su promotor correspondiente que dirige MS45 y resultó en plantas androestériles debido a la naturaleza recesiva de ms45 y a la incapacidad del promotor unido operativamente a la copia transgénica de MS45 de dirigir la transcripción de este gen; por ejemplo, un pIR para MS45 de arroz silenció arrozMS45::MS45. Se obtuvieron resultados similares usando los promotores 5126 de arroz y 5126 de Arabidopsis y BS7 de Arabidopsis. Véase, la Figura 3.

15 Ejemplo 11

Ensayo de alelos y utilización

Este ejemplo proporciona un método para evaluar la funcionalidad de alelos variantes de un gen de interés. Usando un pIR apropiado, se suprime el gen de interés endógeno. Un alelo variante del gen de interés se expresa bajo el control de un promotor no dirigido. Los elementos de complementación y supresión pueden combinarse en un único vector. Véase la Figura 4. En una realización del método, el alelo variante se produce por transposición génica. Las estrategias para dicha transposición de ADN se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370: 389-391; Cramer, et al., (1997) Nature Biotech. 15: 436-438; Moore, et al., (1997) J. Mol. Biol. 272: 336-347; Zhang, et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4504-4509; Cramer, et al., (1998) Nature 391: 288-291; y Patentes U.S. Números 5.605.793 y 5.837.458.

En realizaciones adicionales, una célula de planta se transforma con un casete de expresión que comprende un alelo variante seleccionado unido operativamente a un promotor apropiado y se regenera una planta transformada. La planta regenerada puede presentar un cambio fenotípico. En determinadas realizaciones, el cambio fenotípico es mensurable sólo cuando la planta o célula que comprende el alelo variante o su producto génico también comprende un segundo gen o producto génico, tal como una molécula o cofactor informador.

La Figura 5 presenta una realización del método como se aplica al gen de fertilidad masculina MS45; sin embargo, los métodos de la invención pueden emplearse respecto a un gen de interés seleccionado de un amplio rango de genes que codifican un polipéptido implicado en una ruta metabólica que afecta a cualquiera de una variedad de rasgos fenotípicos, incluyendo aquellos listados en otra parte de la presente memoria. En realizaciones adicionales, los métodos de este ejemplo se usan en combinación con otros métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, el silenciamiento de un gen endógeno y la transformación con un alelo variante seleccionado podría combinarse con un método descrito en el Ejemplo 5, de manera que el alelo variante seleccionado se une operativamente a un promotor en una primera planta; y una segunda planta comprende un pIR dirigido a dicho promotor, de manera que la expresión del alelo variante seleccionado puede controlarse a través del cruzamiento.

Ejemplo (Referencia) 12

40 Mantenimiento de los letales recesivos

En una realización adicional de los métodos de complementación que incorporan pIR, se emplea un promotor ortólogo para complementar la expresión de un mutante. De esta manera, las plantas que comprenden mutantes letales recesivos pueden auto-polinizarse. El cruzamiento de plantas que comprenden las construcciones de transgén correspondientes (como se muestra en la Figura 6) resulta en el silenciamiento del promotor de complementación, exponiendo de esta manera la mutación recesiva.

Los métodos usados en la presente memoria, tales como para la construcción de casetes de expresión, transformación, regeneración de plantas, aislamiento y análisis de ácidos nucleicos y valoración de la fertilidad masculina, son conocidos para los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, Cigan, et al., (2005) Plant J 43: 929-940 y las referencias citadas en esta publicación, incluyendo Cigan, et al., (2001) Sex. Plant Repro. 14: 135-142; y Unger, et al., (2001) Transgenic Res. 10: 409-422.

Aunque la invención se ha descrito con referencia al ejemplo anterior, se entenderá que las modificaciones y variaciones están englobadas en el espíritu y alcance de la invención. De acuerdo con esto, la invención sólo está limitada por las reivindicaciones

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Pioneer Hi-Bred International, Inc.
 <120> Transgenes de supresión de genes dominantes y métodos para usar los mismos
 <130> 1554R-PCT
 <150> 60/530,478 <151> 2003-12-16
 <150> 60/591,975 <151> 2004-07-29
 10 <150> 11/014,071 <151> 2004-12-16
 <160> 3
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 1112
 15 <212> ADN
 <213> Zea mays
 <220>
 <221> promotor
 <222> (1)...(1112)
 20 <223> P67
 <400> 1

```

gacgcgactg ctgacaaccc tagctagaaa caccctgaac actagttagg ttttctctg 60
ttatctgcgt tgtcgatgta gttttcttta tctcgagcac cgatgtgcat ctgtgatcgg 120
gagatcatgt ctctggaaac tgttgtcttc gagatcctgt attaggagaa ggaaaataag 180
gtttttgaga agcgtattca catgactact cacgttttcc ttgccatcga ccacgtcgtc 240
gaccctgcta gcttccacgt tgtcattcag tatgttcgat cgcacatct gatctaactc 300
tataatgcag ttcattctgtt atggtagaag tgtgtcgcac tcttataatt agcatgtag 360
ggttacatgt taggtaacag acaccgagat tatctctgta caccattggt gccttcattg 420
cctacgtcgt ctctcacagc cacaggtgtc tgaatcatga ccctctttt aggagtatc 480
tgtagagatg tgaggtaaag cagctttgca cgagaacgcc aatctcgcgt gtttccgagt 540
attttactgc tccatttgtg ggctacgcct gttgtttccg ccacggatgt cggctgctca 600
tcaccaaaaa tatgactact ttgaagtct ggtagcagag tgggccaga cgccgttgc 660
tgattctggc tgggccaggc tacgtgaggc cttcttatta gatcatttcc gctgaaaggc 720
cgaaacgtga gagcctggca aacttttcta gaaaaaaaaa attcgcaaac aaaattttt 780
ccgaacaaac gctacaccag tgaccgccgt ccgtcgtcgt tgcttggctc tccctttact 840
tcggtccaa cgccaatgca caaccgtccc tcttcgceat gtcccagtt tgacgctgcc 900
tgtagcgcag tataaaaaat cgtctcgatg ctcttgcctg gtactccaat tcacacaaa 960
acatagagtg tcgactttt tattgggtgtg attgggggca ctaaatacct accacattgc 1020
actcagacta catatactgt gtttgtgtgt tgtaagccgt aagcgtgtgt gagcttgcgc 1080
aaattggaca tctaggccgt gcgtaccctg cg 1112
    
```

<210> 2
 <211> 1092
 25 <212> ADN
 <213> Zea mays
 <220>

<221> promotor
 <222> (1)...(1092)
 <223> P95

<400> 2

```

gcgacgtcga gatcacgaga ggctcgtacg gggacaacgc gctaggtctc ttagtcagat 60
cagttcaaat ctcttaattc ttgtcctcct tctcagtcca gttcttacat ctatctgtct 120
gatcccatta ttccaacac cacttgaacc aatctgctct gatgccccgt tcctgatggt 180
gtcgtcgttg tcactttctc gacgtgcgtt gtcgtccgac cctgaccctt tctcgatgcc 240
tcatctccga cagacgacga gtttagcaaa ccagcgagcg ttgattctct gccgaaaagg 300
ttgcctgacc ccgtctcctt cccgatggcc ctacacttcg agaagatcac cacttcgaga 360
agatcaccag atcaatatcc gaaaagatac acatagttta gattcagtca gcaaaaagct 420
aacattatgt ttgcttcttt tattcatata gttttcttag catgaaattt aaattctata 480
tagtactggg tttttacgag cttacttaat tttattaggg ctaatttggg aaccacattt 540
ttccacggaa tttcaatttt cctaaggaaa attagttaat tttcgcttgg gaaaatagaa 600
atctcatggg aaaatgcggt tcccaaacta gccttagcct tataggtttt ttttagccca 660
tgtgaattct cgtcaaaggg actcagteca cttcacagca ggtgaggtgg tttttgaatg 720
cccaaataca gatctgttaa ttaattttca gagggtcagg acgcggtcgc ccgaacgggc 780
ggacgcgcga acaatccgcc cgcccgcgcg cgcgacctgc cacttcgggc catggccagc 840
accgcgatg cgtcgtccta aacgacgagc accgcccgtt ggcgctataa agccccgcct 900
cggcggtccc ttgtcaattc gaagccttc cggttacccc ttcggcctcc acctatcacc 960
accgggacg tcttccaggg tctcctcgta gtagaatagc tctatctcac cgacaact 1020
cctcattaca tcttttagga gaggctgatc gattggtaga tacgtactcg ggtggagcag 1080
5 aacaacgaga ga 1092
    
```

<210> 3
 <211> 597
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

10 <220>
 <221> promoter
 <222> (1)...(597)
 <223> Región promotora BS7 de arroz.

<400> 3

```

agcttgtttt tggttcaaac aaaagcagca gcagcagcaa agaaccagag aaggctcctc 60
ctgttaaagt tgatgaactt gcaaagaagg aagagcccaa gttccaagca ttttctggga 120
cgagctactc gttgaaacgt tagctgctgc tattagggtt aaaagttttg gaatcaatca 180
tttgtttctt acttgaggtt cgcctggtta ctctggcagc tgtaaatgat tggtagcaat 240
gtgtatcttt atcattttca gttctccctt aataattcta gttattgtct tgctaattaa 300
aagaattccg tggattacat ggaacctgat actatttgc t gaccatag tggagttttc 360
ttgcaatgtc aagcagaacg cattgcta at gtactcaacc aactccctac ctagagaaga 420
ttctaactga atctaccctc aaccaacctg cttctccatc agttaattat gatcacaaaa 480
atgaggtgat gtacaacatt tcttggctct cctcctctag gatatttctt tgctgtgctt 540
15 atatgagcag gttgatttgc ttcagagttc aacatcatca cttccagttt gagaaac 597
    
```

REIVINDICACIONES

1. Un método para controlar la expresión de una variante alélica de un gen de interés en una planta o célula de planta, que comprende:
 - 5 (a) silenciar dicho gen de interés usando una construcción pIR dirigida al promotor que dirige la expresión de dicho gen de interés; y
 - (b) expresar recombinantemente dicha variante alélica unida operativamente a un segundo promotor.
2. El método de la reivindicación 1 en el que dicho gen de interés es un gen endógeno.
3. Una pareja de plantas en la que la primera planta comprende:
 - 10 (a) un primer promotor unido operativamente a un gen de interés;
 - (b) una construcción pIR dirigida a dicho primer promotor;
 - (c) una construcción que comprende un segundo promotor unido operativamente a una variante alélica del gen de interés; y la segunda planta comprende una construcción pIR dirigida al segundo promotor.

NOMBRE		FUNCIÓN	GEN	Registro		Coordenadas	TAMAÑO (nt)
				PROTEINA			
Maiz	MS45	estrictosidina sintasa	AF360356 LOC_Os03g15710 AT3G59530	AAK52489 NP_912416 NP_974462		Chr3:8645330-8645830 (complementado inverso) TIGR Chr3:22004091 - 22004688 (TAIR versión 6.0)	500 597
Maiz	MS26	citocromo P450	AF366297 LOC_Os03g07250 AT1G69500	AAK52956 XP_470289 NP_177109		Chr3:3680399-3681071 (complementado inverso) TIGR Chr1: 26127176-26127762 (TAIR versión 6.0)	672 586
Maiz	5126	chalconay estilbeno sintasa	AX060770 LOC_Os07g22850 AT4G34850	NP_912707 NP_567971		Chr7:12882446-12883053 (complementado inverso) TIGR Chr4: 16607608 - 16608354 TAIR v6.0 (11 Nov 2005)	607 746
Maiz	BS7	dihidrof flavonol 4-reductasa	AF366295 LOC_Os08g40440 AT4G35420	AAK52955 BAC78578 NP_195268		Chr8: Chr4: 16835571 - 16836340 TAIR v6.0 (11 Nov 2005) (complementado inverso)	769

Figura 1. Información de la Fuente para promotores ortólogos.

Figura 2. Las construcciones de supresión complementarias determinan el fenotipo de la progenie.

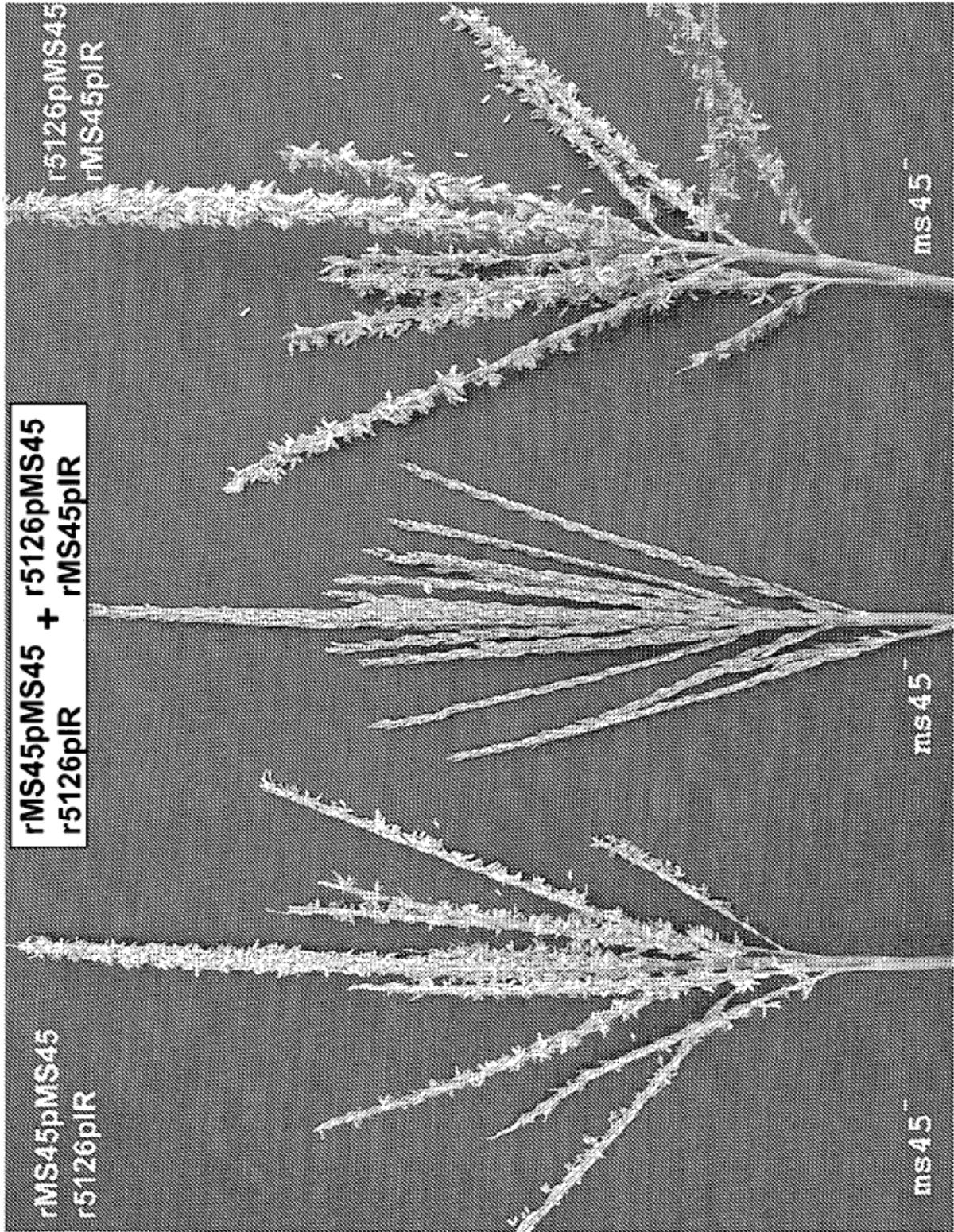


Figura 3. MS45pIR de maiz no suprime MS45 endógeno de maiz pero suprime MS45 transformado unido operativamente a un promotor de maiz.

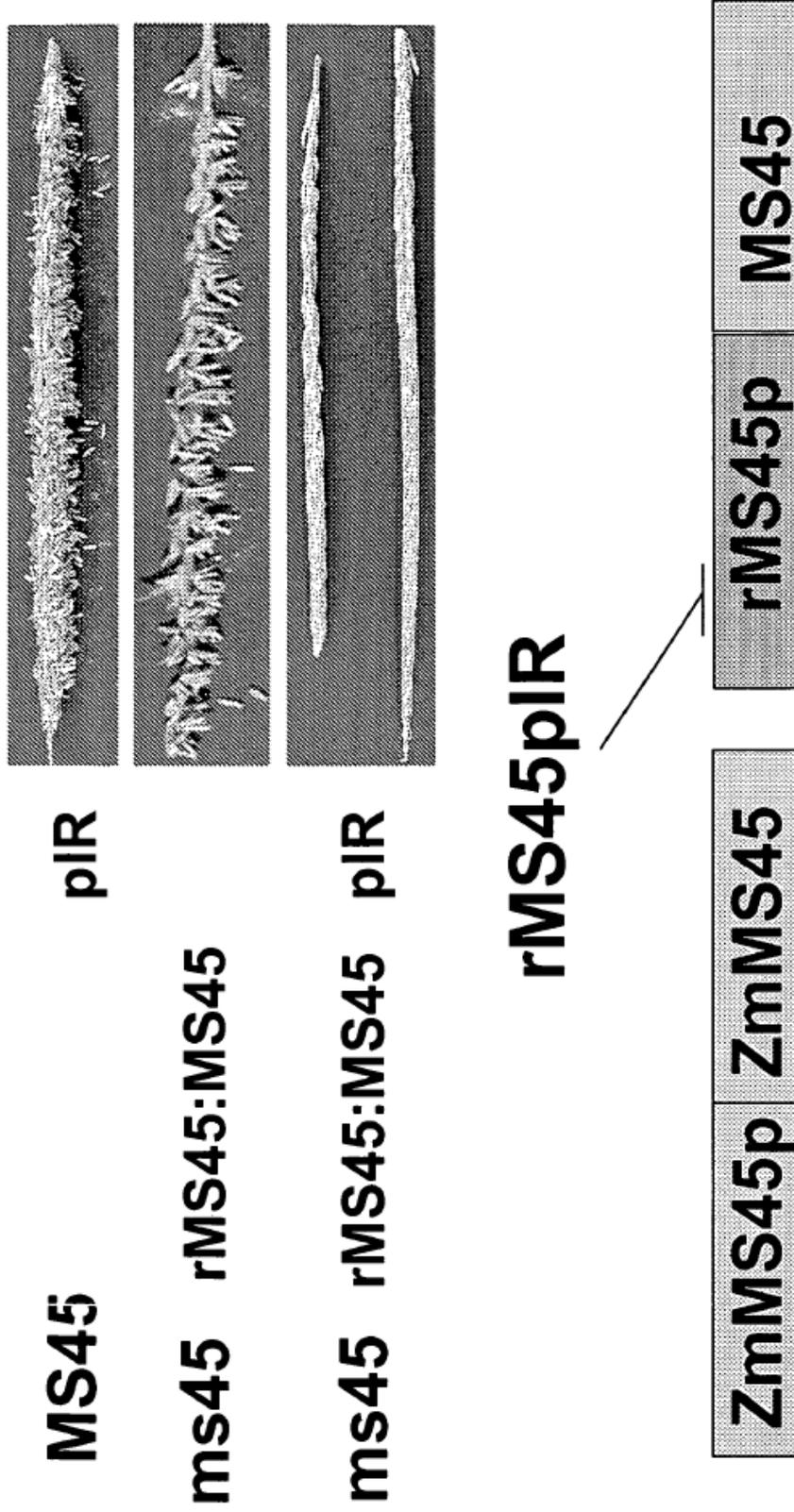
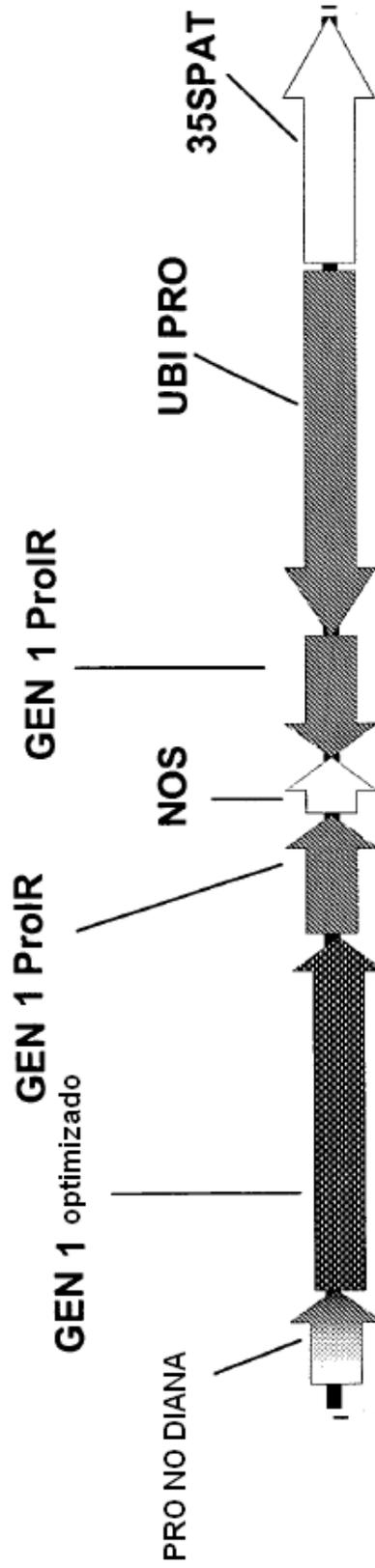


Figura 4. Diseño del Vector TADN de complementación/supresión genérica



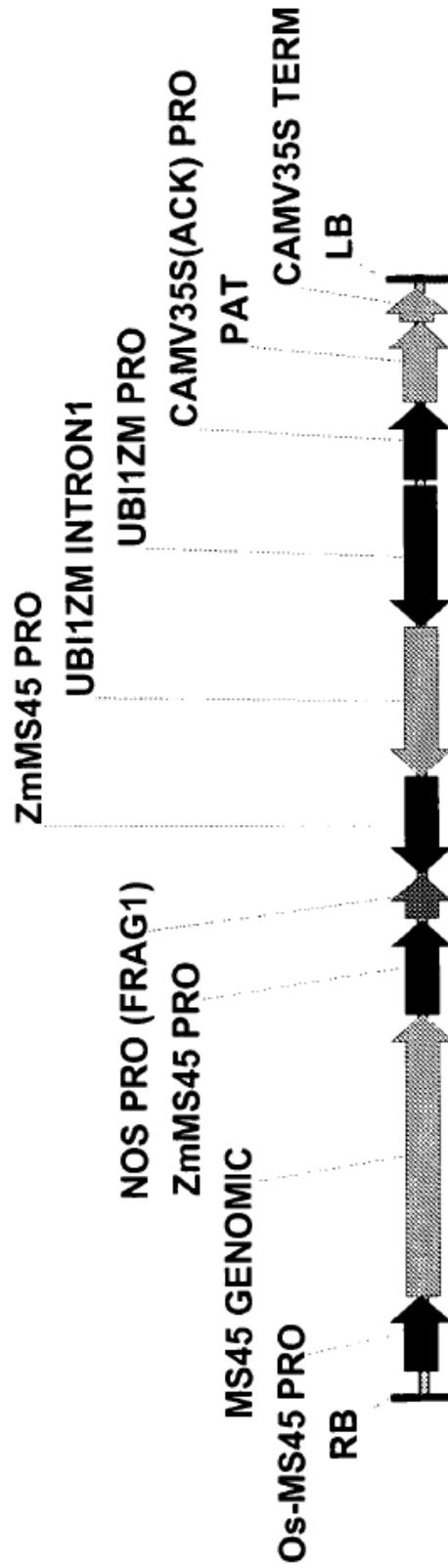


Figura 5. Diseño del vector T-ADN de Complementación/Supresión de MS45

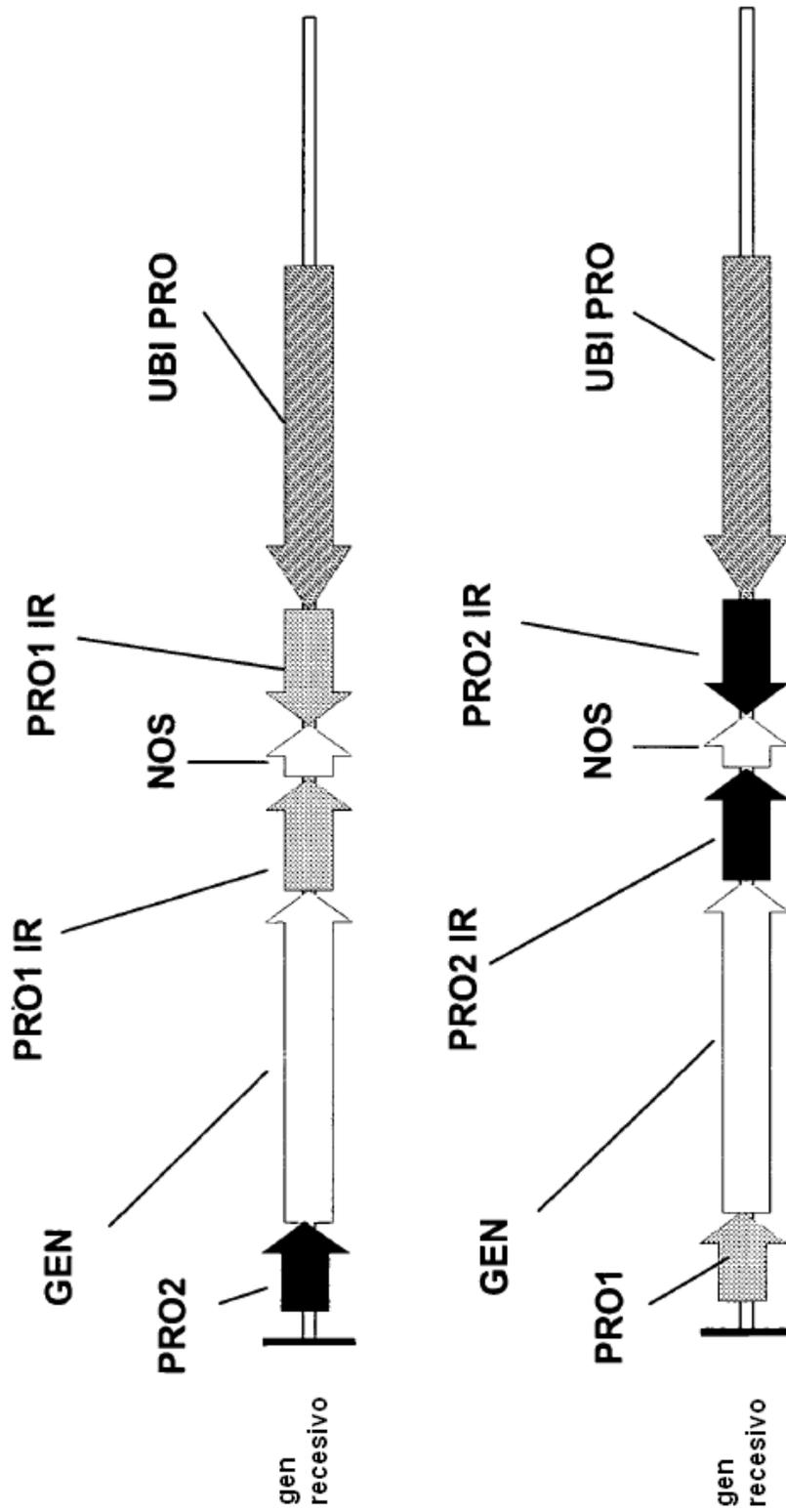


Figura 6. Mantenimiento de letales recesivos usando un diseño de vector T-ADN de complementación/supresión.