(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 537 649**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/06	(2006.01)
C12N 9/18	(2006.01)
C12N 15/82	(2006.01)
C12P 13/04	(2006.01)
C12P 41/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2003** **E 10178022 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015** **EP 2278017**

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

(30) Prioridad:

26.02.2002 GB 0204484
08.10.2002 GB 0223359

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2015

(73) Titular/es:

SYNGENTA LIMITED (100.0%)
Priestley Road Surrey Research Park Guildford Surrey GU2 7YH, GB

(72) Inventor/es:

HADFIELD, STEPHEN THOMAS;
HAWKES, TIMOTHY ROBERT;
MITCHELL, GLYNN;
THOMPSON, PAUL ANTHONY;
VINER, RUSSELL COLIN y
ZHANG, YAN

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 537 649 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para producir selectivamente plantas estériles masculinas o femeninas

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

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

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

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

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

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

A fin de conseguir una producción más rentable de semillas en trigo y otros cultivos es necesario desplazar las plantas masculinas y femeninas más próximas entre sí para una transferencia más eficiente del polen; más eficientemente, plantando de forma intercalada machos y hembras a una distancia de centímetros entre ellos en las

mismas filas. En tal sistema sería inviable cosechar sólo la semilla de los progenitores femeninos (estériles masculinos). La contaminación con semilla no híbrida procedente del progenitor masculino se puede minimizar usando un porcentaje lo más bajo posible de tales plantas progenitoras masculinas en la mezcla de plantación, y/o usando plantas masculinas que sean estériles femeninas. Se ha descrito un método para construir una línea estéril femenina dominante (documento EP 412.006 A1 (1990); Goldman et al., (1994) EMBO, J., 13, 2976-2984) pero, al igual que para las líneas estériles masculinas, la línea tiene que mantenerse como heterocigótica.

En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de métodos económicos sencillos de producción de semillas híbridas. En particular, a fin de producir semilla híbrida eficientemente, sigue existiendo la necesidad de proporcionar tanto líneas parentales femeninas estériles masculinas como líneas parentales masculinas estériles femeninas que se puedan mantener fácilmente como líneas homocigóticas puras y que sean útiles para la producción eficiente de semillas híbridas. Los métodos que se describen en la técnica para lograr esto incluyen métodos en los que la semilla híbrida se produce a partir de líneas parentales masculinas y femeninas, al menos una de las cuales comprende un gen quimérico heterólogo, preferentemente expresado en el tejido floral, que vuelve a la línea condicionalmente estéril dependiendo de la aplicación exógena de una sustancia no fitotóxica que se puede convertir específica y localmente en una fitotoxina mediante una enzima que es codificada por el gen quimérico heterólogo y que se expresa preferentemente en las estructuras reproductivas masculinas o femeninas. La sustancia no fitotóxica puede ser un proherbicida. La ventaja de tener tales líneas parentales condicionalmente estériles es que les permite mantenerse como homocigotas con respecto al rasgo de la esterilidad. La fertilidad se interrumpe sólo tras la aplicación exógena de la sustancia no fitotóxica. En uno de tales ejemplos de un sistema de esterilidad masculina condicional, un gen que codifica una enzima desacetilasa se expresa preferentemente en las células del tapete del tejido floral masculino, en las que convierte el proherbicida N-acetil-L-fosfinotricina, aplicado exógenamente, en la fitotoxina L-fosfinotricina y, de este modo, evita la formación de polen viable. En otros ejemplos similares: (i) la expresión preferente en el tapete del citocromo bacteriano P450 cataliza la conversión del proherbicida R7402 en una fitotoxina de sulfonilurea que evita la producción de polen viable; y (ii) la expresión preferente en el tapete de una hidrolasa de monoéster de fosfonato cataliza la conversión del proherbicida gliceril-glifosato en la fitotoxina glifosato, que también evita la producción de polen viable. El documento WO 98/03838 describe ejemplos de un sistema de esterilidad femenina condicional en el que las enzimas capaces de convertir los proherbicidas en fitotoxinas se expresan preferentemente en estructuras reproductivas femeninas.

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

La presente invención se refiere a mejoras en métodos para la producción de semilla híbrida de cultivos. En particular, la invención se refiere a un método para producir selectivamente plantas estériles femeninas, que comprende las etapas de:

a. proporcionar plantas transgénicas condicionalmente estériles femeninas que comprenden un transgén que codifica una D-fosfinotricina oxidasa expresada por un promotor floral femenino específico de tejido;

b. aplicar exógenamente a las plantas transgénicas condicionalmente estériles femeninas una cantidad de D-fosfinotricina en un momento apropiado;

c. seleccionar las plantas transgénicas estériles femeninas que producen poca o ninguna semilla tras la aplicación de D-fosfinotricina, y que producen al menos niveles casi normales de polen viable.

Igualmente, la presente invención se refiere particularmente a un método para producir selectivamente plantas estériles masculinas, que comprende las etapas de:

a. proporcionar plantas transgénicas condicionalmente estériles masculinas que comprenden un transgén que codifica una D-fosfinotricina oxidasa expresada por un promotor floral masculino específico de tejido;

b. aplicar exógenamente a las plantas transgénicas condicionalmente estériles masculinas una cantidad de D-fosfinotricina en un momento apropiado;

c. seleccionar las plantas transgénicas estériles masculinas que producen poco o ningún polen tras la aplicación de D-fosfinotricina.

Se describe además un método de producción de semillas híbridas a partir de líneas parentales masculinas y femeninas, al menos una de las cuales es condicionalmente estéril femenina o masculina dependiendo de la aplicación exógena de una sustancia que no es fitotóxica para el cultivo y que incluye proherbicidas. También se describe un método en el que dicha sustancia no fitotóxica se aplica de una vez y en una cantidad suficiente para que se minimice o se evite la autofertilización en la línea o líneas parentales condicionalmente estériles. La presente invención también se refiere a un método para generar plantas condicionalmente estériles masculinas o femeninas (i) transformando material vegetal con uno o más genes quiméricos que, de forma individual o conjunta, codifican

una o más enzimas capaces de reaccionar con una sustancia no fitotóxica, preferiblemente en forma de un proherbicida, para producir una sustancia fitotóxica. Las enzimas se expresan bajo el control operable de uno o más promotores que, en el caso de plantas condicionalmente estériles masculinas, hace que la enzima o enzimas se expresen preferentemente en las estructuras reproductivas masculinas, o que, en el caso de plantas condicionalmente estériles femeninas, hace que dicha enzima o enzimas se expresen preferentemente en las estructuras reproductivas femeninas. El material vegetal se regenera en plantas fértiles morfológicamente normales que son condicionalmente estériles masculinas o femeninas. Tal método también incluye el uso de plantas condicionalmente estériles masculinas en combinación con plantas condicionalmente estériles femeninas para producir más eficientemente semilla híbrida, el uso, como sustancias no fitotóxicas, de ciertos proherbicidas, y el uso de genes quiméricos para producir más eficientemente semillas híbridas, genes quiméricos y enzimas útiles para la invención. Tal método también proporciona plantas condicionalmente estériles masculinas, plantas condicionalmente estériles femeninas, semillas de estas plantas, y semillas híbridas producidas mediante el método. En realizaciones preferidas de la invención, las plantas cultivadas a las que se aplica el método de obtención de semilla híbrida son maíz, arroz, sorgo, trigo, mijo, avena, cánola y cebada.

Se describe generalmente un método para producir plantas estériles masculinas o femeninas, que comprende las etapas de transformar el material vegetal con un polinucleótido que codifica al menos una enzima que reacciona con una sustancia no fitotóxica para producir una fitotóxica, y regenerar en una planta el material así transformado, en el que dicha sustancia no fitotóxica se aplica a la planta hasta el momento de la formación y/o maduración del gameto femenino o masculino, de forma que la sustancia no fitotóxica proporciona la producción de una fitotóxica que evita selectivamente la formación de los gametos o, de otro modo, vuelve a los gametos no funcionales, en el que la enzima se expresa preferentemente en estructuras reproductivas masculinas o femeninas, caracterizado por que (i) la sustancia no fitotóxica se selecciona del grupo que consiste en derivados de éster de herbicidas sin fosfonatos, herbicidas los cuales son directamente fitotóxicos para el tejido no verde, D-alfa aminoácidos, derivados peptídicos de D-alfa aminoácidos no proteicos, enantiómeros S de ariloxifenoxipropionatos y enantiómeros S de derivados de éster de ariloxifenoxipropionatos, y (ii) la enzima se selecciona del grupo que consiste en carboxilesterasas, D-aminoácido oxidasas, D-aminoácido deshidrogenasas, D-aminoácido racemasas, 2-arilpropionil-CoA epimerasas, alfa-metilacil-CoA racemasas, tioesterasas y acil-CoA sintetasas.

Debido a que un objetivo deseable es maximizar el rendimiento de semilla híbrida y por lo tanto minimizar cualquier daño al cultivo, la sustancia no fitotóxica es un proherbicida seleccionado entre compuestos que son relativamente no fitotóxicos para el cultivo. A fin de que ser capaces de producir un efecto contra tejidos florales, también es deseable que los proherbicidas sean progenitores de fitotoxinas que son efectivas sobre tejidos “no verdes”. De este modo, los proherbicidas se seleccionan de aquellos que son progenitores de fitotoxinas que son directamente fitotóxicas para tejidos no verdes, en vez de aquellos que tienen un sitio de acción principal en la fotosíntesis o en la producción de pigmentos fotosintéticos. También es un objetivo deseable minimizar los costes de la producción de semillas híbridas. De este modo, los proherbicidas se seleccionan de aquellas sustancias químicas para las cuales ya se ha concedido o se está tramitando la concesión de la aprobación para el uso en cultivos por las autoridades reguladoras apropiadas.

Nomenclatura: Definiciones

“Gen”, como se usa aquí, se refiere a cualquier secuencia de ADN que comprende varios fragmentos de ADN enlazados operablemente, tales como un promotor y una región reguladora en 5’; una secuencia codificante, y una región no traducida en 3’ que comprende un sitio de poliadenilación.

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

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

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

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

“Fitotoxinas” son, en el contexto de la presente invención, sustancias que son tóxicas para las plantas, tejidos vegetales y células vegetales del cultivo particular al que se aplican. Tales fitotoxinas no tienen que ser fitotóxicas

para todos los tejidos vegetales de todas las especies vegetales.

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

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

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

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

“Región promotora”, como se usa aquí, es una región de ADN que comprende al menos un promotor funcional y, opcionalmente, algunas o todas sus secuencias reguladoras en dirección 5’, incluyendo secuencias potenciadoras y/o secuencias asociadas en dirección 3’, incluyendo algunas o todas las regiones no traducidas en 5’ del gen endógeno al promotor.

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

“Carboxilesterasa”, como se usa aquí, engloba solamente enzimas que se clasifican apropiadamente como EC 3.1.n.

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

La enzima usada en el método puede ser – para fines comparativos – una carboxilesterasa, y la sustancia no fitotóxica puede ser un éster de imazametabenz o de flamprop. En este caso, que se refiere específicamente a trigo, la sustancia no fitotóxica es un proherbicida seleccionado del grupo que consiste en imazametabenz metilo, flamprop metilo o flamprop isopropilo.

Dicha enzima puede ser una D-aminoácido oxidasa, una D-aminoácido deshidrogenasa (con fines comparativos) o una D-aminoácido racemasa (con fines comparativos), y la sustancia no fitotóxica puede ser entonces un D-aminoácido y, según la presente invención, puede ser el enantiómero D de fosfinotricina, o - con fines comparativos - el enantiómero D de bialafós, o se puede seleccionar del grupo que consiste en D-alanina, D-serina, D-isoleucina, D-metionina, D-leucina o D-valina. Como se usa aquí, “D-aminoácido oxidasa” significa cualquier enzima capaz de oxidar un D-aminoácido para producir un 2-cetoácido, e incluye enzimas con especificidad para aspartato, conocidas como “D-aspartato oxidasas”.

Como alternativa, la enzima usada – para fines comparativos – se puede seleccionar del grupo que consiste en 2-arilpropionil-CoA epimerasas, alfa-metilacil-CoA racemasas, tioesterasas y acil-CoA sintetasas, y la sus no fitotóxica puede ser entonces un enantiómero S de un ariloxifenoxipropionato o un enantiómero S de un éster de

ariloxifenoxipropionato.

Los genes quiméricos que codifican enzimas capaces, individualmente o en combinación con otras, de reaccionar con una sustancia no tóxica para producir una fitotóxica se pueden seleccionar entre genes que comprenden secuencias codificantes de ADN que codifican una o más de las siguientes enzimas.

(1) Carboxilesterasas capaces de catalizar la reacción de hidrólisis:

imazametabenz metilo → imazametabenz + metanol

(para fines comparativos)

(2) Carboxilesterasas capaces de catalizar la reacción de hidrólisis:

flamprop metilo → flamprop + metanol y/o

flamprop isopropilo → flamprop + isopropanol

(para fines comparativos)

(3) D-aminoácido oxidasas capaces de catalizar la oxidación:

D-aminoácido + O_2 + H_2O → NH_3 + H_2O_2 + 2-oxoácido

y según la invención, la reacción

D-fosfinotricina + O_2 + H_2O → NH_3 + H_2O_2 + 2-oxo-4-metilfosfinobutirato

(4) D-aminoácido deshidrogenasas capaces de catalizar la oxidación:

D-fosfinotricina + aceptor de electrones + H_2O → NH_3 + aceptor de electrones reducidos 2e- + 2-oxo-4-metilfosfinobutirato. Las D-aminoácido deshidrogenasas pueden ser enzimas asociadas a la membrana que acoplan electrones vía un aceptor de electrones a una cadena de transporte de electrones unida a la membrana, de la cual el receptor de electrones final puede ser, por ejemplo, NAD^+ u O_2 (para fines comparativos).

(5) Aminoácido racemasas capaces de catalizar la interconversión:

D-fosfinotricina <> L-fosfinotricina (para fines comparativos)

(6) 2-arilpropionil-CoA epimerasas o alfa-metilacil-CoA racemasas capaces de catalizar una o más de las siguientes reacciones:

S-Fluazifop-CoA → R-Fluazifop-CoA y/o

S-Quizalofop-CoA → R-Quizalofop-CoA y/o

S-Propaquizafop-CoA → R-Propaquizafop-CoA y/o

S-Haloxyfop-CoA → R-Haloxyfop-CoA y/o

S-Fenoxaprop-CoA → R-Fenoxaprop-CoA y/o

S-Diclofop-CoA → R-Diclofop-CoA y/o

S-Cyhalofop-CoA → R-Cyhalofop-CoA y/o

S-Clodinafop-CoA → R-Clodinafop-CoA

(para fines comparativos)

(7) Tioesterasas capaces de catalizar la reacción de hidrólisis:

R-Fluazifop-CoA → R-Fluazifop + CoA y/o

R-Quizalofop-CoA → R-Quizalofop + CoA y/o

R-Propaquizafop-CoA → R-Propaquizafop + CoA y/o

R-Haloxyfop-CoA → R-Haloxyfop + CoA y/o

R-Fenoxaprop-CoA → R-Fenoxaprop + CoA y/o

R-Diclofop-CoA → R-Diclofop + CoA y/o

R-Cyhalofop-CoA → R-Cyhalofop + CoA y/o

R-Clodinafop-CoA → R-Clodinafop + CoA

(para fines comparativos)

(8) Acil-CoA sintetasas capaces de catalizar la reacción:

S-Fluazifop + CoA + ATP → S-Fluazifop-CoA + PPi + AMP y/o

S-Quizalofop + CoA + ATP → S-Quizalofop-CoA + PPi + AMP y/o

S-Propaquizafop + CoA + ATP → S-Propaquizafop-CoA + PPi + AMP y/o

S-Haloxyfop + CoA + ATP → S-Haloxyfop-CoA + PPi + AMP y/o

S-Fenoxaprop + CoA + ATP → S-Fenoxaprop-CoA + PPi + AMP y/o

S-Diclofop + CoA + ATP → S-Diclofop-CoA + PPi + AMP y/o

S-Cyhalofop + CoA + ATP → S-Cyhalofop-CoA + PPi + AMP y/o

S-Clodinafop + CoA + ATP → S-Clodinafop-CoA + PPi + AMP

(para fines comparativos)

La enzima carboxilesterasa se puede seleccionar de enzimas de tipo carboxilesterasa B (EC 3.1.1.1), especialmente aquellas que derivan de Arthrobacter sp, Bacillus sp, hígado de cerdo, Saccharomyces sp o Synechocystis sp. Tales enzimas preferidas se pueden seleccionar entre proteínas que tienen los números de acceso Swissprot Q01470, P37967, Q29550 (la secuencia peptídica madura de 60-1703), P40363 o SEC ID número 2 (esta solicitud); y la secuencia de ADN que codifica la enzima carboxilesterasa se puede seleccionar entre secuencias de ADN comprendidas en los accesos de EMBL M94965, BS06089, SSCE, Z34288 y SEC ID número 1 (esta solicitud). Otras enzimas carboxilesterasas y secuencias codificantes de ADN adecuadas para trabajar con la invención se seleccionan entre plantas y microorganismos que, en un medio mínimo, se encuentra que exhiben sensibilidad similar a la inhibición del crecimiento por imazametabenz metilo como por imazametabenz. Los genes de esterasas candidatos procedentes de bibliotecas de ADN de tales organismos se identifican usando sondas de ADN adecuadas, y se aíslan mediante subclonación. Como alternativa, los genes que codifican enzimas adecuadas se identifican y se seleccionan de bibliotecas de expresión en organismos hospedantes adecuados insensibles a imazametabenz metilo vía la identificación sistemática para la transformación al fenotipo sensible a imazametabenz metilo. Igualmente, los genes y enzimas adecuados y mejorados se seleccionan en base a la expresión de E. coli y el ensayo, ya sea in vivo o in vitro, en busca de la actividad de esterasa de éster de flamprop o éster de imazametabenz vía los métodos habituales que incluyen detección de imazapyr o flamprop mediante inhibición de enzimas diana tales como acetohidroxiácido sintasa, mediante HPLC/UV y/o mediante derivatización y GC MS.

La enzima D-aminoácido oxidasa (DAMOX) se puede seleccionar entre aquellas producidas por Rhodosporidium sp. (Rhodotorula sp.), Trigonopsis sp, pig. Fusarium sp, Candida sp, Shizosaccharomyces sp y Verticillium sp, y se puede seleccionar de proteínas que tienen secuencias correspondientes a los números de acceso de Swissprot P80324, Q99042, P00371, P24552 o números de SPTREMBL Q9HGY3 y Q9Y7N4. Las secuencias de ADN que codifican la D-aminoácido oxidasa se pueden seleccionar de secuencias comprendidas en los números de acceso de EMBL A56901, RGU60066, Z50019, SSDA04, D00809, AB042032, RCDAAOX, A81420 y SPCC1450. Las D-aminoácido oxidasas son flavoenzimas ubicuas.

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

Sin embargo, la enzima puede comprender sustituciones además de, o en otras posiciones que las mencionadas en el párrafo anterior. En particular, la Phe en posición 58 en la secuencia de tipo salvaje se puede sustituir por un resto seleccionado del grupo que consiste en His, Ser, Lys, Ala, Arg y Asp, y, preferiblemente, es His, Ser o Ala. Además, o alternativamente, la Met en posición 213 en la secuencia de tipo salvaje se puede sustituir por un resto seleccionado del grupo que consiste en His, Ser, Lys, Ala, Arg y Asp, y preferiblemente es Ser o Ala. Además, o

alternativamente, la Tyr en posición 223 en la secuencia de tipo salvaje se puede sustituir por un resto seleccionado del grupo que consiste en His, Ser, Lys, Ala, Arg y Asp. Además, o alternativamente, la Tyr en posición 238 en la secuencia de tipo salvaje se puede sustituir por un resto seleccionado del grupo que consiste en His, Ser, Lys, Ala, Arg y Asp.

Una forma mutante particularmente preferida de la enzima comprende al menos dos de las mutaciones mencionadas anteriormente. Una primera realización de tal mutante doble tiene una His en posición 58 (en lugar de Phe en la secuencia de tipo salvaje) y una Ser en posición 213 (en lugar de Met). Una segunda realización de tal mutante doble tiene Ser en posición 58 (en lugar de la Phe de tipo salvaje) y Arg en posición 213 (en lugar de la Met de tipo salvaje).

Cuando la sustancia no fitotóxica es – para fines comparativos - un D-aminoácido distinto de D-fosfinotricina o D-bialafos, entonces la enzima es una D-aminoácido oxidasa. El D-aminoácido es preferiblemente no un metabolito endógeno de la planta, y se selecciona para que sea uno móvil en el floema, metabólicamente estable en la planta (preferiblemente que tenga un t½ en la planta superior a ~ 1 semana), y un sustrato eficiente de dicha oxidasa. La oxidación del D-aminoácido por la enzima es concomitante con la reducción del oxígeno a peróxido y/o aniones superóxido fitotóxicos.

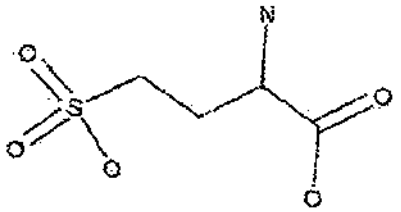
En una realización preferida, la enzima oxidasa se dirige hacia una localización subcelular distinta del peroxisoma. Esto se consigue, por ejemplo, modificando el gen, de forma que se suprimen o modifican tres aminoácidos C-terminales (por ejemplo, SKL en el caso de la D-aminoácido oxidasa de Rhodotorula gracilis) y/o mediante adición de una secuencia para añadir un péptido de tránsito cloroplástico o mitocondrial al término N.

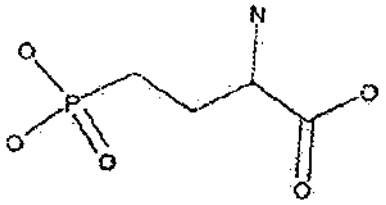
Otras D-aminoácido oxidasas adecuadas se pueden obtener preferiblemente de fuentes fúngicas, mediante los procedimientos de mutación y selectivos conocidos por el experto, y pueden aumentarse mediante la presente descripción.

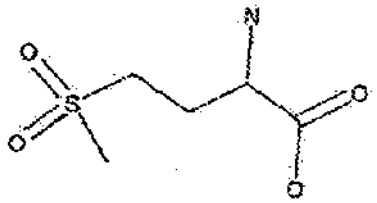
Otras enzimas D-aminoácido oxidasas (o igualmente, fosfinotricina racemasa) y secuencias codificantes de ADN se seleccionan entre aquellos organismos, opcionalmente sometidos a mutagénesis, en los que se encuentra que el crecimiento en un medio con N limitado, bajo condiciones en las que se induce (por ejemplo, se hace crecer sobre D-alanina) la D-aminoácido oxidasa (o fosfinotricina racemasa), se inhibe selectivamente en presencia de D-fosfinotricina. Los genes de D-aminoácido oxidasa se obtienen entonces, por ejemplo, sondando genotecas de tales organismos con sondas de ADN degeneradas adecuadas (por ejemplo basadas en secuencias consenso de D-aminoácido oxidasa establecidas, tales como PROSITE, PS00677) y subclonando. Alternativamente, los genes que codifican enzimas adecuadas se obtienen identificando librerías de expresión génica en una célula hospedante adecuada tal como *E. coli* o una levadura (las cepas hospedantes adecuadas carecen de una actividad de oxidasa o deshidrogenasa endógena frente a D-fosfinotricina) para transformación en un fenotipo con sensibilidad incrementada a la inhibición del crecimiento por D-fosfinotricina en un medio mínimo. Este método se basa en la capacidad de los clones de *E. coli* transformados para producir L-PPT a partir de D-PPT a través de la acción combinada de su actividad de L-transaminasa endógena y la oxidasa heteróloga. Alternativamente, los genes adecuados y mejorados se seleccionan basándose en el ensayo in vitro de la enzima expresada en busca de la capacidad deseada de oxidar D-fosfinotricina. Hay muchos métodos para ensayar directamente las actividades de las D-aminoácido oxidasas, tales como los basados en la detección de peróxido (Enzyme Microb. Technol., (2000), 27(8), 605-611), agotamiento de oxígeno usando un electrodo de oxígeno, o basados en la detección directa de amoníaco.

Un gen DAMOX, derivado de hongos, se clona en un vector lanzadera bajo el control operable de un promotor (por ejemplo, un promotor GAL) capaz de expresarse en el organismo hospedante en el que se realizará la selección (preferiblemente levadura). Este gen se somete luego a mutagénesis, por ejemplo mediante PCR envenenada con Mn2+; replicación de ADN plasmídico en una cepa que es defectuosa en procesos de reparación/edición del ADN tales como la cepa de E. coli XL1 red; o mediante replicación del DNA plasmídico en una cepa hospedante que se somete a mutagénesis usando, por ejemplo, rayos X, luz ultravioleta, adición de mutágeno químico y transformación en un organismo hospedante (preferiblemente levadura). El ADN deseado que codifica una DAMOX con la propiedad deseada de una capacidad incrementada para oxidar D-PPT se selecciona (tras una etapa de selección inicial opcional para transformantes basada en marcadores seleccionables presentes en el vector lanzadera que permite, por ejemplo, la selección vía restauración de prototrofía o crecimiento en presencia de higromicina, etc.), vía, por ejemplo:

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







b) Selección de células transformadas capaces de utilizar la propia D-PPT como única fuente de N. Para que esta selección funcione, la célula hospedante tiene que transformarse también con un gen capaz de invertir el efecto inhibidor de la L-fosfinotricina sobre la glutamina sintetasa. Por ejemplo, el vector lanzadera puede comprender también un gen que codifica una enzima como PAT, que inactiva L-PPT.

Los ciclos de mutación y selección se pueden repetir. Las D-aminoácido oxidasas se pueden clonar, expresar, purificar parcialmente y caracterizar cinéticamente a fin de identificar genes y DAMOX con las propiedades más adecuadas (por ejemplo, estabilidad enzimática, valor elevado de kcat/Km para oxidación de D-PPT, oxidación mínima de cualquier sustrato vegetal endógeno, pH óptimo, etc.).

Cuando la sustancia no fitotóxica es D-fosfinotricina (PPT), se puede obtener de una mezcla de D- y L-PPT. Por ejemplo, DL-PPT se puede añadir a un medio de cultivo (preferiblemente mínimo) de células de E. coli (opcionalmente un mutante arg E para minimizar el nivel del fondo de actividad de N-acetil-PPT desacetilasa) transformado e inducido para expresar un gen PAT (que codifica una enzima que transfiere un grupo acetilo de acetil CoA a L-PPT) a niveles elevados. Tras permitir un tiempo adecuado para que se N-acetile sustancialmente todo el L-componente (valorado, por ejemplo, mediante monitorización de la conversión usando RMN 31-P), D-PPT se recupera y se purifica a partir del medio exento de células, usando sucesivas etapas, por ejemplo, de extracción con disolvente a pH elevado y bajo, cromatografía de intercambio de aniones y cationes, cristalización selectiva con cationes quirales como quincocina, u otros procedimientos conocidos en la técnica, como extracciones líquido/líquido con dos fases acuosas no miscibles como el sistema de fases (véanse los métodos en el documento USP 5.153.355). Típicamente, una última etapa es la cromatografía de intercambio catiónico, de la cual se recupera D-PPT en forma de sal de amonio.

Alternativamente, D-PPT se puede obtener mediante un método enzimático en el que DL PPT + 2 cetoglutarato se convierte principalmente en una mezcla de D PPT, 2-oxo PPT (y sus productos de descarboxilación) y GABA mediante las acciones combinadas de (I) L-aminotransferasa (por ejemplo de E. coli) y (II) glutamato descarboxilasa. La D-PPT pura deseada se resuelve de la mezcla de reacción usando métodos conocidos en la técnica, según se esbozó anteriormente.

La D-PPT también se puede obtener usando un método enzimático en el que DL- PPT + 2 cetoglutarato + NAD se convierte primeramente en una mezcla de D-PPT, 2-oxo PPT (y sus productos de descarboxilación, NADH y amoníaco mediante las acciones combinadas de (I) L-aminotransferasa y (II) glutamato deshidrogenasa. La D-PPT deseada se purifica de la mezcla de reacción.

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

Aún otro método adicional implica (I) conversión de DL PPT en N-acetil DL PPT (usando anhídrido acético u otros reactivos y métodos acetilantes bien conocidos en la técnica) y (II) tratamiento de N-acetil DL PPT con D-amino-

acilasa, de forma que sólo se desacetila la N-acetil D-PPT. La D-PPT resultante se purifica de la mezcla de reacción. Por ejemplo, la D-PPT se resuelve de N-acetil-L-PPT mediante unión a una resina de intercambio aniónico Dowex y elución con ácido fórmico 40 mM. Bajo condiciones de carga adecuadas, este ácido eluye la D-PPT, dejando la N-acetil-L-PPT unida a la columna.

Todavía otro método adicional implica el tratamiento de DL PPT con L-aminoacilasa y un agente acilante en un disolvente no acuoso, de forma que sólo la D-PPT deseada queda en forma no acetilada.

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

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

En uno de los Ejemplos más adelante se proporciona un método detallado para la producción de D-PPT pura.

La enzima 2-arilpropionil-CoA epimerasa o alfa-metilacil-CoA racemasa (EC 5.1.99.4) se puede seleccionar – para fines comparativos – de aquellas producidas por hígado de rata, Acremomium sp o Neurospora crassa. La enzima 2-arilpropionil-CoA epimerasa o alfa-metilacil-CoA racemasa (EC 5.1.99.4) se pueden seleccionar de proteínas que tienen secuencias correspondientes a AAR49827 en la base de datos GENESEQP Derwent, P70473 en Swissprot y SEC ID número 4 (esta solicitud), y la enzima 2-arilpropionil-CoA epimerasa o alfa-metilacil-CoA racemasa (EC 5.1.99.4) se puede codificar mediante una secuencia codificante de ADN seleccionada de secuencias comprendidas en el acceso AAQ44447 de la base de datos GENESEQN Derwent accesos RN2ARYLCO y RNU89905 de EMBL y SEC ID número 3 (esta solicitud).

Las Acil CoA sintetasas – para fines comparativos – pueden ser acil CoA sintetasas de cadena larga (EC 6.2.1.3) seleccionadas de aquellas producidas por Brassica napus, hígado de rata, Saccharomyces sp o Arabidopsis. Las mencionadas sintetasas se pueden seleccionar de proteínas que tienen secuencias correspondientes a la secuencia Q96338 de SPTREMBL, P18163 de Swissprot, P39518 de Swissprot, Q9C5U7 de SPTREMBL o Q9TOAO de SPTREMBL, y las secuencias de ADN que codifican las acil CoA sintetasas se pueden seleccionar de secuencias comprendidas en los accesos BNAMPBP2, J05439, X77783 y AB030317 de EMBL.

Las acil CoA sintetasas, 2-arilpropionil-CoA epimerasas y enzimas tioesterasas, y/o las secuencias de ADN que las codifican, se pueden seleccionar en base a la capacidad del organismo fuente para convertir S-ariloxifenoxipropionatos en R-ariloxifenoxipropionatos y/o para convertir S-ibuprofeno en R-ibuprofeno. Tales organismos se pueden obtener, por ejemplo, de muestras de suelo, y los métodos para ensayar y detectar tales inversiones quirales en cultivos celulares y caldos microbianos son bien conocidos (véanse Menzel-Soglowek et al.(1990) J. Chromatogr., 532, 295-303; Bewick (1986) Pestic. Sci., 17, 349-356). En consecuencia, la enzima acil CoA sintetasa, 2-arilpropionil-CoA epimerasa y/o tioesterasa y, opcionalmente, las secuencias de ADN que las codifican se pueden obtener a partir de Arthrobacter simplex NCIB 8929; Arthrobacter roseoparaffineus ATCC 15584; Bacillus subtilis ATCC 15841; Botrytis cinerea CM1 124882; Brevibacterium butanicum ATCC 15841; Brevibacterium healii ATCC 15527; Brevibacterium ketoglutamicum ATCC 21004; Brevibacterium paraffinolyticum ATCC 21195; Corynebacterium fascians; Corynebacterium fijikoense ATCC 21496; Methanomonas methanolica NRRL B-5758; Micrococcus roseus; Mycobacterium aurum NCTC 1043; Mycobacterium petroteophilum ATCC 21497; Mycobacterium phlei NCTC 10266; Mycobacterium smegmatis ATCC 19420; Nocardia opaca NCIB 9409; Nocardiopsis asteroids ATCC 21943; Pseudomonas dimimuta NCIB 9393; Pseudomonas lemoignei NCIB 9947; Rhodococcus rhodocrous ATCC 13808; Rhodococcus rhodocrous ATCC 21197; Rhodococcus sp ATCC 21499; y Rhodococcus sp ATCC 31337. Usando métodos bien conocidos en la técnica, los genes candidatos y mejorados que comprenden secuencias codificantes de ADN se clonan fácilmente y se seleccionan de genotecas adecuadas de estos organismos mediante el uso de sondas adecuadamente degeneradas basadas en las secuencias conocidas de otras enzimas acil CoA sintetasas, 2-arilpropionil-CoA epimerasas y tioesterasas. Como alternativa, y de forma adicional, los genes adecuados se seleccionan en base a preparar bibliotecas de expresión en un hospedante adecuado e identificar la biblioteca, usando ensayos de cultivos in vitro o de organismos completos, en busca de la capacidad de los clones para llevar a cabo la conversión quiral global, o, como alternativa, en busca de la capacidad para catalizar cada una de las reacciones parciales de las acil CoA sintetasas (usando la fracción microsómica), 2-arilpropionil-CoA epimerasas o tioesterasas individuales. Los métodos adecuados para ensayos *in vitro* de estas actividades son análogos a o los mismos que los descritos en la bibliografía para ibuprofeno (por ejemplo Shieh y Chen (1993) JBC, 268, 3487-3493).

La enzima para uso en el método puede ser – para fines comparativos – una fofinotricina racemasa, cuya secuencia codificante de ADN se produce mediante mutagénesis y/o barajado recombinatorio de genes de glutamato racemasa seguido de rondas iterativas de selección y evolución posterior hacia niveles crecientes de actividad de fosfinotricina racemasa. Las glutamato racemasas son ubicuas entre las bacterias, y son de dos tipos, aquellas que dependen de fosfato de piridoxal como cofactor y aquellas que son independientes de cofactores y contienen dos restos de cisteína de sitio activo. Las secuencias que codifican glutamato racemasas de Pediococcus pentosaceus, Lactococcus lactis, Lactobacillus brevis, Staphylococcus hemolyticus y Bacillus sphaericus se seleccionan para mutación y/o barajado de la familia recombinatoria. Los genes seleccionados para el barajado codifican proteínas

que tienen secuencias correspondientes a las secuencias 082826, P94556 y 031332 (Swissprot). Los genes adecuados se seleccionan identificando bibliotecas de expresión en una célula hospedante adecuada tal como *E. coli* o levadura, cuyas colonias muestran mayor sensibilidad a la inhibición del crecimiento por D-fosfinotricina en medio mínimo. L-PPT inhibe glutamina sintetasa, mientras que D-PPT no lo hace. Un clon mutante de glutamato racemasa que convirtió D- en L-PPT no crecerá en medio mínimo a no ser que se suplemente con glutamina. En cepas hospedantes adecuadas, las actividades de D-aminoácido oxidasas o D-aminoácido deshidrogenasas endógenas no se expresan o no engloban D-fosfinotricina como sustrato. Como alternativa, los genes adecuados se pueden seleccionar en base al ensayo, in vitro o in vivo, de la capacidad de la enzima codificada para interconvertir D y L fosfinotricina. Tales ensayos adecuados se pueden basar en el intercambio del protón alfa, el uso de bioensayos para detectar la formación de L-fosfinotricina a partir de D-fosfinotricina, o, por ejemplo, la detección de la conversión de L-fosfinotricina en D-fosfinotricina usando acoplamiento a una D-aminoácido oxidasa adecuada.

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

Los genes quiméricos que codifican enzimas para uso en la invención que son capaces, indivuidualmente o en combinación con otras, de convertir una sustancia no fitotóxica en una fitotóxica, pueden comprender cada uno una secuencia de ADN que codifica una de dichas enzimas ligada operablemente a una región promotora en 5’, la cual dirige preferiblemente la expresión a las estructuras reproductivas, bien masculinas o femeninas. Esta especificidad de expresión asegura que el efecto de la enzima o enzimas expresadas se ejercerá sólo en la localización de los tejidos y células necesarios para la formación de semilla o polen viable, y no será perjudicial para la planta más allá de su efecto sobre la fertilidad en presencia de una sustancia no fitotóxica adecuada, quizás un proherbicida. Además de regiones promotoras, los genes quiméricos según la presente invención también comprenden una secuencia terminadora transcripcional en 3’. Ésta es responsable de la terminación de la transcripción y de la correcta poliadenilación del ARNm. Muchas de tales secuencias terminadoras transcripcionales en 3’ se conocen en la técnica, y son adecuadas para uso en los genes quiméricos de la presente invención. En realizaciones particulares, la secuencia terminadora transcripcional en 3’ se selecciona del terminador de CMV 35S, el terminador *tml*, el terminador de nopalina sintasa (nos), y el terminador *rbcS* E0 del guisante.

Las regiones promotoras en 5’, adecuadas para uso en ciertas realizaciones de dichos genes quiméricos, incluyen regiones 5’ de genes que se expresan preferiblemente en tejidos florales femeninos. En ciertas realizaciones, la región promotora en 5’ se selecciona del grupo formado por el promotor stig 1 de tabaco (Goldman et al., (1994) EMBO J., 13, 2976-2984), un promotor S13 modificado (Dzellcalns et al (1993) Plant Cell, 5, 8555), el promotor AGL5 (Savidge et al. (1995) Plant Cell, 7, 721-733 y la región promotora en 5’ del gen ZAG2 específico del carpelo de maíz (Thiessen et al. (1995) Gene, 156, 155-166). Opcionalmente, otras regiones promotoras adecuadas se obtienen de regiones en dirección 5’ de las secuencias codificantes del ADN genómico correspondientes a secuencias de ADNc que se sabe en la técnica que se expresan preferiblemente en las estructuras reproductivas femeninas. En ciertas realizaciones, tales sondas de ADNc se seleccionan del grupo que consiste en los genes de Arabidopsis Fbp7 y Fbp11 (Angenent et al., (1995) Plant Cell, 7, 1569-1582) y los ADNc específicos de orquídea 040, 0108, 039, 0126 y 0141 (Nadeau et al., (1996) Plant Cell, 8, 213-239). En realizaciones particulares, las regiones promotoras en 5’ que comprenden ADN genómico asociado con expresión preferencial en estructuras reproductivas femeninas se seleccionan de regiones de ADN comprendidas en el grupo que consiste en el clon de ADN genómico pSH64, con número de acceso NRRL B-21920, clon genómico pCIB10302 que se hibrida con el ADNc P26-A4 con número de acceso NRRL B-21655, y el clon de ADN genómico X2-1 que se hibrida con el clon de ADNc P19-QA, con número de acceso NRRL B-21919. En realizaciones particulares adicionales, estas regiones promotoras comprenden los nucleótidos 1 a 1390 de SEQ ID Nº 11, SEQ ID Nº 2 y nucleótidos 1 a 1093 de SEQ ID Nº 4 en el documento WO 98/39462. En realizaciones adicionales, otras regiones promotoras en 5’, adecuadas para uso en los genes quiméricos de la invención, se aíslan y clonan mediante métodos que son habituales para un experto en la técnica. Por ejemplo, nuevos transcritos expresados en estructuras reproductivas femeninas se identifican aislando ARN de tejidos como sedas de maíz o pistilos de trigo, seguido de la identificación diferencial usando técnicas como presentación diferencial, sustracción de ADNc seleccionado por PCR y construcción de bibliotecas de ADNc sustractivas. Clones de ADNc que se expresan preferentemente en los tejidos femeninos y no en otras partes de la planta, como las hojas, raíces y pendones. La especificidad tisular de la expresión se confirma, opcionalmente, mediante transferencia Northern. Los clones de ADNc se usan como sondas para la identificación de bibliotecas genómicas. Las regiones promotoras en 5’ y, opcionalmente, regiones de ADN no traducidas en 3’

asociadas con expresión preferencial de tejidos se obtienen de los clones de ADN genómico y se usan en la construcción de genes quiméricos para expresión preferente en estructuras reproductivas femeninas.

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

Otras regiones promotoras útiles en los genes quiméricos de la invención incluyen las regiones en dirección 5' del gen 13 de Osmads de arroz, el gen OSG de antera de arroz y el gen YY2 de arroz. Generalmente, se seleccionan como más adecuadas las regiones promotoras que producen expresión elevada, temprana, prolongada y preferente en estructuras reproductivas masculinas o femeninas. Las regiones promotoras pueden comprender también adicionalmente combinaciones quiméricas entre sí y con regiones potenciadoras adicionales.

Los genes quiméricos pueden comprender opcionalmente una región, que precede inmediatamente a la secuencia de ADN que codifica la enzima implicada en la conversión de la sustancia no fitotóxica en fitotoxina, que codifica una secuencia peptídica capaz de dirigir dicha enzima a organelos subcelulares como el cloroplasto, peroxisoma (en un caso distinto a aquel en que la fitotoxina es un anión peróxido o superóxido) o mitocondria, y dicha proteína direccionante puede tener la secuencia de (i) un péptido de tránsito cloroplástico o (ii) una porción N-terminal de un péptido de tránsito cloroplástico de una proteína cloroplástica o péptido de tránsito cloroplástico. Esto puede ser especialmente ventajoso cuando, por ejemplo y para fines comparativos, dicha secuencia de ADN codifica una enzima D-aminoácido deshidrogenasa, que se esperaría que funcionase mejor en un compartimento como la mitocondria o el cloroplasto que comprende una cadena de transporte de electrones de membrana o cuando, por ejemplo, la secuencia de ADN codifica una enzima que cataliza sólo una etapa parcial en la transformación global deseada y cuando la reacción completa requiere la combinación con metabolitos compartimentados y actividades endógenas. En particular, para dirigirse a la mitocondria, dicha región de ADN que precede inmediatamente a la secuencia de ADN que codifica la enzima, codifica una secuencia de péptido de tránsito mitocondrial. En ciertas realizaciones, la secuencia del péptido de tránsito se puede seleccionar del grupo que consiste en las secuencias del péptido de tránsito endógeno de la subunidad beta de la ATP sintasa mitocondrial de Nicotinia plumbanginifolia, isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP específica de mitocondria, subunidad que se une a NADPH del complejo de la cadena respiratoria I y triptofanil-tARN-sintetasa mitocondrial de levadura (documento WO 6121513).

Los polinucleótidos para uso en el presente método inventivo pueden comprender uno o más genes quiméricos que codifican enzimas que catalizan reacciones implicadas en la generación de fitotoxinas a partir de sustancias no fitotóxicas. Opcionalmente, dichos polinucleótidos comprenden genes y genes quiméricos adicionales, como un gen marcador quimérico. Un gen marcador quimérico, según se usa aquí, comprende un ADN marcador bajo el control de expresión de un promotor que es activo en células vegetales. El ADN marcador codifica un ARN, proteína o polipéptido que, cuando se expresa en una planta, tejido vegetal o célula vegetal, permite que tal material vegetal se distinga del material vegetal que no expresa el ADN marcador. Ejemplos de tales genes marcadores son genes que proporcionan un color específico a una célula, como el gen A1 (Meyer et al., (1987) Nature 330, 667), o genes que

vuelven a las células vegetales resistentes a selección con antibióticos, letal en otras circunstancias (por ejemplo, el gen aac(6') que codifica resistencia a gentamicina, documento WO 94/01560, o genes de higromicina fosfotransferasa que proporcionan resistencia a higromicina), o herbicidas como glifosato (por ejemplo, genes EPSPS, como en los documentos US 5510471 o WO 00/66748), fenmedifam (por ejemplo gen pmph, documentos US 5347047; US 5543306), bromoxinilo (por ejemplo genes descritos en el documento USP 4810648), sulfonilureas (por ejemplo, genes descritos en EP 0360750), dalapon (genes descritos en el documento WO 99/48023), cianamida (genes descritos en los documentos WO 98/48023; WO 98/56238) y genes que codifican resistencia a inhibidores de glutamina sintetasa, como L-fosfinotricina (como, por ejemplo, genes de N-acetil-transferasa descritos en los documentos EP 0242246, EP 0242246 y EP 0257542). En una realización preferida del polinucleótido de la presente invención, que comprende un gen de resistencia a herbicida como gen marcador, dicho herbicida es un herbicida que es útil para el control de malas hierbas en el cultivo y, adicionalmente, el gen de resistencia a herbicida se expresa suficientemente para proporcionar una fuerte tolerancia a las tasas de dicho herbicida en el terreno. En una realización adicional preferida, el herbicida es glifosato y el gen de resistencia a herbicida es una EPSP sintasa. Sin embargo, el gen marcador puede ser un gen que proporciona una selección positiva en la que el gen marcador codifica una enzima que proporciona una ventaja metabólica positiva a las células vegetales transformadas, en el contexto de un medio particular. El documento USP 5767378 describe diversos sistemas y genes de selección positiva adecuados.

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

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

Los polinucleótidos usados en el presente método inventivo pueden comprender opcionalmente uno o más potenciadores traduccionales localizados en las regiones no traducidas en 5' de las secuencias codificantes de proteínas. El experto en la técnica es conocedor de la identidad de tales potenciadores traduccionales adecuados - como las secuencias cebadoras Omega y Omega prima derivadas de TMV y las derivadas del virus del grabado del tabaco, y de cómo se pueden introducir dichos potenciadores traduccionales en el polinucleótido, para proporcionar el resultado deseado de expresión incrementada de proteínas. Ejemplos adicionales incluyen potenciadores traduccionales derivados del virus del moteado clorótico del maíz y del virus del mosaico de la alfalfa (Gallie et al., (1987) Nucl. Acids Res., 15, 8693-8711; Skuzeski et al., (1990) PMB., 15, 65-79). Para optimizar adicionalmente la expresión de proteínas a partir de genes quiméricos y de genes marcadores quiméricos, dichos polinucleótidos pueden comprender adicionalmente elementos como potenciadores, regiones de unión a armazón (SARS o MARS) e intrones. Se ha demostrado que varias secuencias de intrones, como el intrón adh 1 de maíz, potencian la expresión cuando se incluyen en la región no traducida en 5' de los genes y, opcionalmente, se usan en los genes quiméricos de la presente invención.

Las plantas que se han transformado según la invención para presentar las características de esterilidad masculina/femenina deseadas, se pueden haber transformado también con un polinucleótido que comprende regiones que codifican proteínas capaces de conferir al material vegetal que las contiene, al menos una de los siguientes rasgos agronómicamente deseables: resistencia a insectos, hongos, virus, bacterias, nemátodos, estrés, desecación y herbicidas.

Los genes que confieren resistencia a herbicidas se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que codifica las siguientes proteínas: glifosato oxidasa (GOX), EPSP sintasa, fosfinotricina acetil transferasa (PAT), hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD), glutationa S transferasa (GST), citocromo P450, acetil-CoA carboxilasa (ACCasa), acetolactato sintasa (ALS), protoporfirinógeno oxidasa (PPO), dihidropteroato sintasa, proteínas de transporte de poliaminas, superóxido dismutasa (SOD), bromoxinil nitrilasa, fiteno desaturasa (PDS), el producto del gen *tfd*A obtenible de *Alcaligenes eutrophus*, y variantes conocidas mutagenizadas o modificadas de otro modo de dichas

proteínas. El experto en la técnica reconocerá la necesidad de elegir tales genes, y los promotores que dirigen su expresión, cuidadosamente, teniendo en cuenta la naturaleza de la enzima utilizada para convertir la sustancia no fitotóxica. En caso de que el polinucleótido proporcione resistencia a múltiples herbicidas, tales herbicidas se pueden seleccionar del grupo que consiste en un herbicida de tipo dinitroanilina, triazolo-pirimidinas, un uracilo, una fenilurea, una tricetona, un ixoxazol, una acetanilida, un oxadiazol, una triazinona, una sulfonanilida, una amida, una anilida, un isoxaflutol, una fluorocloridona, un norflurazón y un herbicida de tipo triazolinona, y el herbicida post-emergencia se selecciona del grupo que consiste en glifosato y sus sales, glufosinato, asulam, bentazón, bialafos, bromacilo, setoxidim u otra ciclohexanodiona, dicamba, fosamina, flupoxam, fenoxi-propionato, quizalofop u otro ariloxi-fenoxipropanoato, picloram, fluormetrón, butafenacilo, atrazina u otra triazina, metribuzina, clorimurón, clorosulfurón, flumetsulam, halosulfurón, sulfometrón, imazaquina, imazetrapir, isoxabén, imazamox, metosulam, piritrobac, rimsulfurón, bensulfurón, nicosulfurón, fomesafén, fluroglicofén, KIH9201, ET751, carfentrazona, mesotriona, sulcotriona, paraquat, diquat, bromoxinilo y fenoxaprop.

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

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

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

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

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

Las plantas estériles masculinas de la presente invención son útiles en un método para producir semilla de trigo híbrido, que comprende las etapas de:

(i) transformar material vegetal con un polinucleótido o vector que comprende un gen que confiere esterilidad masculina condicional tras la aplicación exógena de un proherbicida u otra sustancia no fitotóxica;

(ii) seleccionar el material así transformado; y

(iii) regenerar el material así seleccionado en plantas completas condicionalmente estériles masculinas, morfológicamente normales;

(iv) obtener una línea parental femenina, condicionalmente estéril masculina homozigótica;

(v) transformar el material vegetal con un polinucleótido o vector que comprende un gen que confiere

esterilidad femenina condicional con la aplicación exógena del mismo proherbicida o sustancia no fitotóxica que en (i);

(vi) seleccionar el material así transformado; y

(vii) regenerar el material así seleccionado en plantas completas condicionalmente estériles femeninas, morfológicamente normales

(viii) obtener una línea parental masculina condicionalmente estéril femenina homozigótica;

(ix) plantar intercaladamente dichas líneas parentales masculinas y femeninas condicionalmente estériles en una proporción tal que asegure la polinización eficiente;

(x) aplicar dicho proherbicida u otra sustancia no fitotóxica a las líneas progenitoras plantadas intercaladamente, en una dosis y en una etapa del desarrollo tal que se minimice la autofertilización;

(xi) cosechar semilla de trigo híbrido de las plantas progenitoras plantadas intercaladamente.

La presente invención proporciona así mismo variantes del método anterior, en las que el progenitor masculino es estéril femenino por cualquier medio, el progenitor femenino es estéril masculino por cualquier medio, las líneas parentales masculina y femenina son condicionalmente estériles dependiendo de la aplicación de sendos proherbicidas distintos, que se aplican, y el cultivo es diferente de trigo.

La presente solicitud también describe un kit de diagnóstico que comprende medios para detectar las proteínas, o secuencias de ADN que las codifican, que están presentes en plantas producidas según el presente método inventivo y por lo tanto son adecuadas para identificar tejidos o muestras que los contienen. Las secuencias de ADN se pueden detectar mediante amplificación por PCR como conoce el experto – basándose en cebadores que él puede obtener fácilmente de las secuencias codificantes de enzimas que se describen o mencionan en esta solicitud. Las enzimas *per se* se pueden detectar, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos que se han originado frente a ellas para distinguir en forma de diagnóstico las regiones antigénicas que contienen.

La presente solicitud también describe un método para producir D-fosfinotricina (D-PPT) enantioméricamente pura, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar células que contienen una enzima capaz de N-acilar selectivamente PPT;

(b) hacer crecer dichas células en un medio que contiene D-L PPT para producir medio acondicionado;

(c) separar las células del medio acondicionado de (b);

(d) extraer opcionalmente el medio acondicionado con un disolvente no miscible, no acuoso, a diversos pHs, de manera que la fracción que contiene PPT se separa de la fracción que contiene moléculas más solubles en agua que PPT;

(e) mezclar opcionalmente con los medios acondicionados o extraídos que contienen PPT de la etapa (d) una resina de intercambio catiónico en su forma protonada, en una cantidad, y a pH, suficiente para absorber una proporción sustancial de los cationes – distintos de PPT, del medio;

(f) mezclar con el medio acondicionado, con el medio extraído o con el medio que resulta de la etapa (e) una resina de intercambio catiónico en su forma protonada, en una cantidad, y a un pH, suficiente para unir el grueso de la PPT en el medio;

(g) recoger la resina de intercambio iónico catiónico de la etapa (f) a la que está unida la PPT y eluir selectivamente la PPT de ella usando un medio eluyente que tiene un pH y fuerza iónica suficientes, con la condición de que el pH de dicho medio eluyente no sea tan bajo como para causar la racemización de la PPT así eluida.

Respecto a la transformación del material vegetal, los expertos en la técnica reconocerán que, aunque se especifiquen en los ejemplos más adelante tipos particulares de material diana (por ejemplo cultivo en suspensión de células embriogénicas o embriones inmaduros que se están desdiferenciando) y métodos particulares de transformación (por ejemplo usando Agrobacterium o bombardeo de partículas), la presente invención no está limitada a estas realizaciones particulares y tales materiales diana, y métodos se pueden usar de forma intercambiable. Además, la expresión “células vegetales”, según se usa a lo largo de la descripción de la invención, se puede referir a células aisladas, incluyendo cultivos en suspensión, así como a células en tejidos intactos o parcialmente intactos, como embriones, escutelo, microspora, embrión derivado de la microspora o células somáticas de órganos vegetales. De forma similar, aunque los ejemplos específicos se limitan a maíz y trigo, la invención es igualmente aplicable a un amplio rango de cultivos agrícolas que se pueden transformar usando métodos adecuados de transformación de células vegetales.

La presente invención estará más clara a partir de los siguientes ejemplos no limitantes, tomados junto con el listado de secuencias y los dibujos asociados.

SEC ID NO: 1 muestra una secuencia de ADN, aislada de *Synechocystis sp*. que codifica una enzima (representada como SEC ID NO: 2) que tiene la actividad de una esterasa B.

SEC ID NO: 3 muestra una secuencia de ADN, aislada de *Neurospora crassa* que codifica una enzima (representada como SEC ID NO: 4) que tiene la actividad de una secuencia de acil-metilacil-CoA racemasa.

SEC ID NO: 5 y 6 representan los cebadores de PCR usados para obtener la región promotora TA29

SEC ID NO: 7 representa una secuencia de ADN, aislada de (*Rhodotorula gracilis*, que codifica una enzima con actividad de D-aminoácido oxidasa.

SEC ID NO: 8 y 9 representan oligos degenerados usados para proporcionar una D-amino oxidasa variante.

SEC ID NO: 10 y 11 representan motivos en los que aminoácidos alternativos se pueden sustituir a fin de proporcionar D-aminoácido oxidasas variantes.

La Figura 1 es una representación esquemática de una construcción para la transformación de tabaco, que tiene D-aminoácido oxidasa de Rhodotorula bajo el control operable de la región promotora stig 1. Los componentes indicados son LB (secuencia del límite izquierdo), AOPRE1 (promotor AoPR1, PSTIG1 (nº de acceso de EMBL X77823), RGDAO (OPT) (SEC ID NO: 7), PROMOTOR PC (nº de acceso de EMBL X16082), PAT (nº de acceso de EMBL A02774), NOS (terminador nos obtenido del nº de acceso de EMBL atu237588) y RB (secuencia del límite derecho).

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

La Figura 3a es un mapa de Ubi-CoA sintetasa plasmídica, en el que PUB11-01-01 tiene el número de acceso de EMBL SM29159 y Coa sintetasa tiene el número J05439.

La Figura 3b es un mapa de la Ubi-Epimerasa, en el que epimerasa tiene un número de acceso de EMBL Y0817Z.

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

En su mayor parte, los siguientes ejemplos comprenden cada uno ejemplificaciones múltiples de la presente invención o ejemplos para fines comparativos. Cuando se usa la expresión "región promotora de un gen", se considera que significa secuencias de ADN que comprenden el promotor, secuencias en dirección 5' del promotor, y también, opcionalmente, toda o parte de la secuencia de ADN que codifica la región líder no traducida en 5' del ARNm.

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

La secuencia de ADN que codifica la secuencia de la proteína D-aminoácido oxidasa Q99042 (Swissprot) comprendida en la secuencia EMBL Z50019 se obtiene, bien mediante RT-PCR a partir de ARNm de Trigonopsis variabilis, o se obtiene sintéticamente. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la secuencia de la proteína D-aminoácido oxidasa P80324 (Swissprot) incluida en la secuencia de EMBL A56901, se obtiene, bien mediante RT-PCR del ARNm de Rhodosporidium toruloides (Rhodotorula gracilis) o se obtiene sintéticamente (lo que hace más fácil controlar qué sitios internos de enzimas de restricción están presentes y crear sitios flanqueantes para facilitar la clonación) como por ejemplo SEC ID NO 7, que se diseña para dar cuenta del uso del codón de la planta (en este caso trigo), y para minimizar las características del ADN potencialmente desfavorables para la expresión. Alternativamente, la secuencia de ADN (por ejemplo derivada de la de nº de acceso de EMBL X95310) codifica una "D-aspartato oxidasa" como P31228 (Swiss Prot) y, de nuevo, se sintetiza para dar cuenta del uso del codón de la planta y para minimizar las características desfavorables para la expresión. Alternativamente, las secuencias codificantes de D-aminoácido oxidasa obtenidas son las mismas que en el ejemplo 2. Las secuencias flanqueantes del cebador de PCR y las secuencias de ADN sintéticas se diseñan para establecer sitios de restricción únicos útiles para la clonación. Preferiblemente, y en el caso en que la secuencia codificante de oxidasa no contenga sitios internos confusos, se coloca un sitio Nco1 o Nde 1 en el extremo 5', para facilitar la clonación de fusiones en el marco de lectura con secuencias añadidas al ORF en 5', como secuencias codificantes del péptido de tránsito cloroplástico. En algunas variantes del ejemplo, el gen de la D-aminoácido oxidasa (denominada en algunas variantes "D-aspartato oxidasa") se clona de tal forma que los aminoácidos 3 terminales están truncados y la enzima codificada, por tanto, ya no es dirigida al peroxisoma. En una serie adicional de variantes del método, el gen se

obtiene mediante ingeniería genética por PCR, para codificar la D-aminoácido oxidasa de Rhodotorula gracilis con aminoácidos alternativos en posiciones 213 y 238 y, en particular con una arginina, serina, cisteína, lisina, asparagina o alanina que sustituye a la metionina en posición 213, y/o una histidina, serina, cisteína, asparagina o alanina que sustituye a la tirosina en posición 238. La metionina en posición "213" se identifica como M en el motivo de la secuencia de la proteína nativa RCTMDSS. La tirosina en posición 238 se identifica como "Y" en el motivo de la secuencia de la proteína nativa GGTYGVG. Estas variantes de la D-aminoácido oxidasa de Rhodotorula o la "D-aspartato oxidasa" se usan cuando la esterilidad femenina se tiene que hacer condicional tras la aplicación de D-aspartato, D-glutamato o D-fosfinotricina.

Se pueden colocar sitios de restricción en dirección 5' de las secuencias intervinientes del sitio de inicio de la traducción ATG que concuerden con las secuencias consenso de traducción de la planta, como aquéllas según Kozak.

El promotor "delta S13" es una región promotora útil para obtener expresión preferente en partes de la flor femeninas. Éste comprende una región -339 a -79 desde la región promotora SLG13, fusionada con la que va de -46 a + 8 del promotor nuclear CMV 35S (Dzelkains et al (1993) Plant Cell, 5, 833-863). Esta región promotora S13 se clona en el plásmido bluescript sk, el cual se somete nuevamente a restricción y se liga con fragmentos de restricción que comprenden la región terminadora transcripcional nos 3' y una u otra de las secuencias codificantes de aminoácido oxidasa, de forma que se cree un casete de expresión "delta S13-D-aminoácido oxidasa-terminador Nos" dentro de un plásmido bluescript sk. Éste se elimina entonces mediante restricción adecuadamente como, por ejemplo, en forma de fragmento EcoR1 y, como tal, se vuelve a ligar en un sitio adecuado en un vector como Pbin19 (Bevan (1984) Nucleic Acids Res.) o pCIB200 o pCIB2001 (documento WO 98/39462) a fin de usarlo para transformación usando Agrobacterium. Como se describe en el documento WO 98/39462, pCIB200 contiene los siguientes sitios de restricción de poliligador únicos: EcoR1, Sst1, Kpn1, BglII, Xaba1 y SalI. PCIB 2001 contiene una inserción en el poliligador, que añade sitios de restricción únicos adicionales, que incluyen MluI, BclI, AvrII, ApaI, HpaI y StuI. PCIB200 y pCIB2001 también proporcionan genes marcadores seleccionables para selección vegetal y bacteriana en kanamicina, límites izquierdo y derecho de ADN-T, la función trfA derivada de RK2 para movilización entre E. coli y otros hospedantes y las funciones oriT y oriV de RK2. Alternativamente, se usa el vector binario Pcib10, que incorpora secuencias del plásmido Prk252 de amplio ámbito de hospedantes (Rothstein et al (1987) Gene 53, 153-161), o se usa uno de sus derivados que incorpora genes de resistencia a kanamicina y el gen de higromicina fosfotransferasa, como Pcib715 (Gritz et al (1983) Gene 25, 179-188).

Alternativamente, se usa la región promotora Stig 1 ~ 1,6 kb (derivada del nº de acceso de EMBL X77823). Por ejemplo, la región codificante del gen GUS en la construcción stg1-GUS, descrita por Goldman et al (1994) en EMBO J., 13, 2976-2984, se reemplaza por la secuencia de ADN que codifica las secuencias codificantes P80324 o Q99042, usando enzimas de restricción adecuadas, y la construcción de expresión stig1-D-aminoácido oxidasa resultante se clona en un vector adecuado como pCIB200 en una posición en dirección 5' de una secuencia terminadora en 3' adyacente a un gen marcador adecuado y entre secuencias límite de ADN-T.

En un ejemplo particular adicional, el inserto de ADN-T comprendido en el vector binario se construye según la figura 1. Se clona una construcción que comprende la secuencia de ADN sintética (SEC ID NO 7) que codifica la D-aminoácido oxidasa de Rhodotorula gracilis bajo el control operable de la región promotora stig1 y también la secuencia de ADN (A02774) que codifica la L-fosfinotricina-N-acetil transferasa (PAT) bajo el control operable de la región promotora de plastocianina de guisante, en un sitio entre el gen LB/upt II y el RB del ADN-T del vector binario. En resumen, la secuencia ID NO 7 se clona en el plásmido pFse4-Stig1nos (descrito en el doc WO9942598) detrás del promotor Stig1 y frente a la región terminadora nos (comprendida en EMBL ATU237588), como un fragmento NcoI/PstI. La región promotora de plastocianina de guisante (derivada del nº de acceso de EMBL X16082), se obtiene del ADN genómico de guisante mediante PCR y se clona frente al gen PAT/terminador nos. El casete PC-PAT-nos resultante se clona detrás del Stig 1 - RGDAMOX-nos, como un fragmento NotI, y esta construcción completa de dos genes se transfiere a un vector binario (Pvb6, un derivado de Bin19), como un fragmento FseI.

En una variante adicional del método, la construcción usada está de acuerdo con la representación esquemática de la figura 2. La secuencia codificante de la D-aminoácido oxidasa de Rhodotorula, SEC ID NO 7, opcionalmente mutada mediante mutación dirigida para codificar la forma M213R, se trunca mediante 3 codones en el extremo 3', y en el extremo 5' se clona para colocarla inmediatamente en dirección 3' de una región que codifica un péptido de tránsito cloroplástico, de forma que se codifica una proteína de fusión de péptido de tránsito cloroplástico/D-aminoácido oxidasa. La secuencia codificante del péptido de tránsito cloroplástico deriva del gen de Arabidopsis que codifica la subunidad pequeña de la EPSP sintasa (Klee et al, 1987 en Mol- Gen. Genet., 210, 437). Opcionalmente, ésta está modificada para incluir un sitio Sph1 en el sitio de procesamiento de CTP, reemplazando por tanto la Glu-Lys en este sitio por Cys-Met (SEC en Fig. 9 del documento WO 92044490). Correspondientemente, se puede incorporar mediante ingeniería genética un sitio SPh1 en el término N de la secuencia codificante de D-aminoácido oxidasa (convirtiendo el aminoácido a continuación de la metionina en una Leu). Alternativamente, la secuencia codificante del péptido de tránsito cloroplástico deriva del gen de Petunia que codifica EPSP sintasa (Fig. 11 del documento WO 92044490). Alternativamente, la secuencia codificante del péptido de tránsito cloroplástico es una de un gran número de posibilidades que incluyen aquéllas derivadas de genes que codifican la subunidad pequeña de Rubisco y que incluye la así denominada secuencia del péptido de tránsito quimérica "optimizada" (documento FR 2673643). En todos los casos, más que basarse en la subclonación, la secuencia de ADN deseada total que codifica

el polipéptido de fusión de péptido de tránsito cloroplástico/D-aminoácido oxidasa de Rhodotorula, se puede obtener simplemente de forma sintética. Esta secuencia se clona en un sitio en dirección 3' de la región promotora stig1 y en dirección 5' de una secuencia terminadora (por ejemplo nos), dentro de un vector adecuado (por ejemplo, reemplazando la secuencia codificante de GUS en el vector que contiene la construcción stig1 → GUS, descrito por Goldman et al. (1994) en EMBO J., 13, 2976-2984). La construcción de expresión génica total se clona entonces en un sitio adecuado entre los límites derecho e izquierdo del ADN-T de un vector PVB6.

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

En una variante del método, el aminoácido aplicado es DL-fosfinotricina racémica. En este caso, la construcción de ADN usada para la transformación comprende, además de la secuencia de ADN que codifica una D-aminoácido oxidasa bajo el control de expresión operable de una región promotora floral femenina específica de tejido como "stig 1", también una secuencia de ADN (EMBL A02774) un gen "PAT" bajo el control operable de una región promotora como la región 5' del inicio de la traducción del gen de plastocianina de Pisum sativum (nº de acceso EMBL X16082). Por ejemplo, la construcción es la misma que se representa en Fig. 1, excepto porque la secuencia de ADN que codifica la D-aminoácido oxidasa está mutada de forma específica para el sitio, de manera que se codifica la forma M213R de la enzima. La región promotora de plastocianina proporciona la expresión preferente en los tejidos verdes de la planta. Se descubre, inesperadamente, que tal promotor, que, a diferencia por ejemplo de la región promotora 35S, se expresa sustancialmente sólo en ciertos tejidos de la planta y más marcadamente en tejidos verdes, proporciona sin embargo, cuando se usa en combinación con el gen PAT, una tolerancia reproductiva completa al herbicida DLPPT, incluso en tasas en exceso de 2 kg/ha. Además, en ausencia de cualquier D-aminoácido oxidasa heteróloga adecuada, o actividad convertidora de D a L similar coexpresada en los tejidos florales, la combinación plastocianina/gen PAT proporciona una tolerancia reproductiva esencialmente completa, sin ninguna pérdida de rendimiento significativa, a pesar de que el nivel de expresión de PAT sea bajo o inexistente en muchos de los tejidos florales críticos, cuando se expresa bajo el control de esta región promotora. De este modo, en esta variante del ejemplo, la sustancia no fitotóxica D-fosfinotricina se aplica en su forma menos costosa y más fácilmente disponible, como el herbicida comercial racemato de DL-fosfinotricina. En tasas e intervalos de tiempo de pulverización adecuados entre 250 g/ha y 5 kg/ha de DL-fosfinotricina, las plantas tratadas no se dañan visiblemente pero se vuelven condicionalmente estériles femeninas, mientras que permanecen fértiles masculinas normales o casi normales.

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

La secuencia de ADN que codifica la secuencia de la proteína D-aminoácido oxidasa Q9HGY3 (Sptrembl) incluida en la secuencia de EMBL AB042032 se obtiene bien por RT-PCR de ARNm de Candida boidini o se obtiene sintéticamente. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la secuencia de la proteína D-aminoácido oxidasa P24552 (Swissprot) incluida en la secuencia de EMBL D00809 se obtiene bien por RT-PCR del ARNm de Fusarium solani o se obtiene sintéticamente. Las secuencias flanqueantes del cebador de PCR o de ADN sintéticas se diseñan para situar sitios de restricción único útiles para la clonación. Preferiblemente, y en el caso en el que la secuencia codificante de oxidasa no contenga sitios internos confusos, se coloca un sitio Nco1 o Nde1 en el extremo 5' para facilitar la clonación de fusiones dentro del marco de lectura con secuencias añadidas 5' al ORF. Alternativamente, cuando los sitios de restricción se colocan en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción ATG, se diseñan secuencias intervinientes para que estén de acuerdo con secuencias consenso de traducción de plantas según Kozak. Alternativamente, las secuencias que codifican D-aminoácido oxidasa obtenidas son las mismas que en el ejemplo 1. De nuevo, como en el ejemplo previo, cuando la esterilidad se tiene que hacer dependiente de la aplicación de D-aspartato, D-glutamato o D-fosfinotricina, entonces, preferiblemente, las D-aminoácido oxidasas son variantes en las posiciones de los aminoácidos 213 y/o 238.

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

Alternativamente, cualquiera de las regiones de las secuencias codificantes de D-aminoácido oxidasa anteriores se clonan como fragmentos de restricción adecuados (por ejemplo BamH1, BgI/II, en los que las variantes sintéticas de las secuencias codificantes se diseñan para eliminar los sitios de restricción internos) y se fusionan con el promotor de CaMv 35S y las regiones terminadoras de nopalina sintasa mediante inserción (por ejemplo) en el sitio BamH1 del vector binario pROKI (Baulcombe Et al (1986) Nature, 321, 446-449) en una configuración en sentido directo. A continuación, se escinde el fragmento EcoR1-BamH1 que porta la región promotora 35S y se reemplaza con un fragmento EcoR1-BamH1 de pAP30 (Kriete et al. (1996) The Plant Journal 9, 809-818) que lleva el fragmento de la región promotora TA29s (-810 a +54). Los vectores resultantes se pueden denominar pGKTA29_Q99042, pGKTA29_P80324, pGKTA29_Q9HGY3 y pGKTA29_P24552, etc., según la secuencia de proteína codificada.

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

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

De forma análoga al ejemplo 1, en una variante del ejemplo, el aminoácido aplicado es DL-fosfinotricina racémica. En este caso, la construcción de ADN usada para la transformación comprende, además de la secuencia de ADN que codifica la D-aminoácido oxidasa bajo control de expresión operable de una región promotora floral masculina específica de tejido, como "TA29", también una secuencia de ADN que codifica un gen de fosfinotricina N-acetil

transferasa, como el gen “PAT”, bajo el control operable de una región promotora, como la del gen de plastocianina (en este caso la región del gen de plastocianina de Pisum sativum). A tiempos y tasas de pulverización apropiados entre 250 g/ha y 5 kg/ha de DL-fosfinotricina, las plantas tratadas no están dañadas visiblemente, pero se vuelven condicionalmente estériles masculinas, mientras que permanecen fértiles femeninas normales, o casi normales.

Ejemplo 3 Comparativo. Genes quiméricos expresados preferentemente en estructuras reproductivas masculinas y que codifican enzimas capaces de hidrolizar imazametabenz metilo o flamprop M metilo o flamprop M isopropilo en sus ácidos carboxílicos respectivos

La secuencia de ADN que codifica la secuencia de la proteína carboxilesterasa Q01470 (Swissprot) de la secuencia de EMBL M94965 mediante PCR a partir de ADN genómico de Arthrobacter oxydans o se obtiene sintéticamente. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la secuencia de proteína carboxilesterasa P37967 (Swissprot) en la secuencia de EMBL BS06089 se obtiene mediante PCR a partir de ADN genómico de Bacillus subtilis o se obtiene sintéticamente. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la secuencia de proteína P40363 (Swissprot) en la secuencia de EMBL Z34288 se obtiene mediante RT-PCR a partir de ARNm de Saccharomyces cervisiae o se obtiene sintéticamente. Las secuencias de flanqueo del cebador de PCR o de ADN sintéticas se diseñan para colocar sitios de restricción únicos útiles para la clonación. Preferiblemente, y en el caso en el que la secuencia codificante de carboxilesterasa no contenga sitios internos confusos, se coloca un sitio Nco1 o Nde 1 en el extremo 5’, para facilitar la clonación de fusiones en el marco de lectura con secuencias añadidas al ORF en 5’. Alternativamente, cuando los sitios de restricción se colocan en dirección 5’ del sitio de inicio de la traducción ATG, se diseñan secuencias intervinientes para que estén de acuerdo con secuencias consenso de traducción de plantas según Kozak.

El plásmido pGK73 porta el fragmento EcoR1-BamH1 de la región promotora TA29s desde -810 hasta +54 (Kriete et al (1996), 9, 809-818). Este fragmento de restricción o un fragmento generado mediante PCR adecuado similar se clona, preferiblemente como una fusión en el marco, en una posición en dirección 5’ de la secuencia de ADN que codifica carboxilesterasa Q01470 o P37967 en bluescript sk. Usando una serie adecuada de etapas de restricción, ligación y subclonación, se añade un terminador transcripcional nos 3’ de la región codificante para generar, según la secuencia codificante, casetes de expresión alternativos del tipo TA29-carboxilesterasa-nos en plásmidos Bluescript sk, pBLTA_Q01470, pBLTA_P37967 y pBLTA_P40363.

En un ejemplo adicional, se usa la región promotora SGB6 específica delantera, sec ID número 1 del documento USP 5470359. Por ejemplo, pSGBNE1 que contiene un fragmento subclonado EcoR1-Nhe1 genómico de 3 kb procedente de pSGB6g1 (documento USP 5470359) se subclonó adicionalmente para colocar un fragmento ApaII/Xba1 de 1558 pb clonado de forma roma en bluescript ks en el sitio SmaI. Como antes, a través de etapas adicionales de restricción y clonación, este fragmento se fusiona en dirección 5’ en el marco de las secuencias codificantes de ADN P37967, Q01470 o P40363. Nuevamente, se añade un terminador nos 3’ de la región codificante para crear plásmidos Bluescript sk alternativos, pBLB6_Q01470, pBLB6_P37967 y pBLB6_P40363, que comprenden los casetes de expresión alternativos SGB6-carboxilesterasa-nos.

En un conjunto similar de ejemplos, la región promotora específica delantera RA8 del arroz (acceso EMBL/genbank AF042275; Jean Js et al (1999) PMB, 39, 35-44) se fusiona también de forma similar en un sitio en el marco y en dirección 5’ de una u otras de las secuencias de ADN que codifican carboxilesterasa y un terminador nos en 3’ para comprender casetes de expresión alternativos de RA8-carboxilesterasa-nos en una serie de vectores bluescript sk, pBLRA8_Q01470, pBLRA8_P37967 y pBLRA8_P40363.

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

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

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

Alternativamente, según se describe en el documento WO 98/39462, se escinde un fragmento Pst I/Nco I de la región promotora en 5' del gen P19, del clon genómico X2-1, que se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest el 27/02/1998 en NRRL y al cual se asignó el número de acceso B-21919. El sitio Nco I en el nucleótido 1088 de SEC ID NO 14 del documento WO 98/39462 corresponde al inicio de la traducción ATG del gen P19. Usando etapas apropiadas de subclonación, restricción, ligamiento y PCR, este fragmento se liga para formar una fusión en marco de lectura con una u otra de las secuencias de ADN que codifican D-aminoácido oxidasa y se añade una secuencia terminadora nos en posición 3' respecto de la secuencia codificante. Consecuentemente, se crea una serie de vectores Bluescript pBLP19_Q99042, pBLP19_P80324, pBLP19_Q9HGY3 y pBLP19_P24552, etc., que codifican los casetes de expresión alternativos P19-D-aminoácido oxidasa-nos. Alternativamente, usando métodos estándar similares, se obtienen plásmidos similares que tienen la región promotora en 5' (que comprende algunos o todos los nucleótidos 1-3987 de SEC ID NO 2 del documento WO 98/39462) del gen P26 en lugar de la región promotora de P19. El clon P26-A4 genómico, pCIB10302, depositado bajo los términos del Tratado de Budapest el 21 de enero de 1997 con el nº de acceso de la colección de cultivos de patentes del Agricultural Research Service (NRRL) NRRL B-21655, se subclonó según se describe en el documento WO 98/39462. Consecuentemente, se crea una serie de vectores Bluescript pBLP26_Q99042, pBLP26_P80324, pBLP26_Q9HGY3 y pBLP26_P24552, que codifican los casetes de expresión alternativos P19-D-aminoácido oxidasa-nos.

Ejemplo 5. Genes quiméricos expresados preferentemente en estructuras reproductivas masculinas y que codifican enzimas capaces de oxidar D-fosfinotricina y/o D-alanina y/o D-leucina y/o D-metionina y/o D-asparagina y/o D-aspartato y/o D-glutamato

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

El plásmido pGK73 porta el fragmento EcoR1-BamH1 de la región promotora TA29s desde -810 hasta +54 (Kriete et al (1996), 9, 809-818). Este fragmento de restricción o un fragmento generado mediante PCR adecuado similar se clona, preferiblemente como una fusión en el marco, en una posición en dirección 5' de la secuencia de ADN que codifica la D-aminoácido oxidasa en bluescript sk. Usando una serie adecuada de etapas de restricción, ligación y subclonación, se añade un terminador transcripcional nos 3' de la región codificante para generar, según la secuencia codificante, casetes de expresión alternativos del tipo TA29-D-aminoácido oxidasa-nos en plásmidos Bluescript sk.

En un ejemplo adicional, se usa la región promotora SGB6 específica delantera, sec ID número 1 del documento USP 5470359. Por ejemplo, pSGBNE1 que contiene un fragmento subclonado EcoR1-Nhe1 genómico de 3 kb procedente de pSGB6g1 (documento USP 5470359) se subclonó adicionalmente para colocar un fragmento ApaII/Xba1 de 1558 pb clonado de forma roma en bluescript ks en el sitio SmaI. Como antes, a través de etapas adicionales de restricción y clonación, este fragmento se fusiona en dirección 5' en el marco de las secuencias codificantes de D-aminoácido oxidasa. Nuevamente, se añade un terminador nos 3' de la región codificante para crear plásmidos Bluescript sk alternativos, que comprenden los casetes de expresión alternativos SGB6-D-aminoácido oxidasa-nos.

En un conjunto similar de ejemplos, la región promotora específica delantera RA8 del arroz (acceso EMBL/genbank AF042275; Jean Js et al (1999) PMB, 39, 35-44) se fusiona también de forma similar en un sitio en el marco y en dirección 5' de una u otras de las secuencias de ADN que codifican D-aminoácido oxidasa y un terminador nos en 3' para comprender casetes de expresión alternativos de RA8-D-aminoácido oxidasa-nos en una serie de vectores bluescript.

Ejemplo 6. Un par de construcciones complementarias útiles en un método para proporcionar (a) una línea parental consanguínea femenina, que es condicionalmente estéril masculina, dependiente de la aplicación de DL-fosfinotricina y (b) una línea parental consanguínea masculina complementaria, que es condicionalmente estéril femenina, dependiente de la aplicación de DL-fosfinotricina.

La primera construcción de ADN adecuada para proporcionar una línea parental consanguínea femenina de plantas de arroz o cereal, que es condicionalmente estéril masculina, dependiente de la aplicación de DL-fosfinotricina, comprende tres genes A), B) y C). A) consiste en una secuencia de ADN que codifica una enzima PAT, capaz de N-acetilar L-fosfinotricina bajo el control operable de la región promotora de ~ 1 kb del gen de plastocianina de cebada (EMBL Z28347) y una región terminadora adecuada como la del gen nos o 35S, B) consiste en una secuencia codificante de PAT similar a la primera, pero esta vez bajo el control operable de una región promotora floral femenina específica de tejido (como P19 o P26, según se describe en el ejemplo 4), más un terminador adecuado; y C) consiste en una secuencia codificante de DAMOX adecuada, según se describe en los ejemplos 1, 2, 12 y 13, por ejemplo, un mutante de la D-aminoácido oxidasa de Rhodotorula gracilis que tiene una arginina, serina, cisteína, lisina, asparagina o alanina que sustituye a la metionina en la posición 213 y/o una histidina, serina, cisteína, asparagina o alanina que sustituye a la tirosina en posición 238, bajo el control operable de una región promotora floral masculina específica de tejido (como SGB6 o RA8, según se describió en el ejemplo 5), y una región terminadora adecuada. Esta construcción se ensambla usando métodos que son estándar en la técnica y se describen en los ejemplos previos.

La segunda construcción de ADN adecuada para proporcionar una línea parental consanguínea masculina de plantas de cereal o arroz, que es condicionalmente estéril femenina dependiente de la aplicación de DL-fosfinotricina, comprende tres genes A), D) y F). A) consiste en una secuencia de ADN que codifica una enzima PAT capaz de N-acetilar L-fosfinotricina bajo el control operable de la región promotora del gen de plastocianina de cebada y una región terminadora adecuada, como la del gen nos o 35S; D) consiste en una secuencia PAT, similar a la primera, pero esta vez bajo el control operable de la misma región promotora floral masculina específica de tejido (como SGB6 o RA8, según se usan en el ejemplo 5), como se usa en la construcción 1, más un terminador adecuado; y F) consiste en un gen DAMOX adecuado, según se describió en los ejemplos 1, 2, 12 y 13, y, por ejemplo, que codifica una forma mutante de la D-aminoácido oxidasa de Rhodotorula gracilis que tiene una arginina, serina, cisteína, lisina, asparagina o alanina que sustituye a la metionina en posición 213 y/o una histidina, serina, cisteína, asparagina o alanina que sustituye a la tirosina en posición 238, bajo el control operable de la misma región promotora floral femenina (como P19 o P26, según se describió en el ejemplo 4), según se usa en la construcción 1, y una región terminadora adecuada. Esta construcción se ensambla usando métodos que son estándar en la técnica y se describen en los ejemplos previos.

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

Construcción 1

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

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

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

Construcción 2

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

D = región promotora RA8 → secuencia codificante de PAT, terminador 35S;

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

Ejemplo 7. Vectores polinucleotídicos para transformación de trigo

Los ejemplos 3, 4, 5 y 6 describen la construcción de varios genes quiméricos en casetes de expresión que se clonan usualmente en Bluescript sk (por ejemplo, pBLRA8_Q01470, pBLRA8_P37967, pBLRA8_P40363, pBLB200_Q99042, pBLB200_P80324, pBLB200_Q9HGY3 y pBLB200_P24552, etc.). Opcionalmente, estos vectores se preparan a granel para la transformación de ADN directa para uso con un marcador seleccionable bombardeado conjuntamente, como pSOG35 (DHFR/metotrexato) o pUbi-Hyg (higromicina fosfotransferasa/higromicina), según se describe en el documento WO 98/39462. Preferiblemente, tras la preparación a granel, los vectores se linealizan usando una enzima de restricción adecuada para eliminar el gen de resistencia a ampicilina de Bluescript.

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

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

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

Se obtienen preparaciones de ADN a gran escala para uso en transformación de plantas usando el procedimiento

Maxi-prep (Qiagen), usando los protocolos proporcionados por el fabricante.

Ejemplo 8. Tranformación/regeneración de trigo con polinucleótidos que comprenden genes quiméricos expresados preferentemente en estructuras reproductivas masculinas o femeninas, y que codifican enzimas capaces de oxidar D-fosfinotricina y/o D-alanina y/o D-leucina y/o D-metionina y/o D-asparagina y/o D-aspartato y/o D-glutamato

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

El ADN preparado según se describe en el ejemplo 7 y en los ejemplos posteriores, se precipita sobre partículas de oro de tamaño micrométrico, usando procedimientos estándar. Cuatro placas diana con 16 embriones por diana se bombardean dos veces con un dispositivo de helio de DuPont Biolistics, usando una presión de estallido de 1100 psi. Las placas se bombardean con un tamiz de malla 80 colocada entre la etapa portadora y la diana. Tras el bombardeo, las dianas se colocan en la oscuridad a 25ºC durante 24 h antes de que las capas con los embriones se depositen sobre placas de medio MS que contiene sacarosa al 3% y 3 mg/l de 2,4-D. Los embriones individuales se eliminan de las láminas y se colocan directamente en medio recién preparado de la misma composición tras otras 48 h. Aproximadamente 6 semanas después del suministro de genes, el tejido se coloca sobre medio MS con 3 mg/l de 2,4-D, sacarosa al 3% y 0,2 mg/l de metotrexato, durante un período de 3 semanas. El tejido se coloca luego en medio de regeneración que comprende medio MS que contiene 1 mg/l de ribósido de zeatina y 1 mg/l de metotrexato. Tras 2 semanas de regeneración, las plántulas se colocan en contenedores estériles con medio MS de fuerza media que contiene sacarosa al 2%, 1 mg/l de ácido naftil-acético y 4 mg/l de metotrexato.

En variantes particulares del ejemplo, los vectores que comprenden genes quiméricos expresados preferentemente en estructuras reproductivas masculinas se cobombardean con genes marcadores seleccionables alternativos. Así, por ejemplo, se prepara ADN de plásmidos como pBLRA8_P24552, obtenido de modo análogo al Ejemplo 3 (pero que expresa una secuencia de D-aminoácido oxidasa en lugar de una carboxilesterasa), bajo el control operable de la región promotora RA8 y se reviste sobre partículas de oro junto con pUbiHyg (un plásmido que codifica higromicina fosfotransferasa bajo el control operable del promotor de poliubiquitina de maíz). En este caso, la transformación y regeneración se realiza según se describió anteriormente excepto que, a continuación del bombardeo, el medio de regeneración contiene concentraciones crecientes de higromicina entre 2 y 20 mg/l.

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

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

Ejemplo 9. Se aplica un método de producción eficiente de cultivos de cereal híbrido en los que se aplica DL-fosfinotricina para control de malas hierbas y, al mismo tiempo, como sustancia química hibridante, y en el que la generación híbrida F1 de plantas resultante de semilla híbrida así producida es sustancialmente tolerante, tanto vegetativa como reproductivamente, a la aplicación de DL-fosfinotricina.

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

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

La presente invención proporciona un método para solventar el problema de permitir el uso de un herbicida comercial barato, DL-fosfinotricina, como control de malas hierbas y agente hibridante en la producción de cereales híbridos y, proporcionando tal método además, cereales o arroz híbridos resultantes, en el que se puede usar DL-fosfinotricina (o L-fosfinotricina) de forma segura para el control de malas hierbas sin pérdida sustancial de rendimiento. Como ventaja adicional, la semilla autofecundada de la generación F1, que puede crecer más tarde como planta de regeneración natural en cultivos posteriores, será más fácil de manejar ya que, será por sí misma generalmente estéril si se pulveriza con cantidades controladas de DL-fosfinotricina. Lo mismo ocurrirá con la progenie del polen entrecruzado de las plantas F1 para malas hierbas (por ejemplo arroz rojo) u otros cereales. La presente invención proporciona genes y enzimas que convierten un componente no fitotóxico, D-fosfinotricina, de una formulación herbicida comercial de DL-fosfinotricina, en la forma L activa. El gen PAT, que convierte L-fosfinotricina en N-acetil L-fosfinotricina ya es conocido y se usa comercialmente para proporcionar tolerancia a DL-fosfinotricina en cultivos. Una observación adicional crítica que guarda relación con el presente ejemplo es que, sorprendentemente, se descubrió que el trigo que contenía el gen PAT bajo el control de expresión operable de la región promotora de plastocianina de cebada, es sustancialmente tolerante reproductivamente a la aplicación de DL-fosfinotricina en tasas de al menos 2 kg/ha. Por tanto, una característica crítica de las construcciones descritas en el ejemplo 6, que se usan para proporcionar las plantas del presente ejemplo, es que el gen PAT, que proporciona el rasgo de resistencia, se expresa bajo el control operable de una región promotora que proporciona la expresión sustancialmente sólo en los tejidos verdes. Una característica de tal región promotora útil es que debería expresar PAT de tal forma que proteja adecuadamente todos los tejidos florales no verdes de la DL-fosfinotricina aplicada foliarmente, mientras que proporcione, al mismo tiempo, sólo un nivel mínimo de expresión de PAT en el tejido floral propiamente dicho, y especialmente baja en aquellas partes a las que se dirige la esterilidad condicional. Con PAT expresado bajo el control de la región promotora de plastocianina de cebada, esta condición parece cumplirse, ya que sustancialmente toda la L-fosfinotricina que se pulveriza entra vía las hojas, se intercepta y se convierte en N-acetil L-fosfinotricina no tóxica, antes de ser translocada a los tejidos florales en desarrollo. Por tanto, en la presente invención, la L-fosfinotricina que produce los efectos de esterilidad selectiva de tejido en las líneas parentales, se genera sólo transitoria y localmente de D-fosfinotricina no fitotóxica móvil a través del floema, vía D-aminoácido oxidasa. Asociando exactamente los elementos de control florales que dirigen la expresión de PAT con aquellos elementos que dirigen la expresión de la D-aminoácido oxidasa en el par complementario de construcciones (ejemplo 6), se asegura que, en el híbrido de F1, la explosión transitoria de L-fosfinotricina en el tejido floral diana sea rápidamente neutralizada por una explosión correspondiente de la expresión de PAT al mismo tiempo y en el mismo tejido local. Por tanto, la aplicación del herbicida no induce efecto de esterilidad en el híbrido. Sin embargo, en las generaciones siguientes, el PAT y la D-aminoácido oxidasa floralmente correspondientes del híbrido, se segregarán y por tanto, una vez más, las plantas resultantes serán estériles masculinas o femeninas con la aplicación de cantidades controladoras de DL-fosfinotricina.

Usando los métodos descritos en los ejemplos 7 y 8, las construcciones descritas en el ejemplo 6 se transforman en trigo o (usando métodos de vectores superbinarios estándar) arroz, que se selecciona y regenera en plántulas. Usando métodos esencialmente como los descritos en los ejemplos 1 y 2, se seleccionan los eventos transformantes de T0 (usando propagación clonal de retoños para mantener las líneas sin tratar) y eventos adecuados para reproducir, alternativamente, líneas parentales consanguíneas masculinas que son condicionalmente estériles femeninas dependientes de la aplicación de DL-fosfinotricina, o líneas consanguíneas femeninas que son condicionalmente estériles masculinoas dependientes de la aplicación de DL-fosfinotricina. Las mejores líneas presentan la mejor tolerancia a herbicida, mínima perdida de rendimiento, el fenotipo más claro de esterilidad condicional, etc. Se seleccionan las líneas parentales alternativas masculina y femenina y, opcionalmente, se retrocruzan en líneas de élite adecuadas durante varias generaciones. Los insertos genéticos en estos eventos seleccionados finalmente están totalmente caracterizados como lo está la genética de la herencia de los rasgos de fertilidad condicional y resistencia a herbicida, y las características de los productos génicos expresados.

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

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

Ejemplo 10 Comparativo. Transformación/regeneración de maíz con un polinucleótido que comprende un gen quimérico expresado preferentemente en tejido reproductivo masculino y que codifica una enzima capaz de hidrolizar imazametabenz metilo o flamprop metilo o flamprop isopropilo en sus ácidos respectivos

Los casetes de expresión de RA8-carboxilesterasa-nos se clonan en una serie de vectores bluescript sk, pBLRA8_Q01470, pBLRA8_P37967 y pBLRA8_P40363 como se describe anteriormente. Opcionalmente, estos se cobombardean con ADN que comprende marcadores de selección tales como pUbiHyg o pSOG35, se seleccionan y se regeneran usando higromicina o metotrexato como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 11 del documento WO 98/39462.

Alternativamente, pZEN18_BLRA8_Q01470 se bombardea directamente o se transfiere sobre filamentos de carburo de silicio en células de maíz, y las plantas de maíz se seleccionan y se generan en glifosato, por ejemplo, como se describe en los ejemplos 12 y 13 del documento WO 00/66748.

Alternativamente, la transformación del maíz se lleva a cabo usando Agrobacterium tumefaciens que contiene un vector superbinario. Por ejemplo, el casete de expresión pZEN18 y el gen quimérico BLRA8_Q01470 se cortan de pZEN18_ BLRA8_Q01470 y se clonan en posiciones entre los límites derecho e izquierdo de T-ADN de un vector superbinario derivado de pSB1 a través de una serie de subclonación y recombinación homóloga en una serie de etapas similares a las descritas en el documento WO 00/66748. El material vegetal derivado de embriones inmaduros se infecta con Agrobacterium que contiene vector superbinario que comprende el gen marcador de glifosato y el gen quimérico de la presente invención. Las plantas se seleccionan y se regeneran usando glifosato como se describe en el documento WO 00/66748.

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

Ejemplo 11 Comparativo. Transformación de células de maíz a un fenotipo que exhibe sensibilidad incrementada a la inhibición del crecimiento por S-Fluazifop ácido.

Las secuencias de ADN que codifican la secuencia de la proteína 2-arilpropionil-CoA epimerasa AAR49827 en la base de datos Derwent GENESEQP, o P70473 (Swissprot) comprendida en las secuencias de ADN del acceso AAQ44447 de la base de datos Derwent GENESEQN o del acceso RN2ARYLCO de EMBL, respectivamente se obtienen mediante RT-PCR o sintéticamente para optimizar la expresión en tejidos vegetales. Las secuencias flanqueantes del cebador de PCR o de ADN sintéticas se diseñan para situar sitios de restricción único útiles para la clonación. Preferiblemente, y en el caso en el que la secuencia codificante de epimerasa no contenga sitios internos confusos, se coloca un sitio Nco1 o Nde1 en el extremo 5' para facilitar la clonación de fusiones dentro del marco de lectura con secuencias añadidas 5' al ORF. Alternativamente, cuando los sitios de restricción se colocan en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción ATG, se diseñan secuencias intervinientes para que estén de acuerdo con secuencias consenso de traducción de plantas según Kozak.

Las secuencias de ADN que codifican la secuencia proteica de acil CoA sintetasas "de cadena larga" P18163 o P39518 (Swissprot) comprendidas en las secuencias de ADN de los accesos J05439 o X77783 de EMBL, respectivamente se obtienen mediante RT-PCR o sintéticamente. Las secuencias flanqueantes del cebador de PCR o de ADN sintéticas se diseñan para situar sitios de restricción único útiles para la clonación. Preferiblemente, y en el caso en el que la secuencia codificante de epimerasa no contenga sitios internos confusos, se coloca un sitio Nco1 o Nde1 en el extremo 5' para facilitar la clonación de fusiones dentro del marco de lectura con secuencias añadidas 5' al ORF. Alternativamente, cuando los sitios de restricción se colocan en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción ATG, se diseñan secuencias intervinientes para que estén de acuerdo con secuencias consenso de

traducción de plantas según Kozak.

Similar a los Ejemplos 1 y 2, las secuencias codificantes anteriores se clonan inicialmente en pUC19 o en bluescript sk. Las secuencias codificantes se cortan entonces con enzimas de restricción adecuadas, preferiblemente usando un sitio Nco1 en el extremo 5' de la secuencia codificante, en pMJB1, para crear casetes de expresión de fusión en el marco alternativos, que comprenden en una dirección 5' a 3', el promotor de CaMV35S, el potenciador traduccional TMV, la secuencia codificante de acil CoA sintetasa o epimerasa-terminador nos. pMJB1 es un plásmido derivado de pUC19 que contiene un promotor de CaMV35S potenciado doble operable vegetal; un potenciador de TMV omega y una secuencia de terminador nos. En la Figura 2 del documento WO 98/20144 se da una representación esquemática de pMJB1.

De este modo se crea una serie de derivados de pMJB1, pMJ35S_ AAR49827 etc. y pMJ35S_ P18163 etc. que comprenden casetes de expresión alternativos de epimerasa y acil CoA sintetasa, respectivamente. Usando técnicas estándar, estos se clonan opcionalmente además en vectores tales como pUbiHyg que comprenden genes marcadores seleccionables vegetales.

Alternativamente, dos construcciones, una para la expresión de acil CoA sintetasas de "cadena larga" y la otra para la expresión de 2-arilpropionil-CoA epimerasa, se construyen según los diseños esquemáticos de Fig. 3A y Fig. 3B. En 3A, la construcción de ADN comprende, en la dirección 5' a 3', una región del promotor de poliubiquitina de maíz (EMBL: ZM29159), la secuencia de ADN que codifica acil-CoA sintetasa (EMBL: J05439), una región del terminador nos, una región del promotor de CMV 35S, una región que codifica una secuencia líder no traducida en 5' que comprende el intrón de ADH de maíz, una secuencia de ADN que codifica fosfinotricina acetil transferasa, y un terminador nos. Como siempre, esta construcción de ADN completa se clona en un sitio adecuado en un vector (por ejemplo un derivado de pUC) que comprende un origen de replicación de E. coli y un gen de resistencia a ampicilina. La construcción 3B es la misma, excepto que la secuencia de ADN que codifica acil-CoA sintetasa se sustituye por una secuencia de ADN que codifica 2-arilpropionil-CoA epimerasa (EMBL: Y08172).

Estos vectores, individualmente o en combinación, se transforman en cultivo de células vegetales de maíz usando filamentos. Por ejemplo, suspensiones celulares de células BMS se transforman poniendo en contacto células con filamentos de carburo de silicio revestidos con ADN usando métodos esencialmente como se describe por Frame et al (1994), Plant J., 6, 941-948. El callo transformado así generado se selecciona en base al crecimiento diferencial en medio que contiene un intervalo de concentraciones de agente de selección que, dependiendo del ADN usado para la transformación, puede ser, por ejemplo, glifosato, higromicina, L-fosfinotricina o kanamicina. En el caso de las construcciones representadas en las Figuras 3A y 3B, la selección se lleva a cabo en DL fosfinotricina o un derivado de la misma. Las líneas transformadas de forma estable se seleccionan como callo, que se propaga y continúa creciendo en agente de selección.

Por ejemplo, tras la transformación usando filamentos de carburo de silicio, las células se hacen crecer en medio MS suplementado con 1 mg/l de Bialaphos. Después de 2 semanas, las células se transfieren a medio a base de MS suplementado con 5 mg/l de Bialaphos, donde permanecen durante 6-8 semanas. Los callos resistentes se forman y se transfieren a medio MS suplementado con 2 mg/l de Bialaphos. Los callos transformados de forma estable se transfieren a un medio a base de MS líquido, en el que se dejan crecer durante 2 semanas. Después de este período, las células se peletizan y se resuspenden en una dilución 1:10 de medio. Entonces se distribuyen uniformemente en una placa de ensayo de 6 pocillos y se exponen a 2,5 ppm y 10 ppm del R o S fluazifop. Después de 4 días en presencia de R o S fluazifop, se eliminan de los pocillos 0,1 ml del volumen sedimentado de células, se lava con medio MS líquido reciente y se colocan en placa sobre medio sólido a base de MS. La capacidad de las células para crecer y dividirse de forma activa se puntuó después de 7 días.

Las líneas transformadas se comparan con líneas sin transformar con respecto de la sensibilidad a S-fluazifop, S-fluazifop butilo o S-ariloxifenoxipropionatos similares y derivados. Las secuencias codificantes de ADN que codifican enzimas preferibles para uso en el método de la invención se seleccionan de aquellas secuencias que, cuando se expresan en células BMS, codifican una enzima o combinación de enzimas para transformar el fenotipo de las células de maíz transformadas desde solamente sensibles a la inhibición del crecimiento por concentraciones relativamente elevadas de S-fluazifop o S-fluazifop butilo a ser sensibles a concentraciones mucho más bajas (al menos 2-3 veces).

Las secuencias codificantes de ADN así seleccionadas se usan entonces, como se describe en los otros ejemplos, para crear líneas de plantas de trigo que son estériles masculinas o femeninas dependiendo de la aplicación exógena de S-fluazifop o ésteres de S-fluazifop.

Ejemplo 12. Mutagénesis dirigida al sitio para generar genes que codifican D-aminoácido oxidasas que oxidan D-fosfinotricina.

Este ejemplo se refiere a la producción de genes que codifican variantes de D-aminoácido oxidasa de R. gracilis que tienen una capacidad mejorada para oxidar D-fosfinotricina. Estos genes se usan en realizaciones preferidas de la invención, descritas en los otros ejemplos, en las que la esterilidad se hace condicional tras la aplicación de D-fosfinotricina. En el presente ejemplo, estos genes codifican enzimas que tienen un único cambio de aminoácido en

la posición “213” y/o en la posición “238”. La metionina en posición “213” se identifica como M en el motivo de la secuencia de la proteína nativa RCTMDSS. La tirosina en posición 238 se identifica como la “Y” en el motivo de la secuencia de la proteína nativa GGTYGVG. Hay muchos enfoques conocidos en la técnica para proporcionar una serie de genes que codifican una serie de variantes de D-aminoácido oxidasa con cambios de aminoácido en una o ambas de estas posiciones. La elección del molde de ADN para la mutagénesis depende también del uso. Así, por ejemplo, cuando el uso al que se destina el gen mutante es para expresión en plantas, entonces un punto de partida adecuado es un ADN sintético que codifica una D-aminoácido oxidasa de R. gracilis, como SEC ID NO 7. Por otra parte, cuando el uso inmediato al que se destina el gen mutante es para rondas posteriores de mutagénesis y mejora en un sistema de selección basado en levaduras (como en el ejemplo 13), entonces la secuencia de ADN nativa (opcionalmente mejorada para expresión en S. cerevisiae) es más adecuada.

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

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

RGMUTTOP comprende en él una secuencia (SEC ID NO 8)

tccccatgcaagcgatgcacgNNNgactcgtccgaccccgcttctcccgcctacatcattccccgaccaggtggcgaagtcatct
gcggcgggacgNNNggcgtgggagactgggacttg.

RGMUTBOT comprende en él una secuencia (SEC ID NO 9)

caagtcccagtctcccacgccNNNcgtcccgccgcagatgacttcgccacctggtcggggaatgatgtaggcgggagaagcgg
ggtcggacgagtcNNNcgtgcatcgcttgcatgggga

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

Se transfieren 0,5 a 1,0 ug de cada oligonucleótido a un tubo de centrífuga de Eppendorf de 0,5 ml y se calienta a una temperatura adecuada (por ejemplo, 94ºC, dependiendo de los puntos de fusión calculados), durante 5 minutos, y se hibrida lentamente enfriando hasta temperatura ambiente. El ADN molde (por ejemplo el vector lanzadera de levadura pYES6/CT) se corta entonces con dos enzimas de restricción (según los dos únicos sitios de restricción en el ADN molde que abarcan la región que incluye los dos codones a reemplazar y que caracterizan los extremos del ADN hibridado), se purifica en gel, se liga con el oligonucleótido hibridado y se transforma en levadura como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 13, de forma que las D-aminoácido oxidasas alternativas, creadas por mutagénesis, se expresan en levadura. Luego, según se describe, se seleccionan los clones de levadura que producen el mejor rendimiento en análogos de D-fosfinotricina (como ácido D-homocistéico) o en D-fosfinotricina (cuando se coexpresa el gen PAT) como única fuente de nitrógeno, como aquéllos que contienen las secuencias que codifican D-aminoácido oxidasa variantes con las propiedades deseadas. Alternativamente, la expresión de D-aminoácido oxidasa se realiza en algún microorganismo distinto de levadura y, por ejemplo, bajo el control de expresión del promotor t7 de un vector pET en un lisógeno de E. coli. En este caso, tras la transformación, se pueden recoger colonias individuales, sembrar réplicas en placa, cultivar, inducir, lisar y seleccionar para la actividad de sustrato deseada frente a D-fosfinotricina, usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, una selección fluorimétrica para generación de peróxido o un ensayo colorimétrico para generación de amoníaco). Los clones de levadura u otros microorganismos así seleccionados se cultivan, se prepara ADN y se clona la secuencia de ADN completa de D-aminoácido oxidasa vía PCR de corrección y clonación en pCRBluntII, usando el kit Zero Blunt TOPO de Invitrogen. Se determinan las secuencias codificantes de D-aminoácido oxidasa que caracterizan los clones seleccionados. Estas secuencias codificantes de D-aminoácido oxidasa se subclonan nuevamente para expresión en un vector pET (por ejemplo Novagen pET 24a), y se transforman en E. coli BL21 DE3. Las células se hacen crecer en un fermentador en medio LCM50 que contiene 100 ug/ml de kanamicina, se inducen con IPTG, se recogen, se rompen y el extracto se purifica parcialmente y se ensaya para actividad D-aminoácido oxidasa (según se detalla más adelante). Se seleccionan genes de D-aminoácido oxidasa que codifican enzimas D-aminoácido oxidasas que producen una estabilidad aceptable y la actividad más elevada (kcat/Km) por mg de proteína pura frente a D-fosfinotricina a pH 7,0.

Adicionalmente, se genera una serie de secuencias de ADN particulares, que codifican enzimas D-aminoácido oxidasa particularmente dirigidas a diana. En particular, genes que codifican D-aminoácido oxidasa de Rhodotorula

gracilis con una arginina, serina, cisteína, lisina, asparagina o alanina que sustituye a la metionina en posición 213 y/o una histidina, serina, cisteína, asparagina o alanina que sustituye a la tirosina en posición 238. Los métodos usados son los mismos que los descritos anteriormente, excepto porque, más que una mezcla de oligonucleótidos, se diseñan pares individuales de oligonucleótidos, y se usan para efectuar cada cambio sencillo o doble de aminoácidos. Cada secuencia codificante de D-aminoácido oxidasa mutante resultante se clona para expresión (no etiquetada) detrás del promotor T7 en pET 24A de Novagen, y se transforman en E. coli BL21 DE3. Las células se hacen crecer en un fermentador de 1,0 l, en medio LCM50 complementado con 100 ug/ml de kanamicina, se inducen para expresión con IPTG 1 mM y se recogen mediante centrifugación a baja velocidad.

El medio LCM50 contiene (en 1 litro) KH_2PO_4 (3 g), Na_2HPO_4 (6 g), NaCl (0,5 g), hidrolizado de caseína (Oxoid) (2 g), $(NH_4)_2SO_4$ (10 g), extracto de levadura (Difco (10 g), glicerol (35 g) (estos ingredientes se obtienen en disolución y se esterilizan en autoclave). Los siguientes ingredientes adicionales se esterilizan por filtración en forma de disoluciones y se añaden a los medios: $MgSO_4$ (2,5 ml de disolución 246,5 mg/ml), tiamina.HCl (1 ml de disolución 8 mg/ml); $CaCl_2.2H_2O$ (0,2 ml de disolución 147 g/l); *$FeSO_4.7H_2O$/ácido cítrico madre (2 ml);

** disolución de oligoelementos (5 ml), y se completa hasta 1 litro.

*$FeSO_4.7H_2O$/ácido cítrico madre por 100 ml consiste en $FeSO_4.7H_2O$ (0,415 mg), ácido cítrico (0,202 mg).

** La composición de la disolución de oligoelementos por 1 ml es $AlCl_3.6\ H_2O$ (20 mg), $CoCl_2.6\ H_2O$ (8 mg), $KCo(SO_4)_2.12\ H_2O$ (2 mg), $CuCl_2.H_2O$ (2 mg), H_3BO_3 (1 mg), KI (20 mg), $MnSO_4.H_2O$ (0,8 mg), $Na_2MoO_4.2H_2O$ (4 mg), $ZnSO_4.7H_2O$ (4 mg).

Se lavan en agua aproximadamente 7 g de peso húmedo de células. Las células se vuelven a suspender en un volumen igual de tampón KOH/Mops 50 mM a pH 7,0, que contiene EDTA 2 mM, DTT 2 mM y FAD 0,01 mM. Las células se ponen en suspensión uniformemente usando un homogeneizador de vidrio y luego se disgregan usando una cabeza golpeadora del disgregador Basic Z cell de Constant Systems (BudBrooke Rd., Warwick, U.K.), a 93.079 KPa (13500 psi). El extracto bruto se mantiene frío (~ 4ºC), se centrifuga a 30.000 gav durante 1 h y se desecha el pelete. Algo de la proteína extraída se corre sobre un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie y, mediante comparación lado a lado con extractos de células preparados de forma similar que contienen sólo vector pET “vacío” se estima que 2-50% de la proteína soluble total en el extracto es D-aminoácido oxidasa. Algo de la proteína extraída se intercambia en tampón Mops/KOH 50 mM a pH 7,0 que contiene FAD 0,01 mM. Ésta se diluye con el mismo tampón en una celda de electrodo de oxígeno estándar (calibrada a 25ºC entre cero y una concentración de oxígeno saturada). Opcionalmente, la D-aminoácido oxidasa se purifica nuevamente usando intercambio de iones, fenil-sefarosa, precipitación fraccionada en sulfato amónico y filtración en gel. Los ensayos, a 25ºC, se inician mediante adición de una disolución 200 mM de la sal de amonio de DL-fosfinotricina a la enzima diluida. El volumen de reacción final en la celda del electrodo de oxígeno es 2 ml. Se miden las velocidades de consumo de oxígeno (tras eliminación de cualquier deriva en la línea de bases). La forma mutante M213R (sustitución de arginina por metionina) de la D-aminoácido oxidasa de R. gracilis oxida la DL-fosfinotricina a una tasa de ~14 nmoles/min/mg de proteína del extracto bruto (siendo la pureza estimada de la D-aminoácido oxidasa en el extracto de 35 +/- 15% de la proteína total). La forma mutante M213S (sustitución de arginina por metionina) de la D-aminoácido oxidasa de R. gracilis oxida la DL-fosfinotricina a una tasa de ~4 nmoles/min/mg de proteína del extracto bruto (siendo la pureza estimada de la D-aminoácido oxidasa en el extracto de 35 +/- 15% de la proteína total). En experimentos de control, la forma L pura no se oxida nada y, dependiendo de la concentración, la forma D pura se oxida hasta dos veces la velocidad en que se oxida la forma DL. Bajo condiciones similares, la D-aminoácido oxidasa de R. gracilis nativa (sin mutar), no presenta ninguna capacidad significativa (<0,4 nmoles/min/mg) de oxidar DL- o D-fosfinotricina.

Ejemplo 13. Mutación y selección para generar genes de D-aminoácido oxidasa que codifican enzimas con especificidad mejorada (kcat/Km) para la oxidación de D-fosfinotricina.

La secuencia que codifica D-aminoácido oxidasa nativa de Rhodotorula gracilis se clona en el vector lanzadera pYES6/CT de Invitrogen, como un fragmentos HindIII/PmeI, en dirección 3’ del promotor GAL1. De forma similar, la secuencia que codifica la D-aminácido oxidasa nativa de Rhodotorula, se clona en el vector lanzadera de expresión de proteína pAUR123 (Panvera) como un fragmento XhaI, en dirección 3’ del promotor constitutivo ADH1. La construcción de estos vectores se realiza en E. coli, seguida de transformación en Saccharomyces cerevisiae S288C. Cuando sea apropiado, el gen PAT se usa para reemplazar los genes de resistencia a antibióticos blasticidina o aureobasidina en los vectores pYES6/CT/pAUR123, respectivamente, y la DL-fosfinotricina en vez del antibiótico usado para mantener la selección. Además, las secuencias que codifican los genes M213R o M213S, o las formas mutantes M213S, Y238S de D-aminoácido oxidasa de Rhodotorula se clonan en lugar de la secuencia que codifica la forma salvaje.

Se crean variantes mutantes adicionales de D-aminoácido oxidasa, usando varios métodos de mutagénesis. Por ejemplo, se generan múltiples variantes de la secuencia que codifica D-aminoácido oxidasa, mediante PCR envenenada con Mn2+, la población mixta se clona frente a los promotores GAL1 o ADH1 de los dos vectores lanzadera, se transforma en levadura y se realiza la selección basada en la capacidad de la nueva secuencia para conferir a la levadura la capacidad de crecer en ácido D-homocistéico como única fuente de nitrógeno. Alternativamente, la mutación y selección se realiza directamente sobre la levadura transformada. Por ejemplo, se

cultivan levaduras transformadas con los plásmidos anteriores en un fermentador, en presencia de un mutágeno químico como EMS, en un medio de cultivo con nitrógeno limitado, que contiene ácido D-homocistéico 10-50 mM o (en caso de que se exprese el gen PAT), DL-fosfinotricina 20-100 mM, y se inducen para expresión de D-aminoácido oxidasa (por ejemplo, cultivando sobre galactosa como fuente de carbono). Tras sucesivos subcultivos, se identifican los subcultivos que crecen en ácido D-homocistéico o fosfinotricina como única fuente de N, se siembran en placa, y las secuencias que codifican D-aminoácido oxidasa se subclonan, se secuencian y se expresan en E. coli para su caracterización posterior.

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

Alternativamente, se realiza la expresión y selección de D-aminoácido oxidasa en algunos microorganismos distintos de la levadura y, por ejemplo, bajo el control de expresión del promotor t7 de un vector pET en un lisógeno de E. coli. En este caso, la secuencia que codifica la D-aminoácido oxidasa (opcionalmente mutagenizada mediante PCR envenenada con Mn2+) se clona en un vector pET, se transforma en E. coli XL1red y, tras el paso por varias generaciones, se transforma de nuevo en un lisógeno de E. coli, como E. coli BL212 DE3. Las colonias individuales se pueden recoger a continuación, sembrarse réplicas en placa, cultivarse, inducirse con ITPG, lisarse y escrutarse para la actividad de sustrato deseada frente a D-fofinotricina, usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, un cribado fluorimétrico para generación de peróxido o un ensayo colorimétrico para generación de amoníaco).

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

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

Ejemplo 14. Producción de D-fosfinotricina en una forma enantioméricamente pura

Se transforma E. coli BL21 DE3 codon plus RIL con pET 24A de Novagen que tiene la secuencia codificante de PAT (A02774) clonada para expresión (no marcada) detrás del promotor T7. Estas células se dejan crecer hasta una densidad de DO600 nm de ~ 40 en un fermentador de 10 litros de medio LCM50 que contiene kanamicina, se inducen con IPTG 0,2 mM, se recogen por centrifugación de baja velocidad y se transfieren rápidamente a medio mínimo que contiene 9,91 g de la sal de amonio de D/L fosfinotricina (PPT).

Medio mínimo (en 1 litro) es.

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

$CaCl_2$ (1 ml de 14,7 g/l), $MgSO_4$ (1 ml de 246,5 g/l), tiamina.HCl (5 ml de 1 mg/ml)

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

Los detalles de fermentación son los siguientes. Se inocula medio LCM 50 en un fermentador de 10 litros con inóculo crecido en caldo de cultivo LB (200 ml) de E. coli BL21 DE3 codon plus RIL que contiene el gen PAT y se mantiene a 30ºC, velocidad de agitación 200 rpm, pH 6,5, concentración de oxígeno 50% saturado en aire. Después de aproximadamente 12 horas el cultivo crece hasta una OD_{600} nm de ~ 30. El cultivo se induce después para expresión de PAT mediante la adición de IPTG 0,2 mM. Después de 1,5 horas, el cultivo típicamente crece adicionalmente hasta una OD_{600} nm de ~ 40, antes de recogerse las células por centrifugación y lavarse en 8 litros de medio mínimo. Las células se centrifugan una vez más y se resuspenden a un volumen final de 10 litros en el fermentador en medio mínimo que contiene 9,91 g de la sal de amonio disponible en el mercado de D/L-fosfinotricina e IPTG 0,2 mM adicional. La temperatura se aumenta a 37ºC y las muestras del medio fermentador se controlan por

RMN de protón y de fósforo para determinar a) cuándo los niveles de glucosa han descendido sustancialmente y necesitan abastecerse y b) el alcance de la conversión de fosfinotricina a N-acetil fosfinotricina. Durante el transcurso de ~ 12 horas, se añaden ~ 500 g de glucosa al fermentador. Se observa que la formación de n-acetil fosfinotricina comienza después de unas pocas horas y a las ~ 20 horas alcanza > 93% de conversión de la L-PPT (46,5% de volumen de la D/L) a N-acetil-L-PP. El medio de fermentación se recoge poco después retirándose las células por centrifugación a baja velocidad.

D-PPT se purifica a partir de medio de fermentación usando cromatografía de intercambio iónico. El medio de fermentación (~ 9,5 l) se almacena a 4ºC. Se mezcla con 900 ml de resina de intercambio catiónico de malla 200-400 Dowex 50W-X8 (preparada previamente con HCl) en forma de H^+ de modo que el pH del sobrenadante por encima de la resina baja hasta ~ pH 3,0. Se permite que la resina Dowex sedimente por gravedad y se decanta el sobrenadante junto con un aclarado de agua 21 de la resina Dowex y después se centrifuga para aclarar. El Dowex lavado se descarta (para reciclarse con el tiempo). El sobrenadante aclarado se extrae después mediante un embudo de decantación con acetato de etilo (1/4 del volumen del sobrenadante) y la fracción acuosa (~ 12 l) se conserva. Después se añaden 2,3 l adicionales de forma H^+ de resina Dowex 50W-X8 y se agita con la ~ 121. Después se permite que la resina sedimente. El pH del sobrenadante por encima de la resina es ~ pH 1,6 en esta etapa. El sobrenadante se retira por decantación y se descarta y la resina se lava con ~ 12 litros de agua y, de nuevo, se permite que sedimente. De nuevo, el sobrenadante se descarta y la resina se vierte en un filtro de embudo Buchner sinterizado y se aclara con ~ 4,5 l adicionales de agua (para retirar la mayoría de la N-acetil-fosfinotricina residual). La fracción principal que contiene D-fosfinotricina se eluye de la resina con 15 l de hidróxido de amonio 0,4 M, seguido de un aclarado con 1,4 l de agua de la resina. El pH de esta fracción que contiene D-fosfinotricina es ~ 11,4. Opcionalmente, éste se reduce a ~ pH 10 mediante la adición de, por ejemplo, ~ 0,13 moles de ácido acético y ~ 600 ml de resina de intercambio catiónico en forma H^+. Si se añade, se permite que la resina sedimente. La fracción de D-fosfinotricina (sobrenadante) se carga después en una columna de 565 ml (5 x 28 cm) de resina de intercambio aniónico de malla 400 Dowex 1X8 en forma OH- (preequilibrada con NaOH y lavada con agua). Se aplica un gradiente de acetato de amonio de 0 M - 0,32 M a la columna durante 17 volúmenes de lecho de columna. Se recogen fracciones de 55 ml en todo el gradiente. Las fracciones se controlan por UV a 215 nm y también mediante RMN de protón y 31P. Este análisis indica que se eluye fosfinotricina altamente pura entre las fracciones 39 y 78. Se eluye N-acetilfosfinotricina como material no unido y temprano en el gradiente y algo de glutamato eluye posteriormente las fracciones 79-90.

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

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

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

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

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

Ejemplo 15. Producción de S-Fluazifop y S-fluazifop butilo enantioméricamente puros

El ácido de S-Fluazipop y sus ésteres se producen usando métodos análogos a aquellos bien conocidos para R-Fluazifop, y como se describe en la bibliografía (por ejemplo D. Cartwright, en Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference-Weeds (1989) 2, 707-716 y referencias allí). De forma similar, los métodos para producir el racemato RS son bien conocidos. Opcionalmente, S-Fluazifop puro se produce vía resolución cromatográfica preparativa a partir del racemato RS (por ejemplo como se describe por Bewick (1986) in Pesticide Sci., 17, 349-356). A partir de una mezcla RS de fluazifop butilo, el enantiómero S se aísla en un exceso enantiomérico mayor de 97% usando el método de HPLC descrito por Bewick. Alternativamente, S fluazifop se resuelve directamente de la mezcla RS de ácidos mediante cromatografía a través de una columna de ciclodextrina adecuada (Journal of Chromatography (1993), 634(2), 197-204.) o usando otros métodos cromatográficos en columna (Biomedical Chromatography (1998), 12(6), 309-316; Journal of Chromatography, A (2001), 937(1-2), 135-138). Un método adicional de utilidad preparativa general para aislar ácidos S-ariloxifenoxipropiónicos enantioméricamente puros y sus ésteres se describe en Chimiques Des Pays-Bas (1991) 110 (05), 185-188. En este caso, una enzima carboxilesterasa NP se produce y se usa para la hidrólisis enantioselectiva de ésteres racémicos de ariloxifenoxipropionatos (siendo los ácidos resultantes fácilmente separables del éster que queda).

En un método preferido, S-Fluazifop enantioméricamente puro se produce mediante un método sintético directo. En la primera etapa, se sintetiza el intermedio 4-(5-trifluorometil-oiridin-2-iloxi)-fenol.

Preparación de 4-(5-trifluorometil-oiridin-2-iloxi)-fenol

A una suspensión de carbonato potásico (13,81 g, 99 mmoles) en DMF seca (200 ml), a temperatura ambiente, se añade hidroquinona (10,0 g, 91 mmoles), y la mezcla se agita durante 30 min. Se añade 2-cloro-5-trifluorometilpiridina (16,49 g, 91 mmoles), y la mezcla se calienta hasta 90ºC durante 16 horas. La mezcla de reacción se vierte en agua, se acidifica con HCl diluido y después se extrae con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua, se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran, y el disolvente se elimina a presión reducida. La cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente 10-20% de acetato de etilo/hexano produce, por ejemplo, ~10,22 g de 4-(5-trifluorometil-oiridin-2-iloxi)-fenol con un rendimiento de ~44%.

δH (400 MHz; $CDCl_3$) 8,45, s, 1H; 7,9, dd, 1H; 7,0, m, 1H; 7,0, d, 2H; 6,8, d, 2H; 5,75, s, 1H.

En una etapa adicional, se sintetiza el intermedio éster bencílico del ácido (R)-2-hidroxipropiónico.

Preparación del éster bencílico del ácido (R)-2-hidroxipropiónico

A una suspensión de D-lactato de sodio en DMF a 0ºC en nitrógeno se añade gota a gota bromuro de bencilo. La mezcla se agita a 0ºC durante 16 horas. El disolvente se elimina entonces a presión reducida, y el residuo se reparte entre éter dietílico y agua. Las capas se separan, y la fase orgánica se lava con bicarbonato sódico saturado, con salmuera, entonces se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra, y el disolvente se elimina a presión reducida par dar éster bencílico del ácido (R)-2-hidroxipropiónico como un aceite incoloro. Por ejemplo, se obtienen 2,81 g con un rendimiento de 88%.

δH (400 MHz; $CDCl_3$) 7,4, m, 5H; 5,23, s, 2H; 4,35, q, 1H; 2,85, d, 1H; 1,45, d, 3H.

En una etapa posterior, se sintetiza el intermedio éster bencílico del ácido (S)-2-[4-(5-trifluorometil-piridin-2-iloxi)-fenoxi]-propiónico.

Preparación del éster bencílico del ácido (S)-2-[4-(5-trifluorometil-piridin-2-iloxi)-fenoxi]-propiónico

A una disolución de 4-(5-trifluorometil-oiridin-2-iloxi)-fenol (2,90 g, 11,4 mmoles) y éster bencílico del ácido (R)-2-hidroxipropiónico (2,25 g, 12,5 mmoles) en THF seco (100 ml) a 0ºC en nitrógeno se añade trifenilfosfina seguido de la adición gota a gota de azodicarboxilato de diisopropilo (3,36 ml, 17 mmoles). La mezcla amarilla resultante se agita durante 1 h y después se deja reposar durante 16 horas. La mezcla de reacción se reparte entre agua y acetato de etilo, y las capas se separan. La acuosa se extrae adicionalmente con acetato de etilo, y las capas orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran, y el disolvente se elimina a presión reducida. La cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente 10% de acetato de etilo/hexano produjo éster bencílico del ácido (S)-2-[4-(5-trifluorometil-piridin-2-iloxi)-fenoxi]-propiónico como un aceite incoloro. En un ejemplo, se obtienen 3,25 g que representan un característica de 69% y en >99% ee (según se determina mediante rmn).

δH (400 MHz; $CDCl_3$) 8,42, s, 1H; 7,89, dd, 1H; 7,35, m, 5H; 7,25, d, 2H; 6,95, d, 1H; 6,9, d, 2H; 5,22, s, 2H; 4,78, q, 1H; 1,65, d, 3H.

En una etapa final, se obtiene el ácido S.

Preparación del ácido (S)-2-[4-(5-trifluorometil-piridin-s-iloxi)-fenoxi]-propiónico

Una mezcla del éster bencílico del ácido (S)-2-[4-(5-trifluorometil-piridin-2-iloxi)-fenoxi]-propiónico (3,12 g) y Pd/C

(5%, 0,1 g) en acetato de etilo (20 ml) se agita en una atmósfera de hidrógeno a 2,5 bares durante 2,5 horas. La mezcla de reacción se filtra a través de celite, y el disolvente se elimina a presión reducida. La cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente 25% de acetato de etilo/hexano 1% de ácido acético dio ácido (S)-2-[4-(5-trifluorometil-piridin-s-iloxi)-fenoxi]-propiónico como un aceite incoloro. Por ejemplo, se obtuvieron 2,41 g con un rendimiento de 99% a 99%ee +/- 0,5% (como se determina mediante rmn).

DH (400 MHz; CDCl3) 8,42, s, 1H; 7,9, dd, 1H; 7,1, m, 2H; 6,9, m, 3H; 4,8, q, 1H; 1,7, d, 3H.

Se usan métodos similares a los anteriores para producir enantiómeros S de otros herbicidas de ariloxifenoxipropionatos (por ejemplo, fenoxaprop, haloxyfop, fluozifop y quizalofop y sus ésteres).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Syngenta Limited

<120> Método para producir selectivamente plantas estériles masculinas o femeninas

<130> PPD50695

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 831

<212> ADN

<213> *Synechocystis sp*.

<400> 1

atggaacgat tagaacacca cgccagcttt gggggttggc aaagcgttta tagccatcac 60

agcgctgtgc ttaattgcac catgaacgtt ggcgtttacc tgcctcccca ggctactaac 120

caacattgcc cagttttgta ctggctgtct ggcctcacct gtactgaaca aaatgccatc 180

actaaatcgg gtctacagca gcacgcagca aagcatggac taattatggt gacgccagac 240

actagccccc ggggtgaagg cgtaactgat tctgaagatt atgacctcgg tatgggagcc 300

ggtttctatc tcaacgccac ccaacctccc tgggcagccc actatcaaat gcatgattac 360

attgtgcaag agctgcctac gtggattgag gctaattttg ccgccaccga tgcccggagt 420

atttttggcc attccatggg gggccatggg gccctagtca ttgccctgcg taatcccggt 480

cgttatcgca gtgtttccac cttctctccc attgttgccc ccactcaagt tccctgggga 540

caaaaggcct tccaagctta tttaggggat aaccagttaa gctggcaagc ttgggatacc 600

tgtgctctga ttaaatcggc tccagagcgg ctaccatttt tcgtggacta tggcgacgct 660

gatccattcc tccctaccca attgcggcca gagttactcc aagcggcctg cacggcggct 720

aaccatcccc tcaccctccg tatgcaaccg ggctatgacc atagctatta ctttattgct 780

agtttcatcg gtgatcacat ggattggcat ggagcggcgc tgctaaacta g 831

<210> 2

<211> 276

<212> PRT

<213> *Synechocystis sp*.

<400> 2

Met Glu Arg Leu Glu His His Ala Ser Phe Gly Gly Trp Gln Ser Val
1 5 10 15

Tyr Ser His His Ser Ala Val Leu Asn Cys Thr Met Asn Val Gly Val
20 25 30

Tyr Leu Pro Pro Gln Ala Thr Asn Gln His Cys Pro Val Leu Tyr Trp
35 40 45

Leu Ser Gly Leu Thr Cys Thr Glu Gln Asn Ala Ile Thr Lys Ser Gly
50 55 60

Leu Gln Gln His Ala Ala Lys His Gly Leu Ile Met Val Thr Pro Asp
65 70 75 80

Thr Ser Pro Arg Gly Glu Gly Val Thr Asp Ser Glu Asp Tyr Asp Leu
85 90 95

Gly Met Gly Ala Gly Phe Tyr Leu Asn Ala Thr Gln Pro Pro Trp Ala
100 105 110

Ala His Tyr Gln Met His Asp Tyr Ile Val Gln Glu Leu Pro Thr Trp
115 120 125

Ile Glu Ala Asn Phe Ala Ala Thr Asp Ala Arg Ser Ile Phe Gly His
130 135 140

Ser Met Gly Gly His Gly Ala Leu Val Ile Ala Leu Arg Asn Pro Gly
145 150 155 160

Arg Tyr Arg Ser Val Ser Thr Phe Ser Pro Ile Val Ala Pro Thr Gln
165 170 175

Val Pro Trp Gly Gln Lys Ala Phe Gln Ala Tyr Leu Gly Asp Asn Gln
180 185 190

Leu Ser Trp Gln Ala Trp Asp Thr Cys Ala Leu Ile Lys Ser Ala Pro
195 200 205

Glu Arg Leu Pro Phe Phe Val Asp Tyr Gly Asp Ala Asp Pro Phe Leu

210 215 220

Pro Thr Gln Leu Arg Pro Glu Leu Leu Gln Ala Ala Cys Thr Ala Ala
225 230 235 240

Asn His Pro Leu Thr Leu Arg Met Gln Pro Gly Tyr Asp His Ser Tyr
245 250 255

Tyr Phe Ile Ala Ser Phe Ile Gly Asp His Met Asp Trp His Gly Ala
260 265 270

Ala Leu Leu Asn
275

<210> 3

<211> 1374

<212> ADN

<213> *Neurospora crassa*

<400> 3

ggaaggaatc agtatggttg gccaaccgcc tcttaccggc ctcaaggtcc tggagtttgc 60

cggtctagct ccaggtcagc cctccatctc tcacttttcc tccgacttac acacacagag 120

gctttcggcc gaaacccggc cgatcttgag gtctcactta tacacttcac ttacacttca 180

ctctcacttg gaaaaaaaca aaatgtcaca aaactaattc cccgcttggg aacaggtccc 240

ttcgccgggc tcctcctcgc cgacgctggc gcctccgtcc tgcgcatcga ccgcgccgtc 300

tccggccccg tcgcccgcca agttcccgac caactaaccc gccacaaatc ctccttggtg 360

gtcgacctca agtccccctc cggaatcgcc ctcatcaaat ccctcgccgc cgtatcggac 420

gttctcatcg acccttaccg ccccggcgtc ctggagaagc tcgggctggg cccctctgtc 480

ctgtgcagcg acgaatgcaa cccccgcctc atctacgccc gcctgacggg cttccggcga 540

gacggccggt tcgccaccat ggccgggcac gatatcaact acctggctgt gagcggggtg 600

ttgagtctgc tggggaggaa gggcgagaag ccgacgccgc ccatcaacat tctgggagac 660

tttgccggcg gcggagcggt tttgttccag ggcatcctgc ttgcgctggc cgcgagggag 720

aggacgggca agggacaggt ggtggaggcg aatatcgtcg acggagcgag ttacttggct 780

acttttaacc ggtttgcgct caaaacggcc gtggggaacg caccgagggg ggagaacctg 840

ctggatacgg gctgccctta ctatgatacg tacgagaccg cggatgggaa gtacatagct 900

gtcggggcgt tggagccgca gtttttcaag gagttggtta aagggttggg gttagaggga 960

caagggtggg aggagaggag aggggacaag gagaattggc ccgagctgag gagggtgttg 1020

gagcacaagt tcaagaccaa aacgaggagg gagtgggagg atatctttga cgggactgat 1080

gcgtgctgca cggcggtgtt tgagtacggc gagatggaaa gggagaggga gcggttggag 1140

ggcgatcaga gacccgtggt tacgcttagg gagacgccct gcttggcgct gaggagcgat 1200

gcgaaggatg ctagccatgg gcaagggccg ggcgtcaagg gggaagcgta tgtaggcatt 1260

cccttgaaac ctggaaaggg aggcgaatct gtcgtggaga agtggcttgg ttggaagaag 1320

ggcaaggagt ttgatgtgtt gaatgggagc gctgtcgcta tcaagtccag actg 1374

<210> 4

<211> 460

<212> PRT

<213> *Neurospora crassa*

<400> 4

Gly Arg Asn Gln Tyr Gly Trp Pro Thr Ala Ser Tyr Arg Pro Gln Gly
1 5 10 15

Pro Gly Val Cys Arg Ser Ser Ser Arg Ser Ala Leu His Leu Ser Leu
20 25 30

Phe Leu Arg Leu Thr His Thr Glu Ala Phe Gly Arg Asn Pro Ala Asp
35 40 45

Leu Glu Val Ser Leu Ile His Phe Thr Tyr Thr Ser Leu Ser Leu Gly
50 55 60

Lys Lys Gln Asn Val Thr Lys Leu Ile Pro Arg Leu Gly Thr Gly Pro
65 70 75 80

Phe Ala Gly Leu Leu Leu Ala Asp Ala Gly Ala Ser Val Leu Arg Ile
85 90 95

Asp Arg Ala Val Ser Gly Pro Val Ala Arg Gln Val Pro Asp Gln Leu
100 105 110

Thr Arg His Lys Ser Ser Leu Val Val Asp Leu Lys Ser Pro Ser Gly

115 120 125

Ile Ala Leu Ile Lys Ser Leu Ala Ala Val Ser Asp Val Leu Ile Asp
130 135 140

Pro Tyr Arg Pro Gly Val Leu Glu Lys Leu Gly Leu Gly Pro Ser Val
145 150 155 160

Leu Cys Ser Asp Glu Cys Asn Pro Arg Leu Ile Tyr Ala Arg Leu Thr
165 170 175

Gly Phe Arg Arg Asp Gly Arg Phe Ala Thr Met Ala Gly His Asp Ile
180 185 190

Asn Tyr Leu Ala Val Ser Gly Val Leu Ser Leu Leu Gly Arg Lys Gly
195 200 205

Glu Lys Pro Thr Pro Pro Ile Asn Ile Leu Gly Asp Phe Ala Gly Gly
210 215 220

Gly Ala Val Leu Phe Gln Gly Ile Leu Leu Ala Leu Ala Ala Arg Glu
225 230 235 240

Arg Thr Gly Lys Gly Gln Val Val Glu Ala Asn Ile Val Asp Gly Ala
245 250 255

Ser Tyr Leu Ala Thr Phe Asn Arg Phe Ala Leu Lys Thr Ala Val Gly
260 265 270

Asn Ala Pro Arg Gly Glu Asn Leu Leu Asp Thr Gly Cys Pro Tyr Tyr
275 280 285

Asp Thr Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Lys Tyr Ile Ala Val Gly Ala Leu
290 295 300

Glu Pro Gln Phe Phe Lys Glu Leu Val Lys Gly Leu Gly Leu Glu Gly
305 310 315 320

Gln Gly Trp Glu Glu Arg Arg Gly Asp Lys Glu Asn Trp Pro Glu Leu
325 330 335

Arg Arg Val Leu Glu His Lys Phe Lys Thr Lys Thr Arg Arg Glu Trp
340 345 350

Glu Asp Ile Phe Asp Gly Thr Asp Ala Cys Cys Thr Ala Val Phe Glu
355 360 365

Tyr Gly Glu Met Glu Arg Glu Arg Glu Arg Leu Glu Gly Asp Gln Arg
370 375 380

Pro Val Val Thr Leu Arg Glu Thr Pro Cys Leu Ala Leu Arg Ser Asp
385 390 395 400

Ala Lys Asp Ala Ser His Gly Gln Gly Pro Gly Val Lys Gly Glu Ala
405 410 415

Tyr Val Gly Ile Pro Leu Lys Pro Gly Lys Gly Gly Glu Ser Val Val
420 425 430

Glu Lys Trp Leu Gly Trp Lys Lys Gly Lys Glu Phe Asp Val Leu Asn
435 440 445

Gly Ser Ala Val Ala Ile Lys Ser Arg Leu Ser Gln
450 455 460

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 5

aactgcagct ttttggttag cgaatgc 27

<210> 6

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 6

cagactagtt ttagctaatt tctttaagta aaaac 35

<210> 7

<211> 1107

<212> ADN

<213> *Rhodotorula gracilis*

<400> 7

atgggatccc aaaagagggt tgtggtgctg ggttccggcg tgataggact cagctccgcg 60

cttatacttg cccggaaggg gtactccgtc cacatcctgg cccgggacct cccagaggat 120

gttagctcac agaccttcgc gtccccttgg gctggagcca actggacccc ttttatgacc 180

ctcactgacg gcccgaggca ggcaaagtgg gaggagtcta cattcaagaa gtgggtggaa 240

cttgtgccaa cggggcatgc catgtggttg aagggaacca ggcgtttcgc ccaaaatgag 300

gacggactgc tcggtcactg gtacaaagat atcacccccca attatagacc cttgccctct 360

tccgaatgtc caccaggcgc tattggcgtg acttatgaca cattgtcagt gcacgctcca 420

aagtactgcc aatacctcgc aagggagctc cagaagctgg gggcgacatt cgagcgccgc 480

accgttactt ccctcgagca agcttttgat ggggctgacc tcgtcgttaa cgcgacgggg 540

ctgggtgcca agtccatcgc tggcatcgat gaccaggcgg ccgagcctat tcgcggtcaa 600

acggtgctcg tcaagtcgcc ctgcaaaagg tgtactatgg acagctcgga cccggcatca 660

ccggcgtaca tcatcccgcg gccaggaggc gaagtgattt gcggcggtac gtacggggtc 720

ggagactggg atctctcggt caacccagag accgtccagc gcatcctcaa acactgcctg 780

cgcctggatc cgactatttc ttcggacggc acaatcgaag gcatcgaggt gctgcggcat 840

aacgtcggac tcagaccggc gaggagggga ggccctcgcg ttgaagccga gaggattgtt 900

cttccacttg acagaacgaa gagcccccctc tcactgggcc gtgggagcgc tcgtgcggcc 960

aaggagaagg aggtgacttt ggtgcatgcc tacggtttct ccagcgctgg ctatcaacag 1020

tcttggggcg cagccgaaga cgtcgcacaa ttggtcgatg aggcgtttca gaggtatcat 1080

ggggccgccc gcgagtctaa gctctga 1107

<210> 8

<211> 120

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> característica diversa

<222> (22)..(22)

<223> En la que n=a ,t, c o g.

<220>

<221> característica diversa

<222> (23)..(23)

<223> En la que n=a, t, c o g.

<220>

<221> característica diversa

<222> (24)..(24)

<223> En la que n= a, t, c o g.

<220>

<221> característica diversa

<222> (97)..(97)

<223> En la que n=a, t, c o g.

<220>

<221> característica diversa

<222> (98)..(98)

<223> En la que n=a, t, c o g.

<220>

<221> característica diversa

<222> (99)..(99)

<223> En la que n=a, t, c o g.

<400> 8

tccccatgca agcgatgcac gnnngactcg tccgaccccg cttctcccgc ctacatcatt 60

ccccgaccag gtggcgaagt catctgcggc gggacgnnng gcgtgggaga ctgggacttg 120

<210> 9

<211> 120

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> característica diversa

<222> (22)..(22)

<223> En la que n=a, t, c o g.

<220>

<221> característica diversa

<222> (23)..(23)

<223> En la que n=a, t, c o g.

<220>

<221> característica diversa

<222> (24)..(24)

<223> En la que n=a, t, c o g.

<220>

<221> característica diversa

<222> (97)..(97)

<223> En la que n=a, t, c o g.

<220>

<221> característica diversa

<222> (98)..(98)

<223> En la que n=a, t, c o g.

<220>

<221> característica diversa

<222> (99)..(99)

<223> En la que n=a, t, c o g.

<400> 9

caagtcccag tctcccacgc cnnncgtccc gccgcagatg acttcgccac ctggtcgggg 60

aatgatgtag gcgggagaag cggggtcgga cgagtcnnnc gtgcatcgct tgcatgggga 120

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Motif

<400> 10

Arg Cys Thr Met Asp Ser Ser
1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Motivo

<400> 11

Gly Gly Thr Tyr Gly Val Gly
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir selectivamente plantas estériles femeninas, que comprende las etapas de:

a. proporcionar plantas transgénicas condicionalmente estériles femeninas que comprenden un transgén que codifica una D-fosfinotricina oxidasa expresada por un promotor floral femenino específico de tejido;

b. aplicar exógenamente a las plantas transgénicas condicionalmente estériles femeninas una cantidad de D-fosfinotricina en un momento apropiado;

c. seleccionar las plantas transgénicas estériles femeninas que producen poca o ninguna semilla tras la aplicación de D-fosfinotricina, y que producen al menos niveles casi normales de polen viable.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el promotor floral femenino específico del tejido se selecciona del grupo que consiste en delta S13 y Stig1.

3. Un método para producir selectivamente plantas estériles masculinas, que comprende las etapas de:

a. proporcionar plantas transgénicas condicionalmente estériles masculinas que comprenden un transgén que codifica una D-fosfinotricina oxidasa expresada por un promotor floral masculino específico de tejido;

b. aplicar exógenamente a las plantas transgénicas condicionalmente estériles masculinas una cantidad de D-fosfinotricina en un momento apropiado;

c. seleccionar las plantas transgénicas estériles masculinas que producen poco o ningún polen tras la aplicación de D-fosfinotricina.

4. El método de la reivindicación 3, en el que el promotor floral masculino específico del tejido se selecciona del grupo que consiste en TA29 y un fragmento de TA29.

5. El método de la reivindicación 4, en el que el fragmento de TA29 está opcionalmente ligado operablemente a un fragmento de secuencia de promotor de CaMv en dirección 5'.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la D-fosfinotricina oxidasa deriva de Rhodotorula gracilis.

7. Un método según la reivindicación anterior, en el que la D-fosfinotricina oxidasa es una D-aminoácido oxidasa mutante obtenible de Rhodotorula gracilis, oxidasa la cual comprende sustituciones en las posiciones 213 y/o 238 cuando se compara con la secuencia de tipo salvaje.

8. Un método según la reivindicación precedente, en el que la D-fosfinotricina oxidasa obtenible de Rhodotorula gracilis tiene en posición 213 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys, Ser, Cys, Asn y Ala y/o, en posición 238, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Ser, Cys, Asn y Ala.

9. El método de la reivindicación 6, en el que la D-fosfinotricina oxidasa derivada de Rhodotorula gracilis está codificada por la secuencia expuesta en SEC ID NO: 7.

10. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el transgén que codifica una oxidasa está opcionalmente ligado operablemente a una secuencia en dirección 5' que codifica un péptido de tránsito cloroplástico.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las plantas condicionalmente estériles femeninas o masculinas son dicotiledóneas.

12. El método de la reivindicación 9, en el que las plantas condicionalmente estériles femeninas o masculinas son plantas de tabaco.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las plantas condicionalmente estériles femeninas o masculinas son monocotiledóneas.

14. El método de la reivindicación 11, en el que las plantas condicionalmente estériles femeninas o masculinas son plantas de trigo o arroz.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de D-fosfinotricina está entre 0,25 kg/ha y 20 kg/ha.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la D-fosfinotricina se aplica exógenamente mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en pulverización foliar e impregnación de las raíces.

17. El método de la reivindicación 14, en el que la D-fosfinotricina se aplica exógenamente mediante impregnación

de las raíces y se aplica además inundando una disolución de D-fosfinotricina directamente en capullos de las florecillas emergentes de las plantas condicionalmente estériles femeninas.

18. El método de la reivindicación 15, en el que la disolución de D-fosfinotricina es de 10 mM a 200 mM.

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tiempo apropiado se selecciona del grupo que consiste antes de la floración y durante las etapas tempranas de la floración.

20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la D-fosfinotricina está comprendida en una mezcla racémica de D- y L-fosfinotricina.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las plantas transgénicas condicionalmente estériles femeninas o masculinas son tolerantes a L-fosfinotricina.

Figura 1

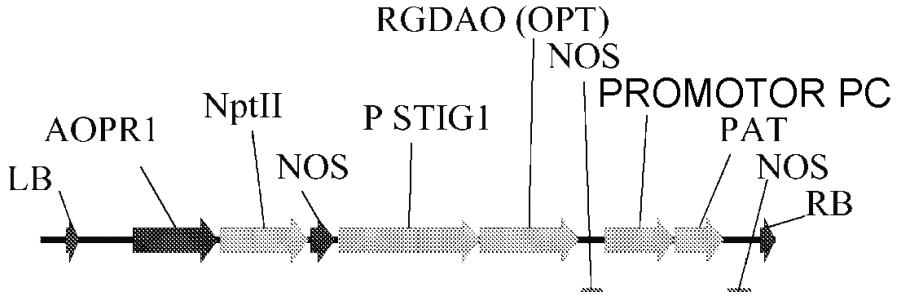


Figura 2

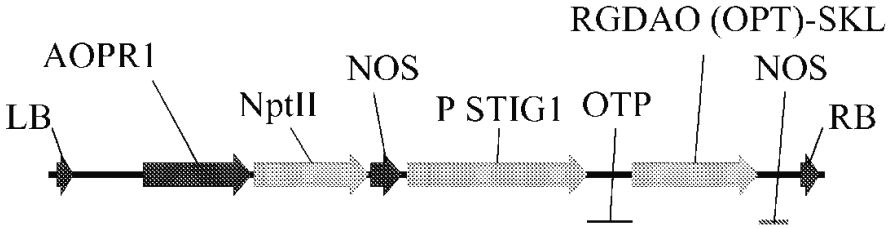


Figura 3a

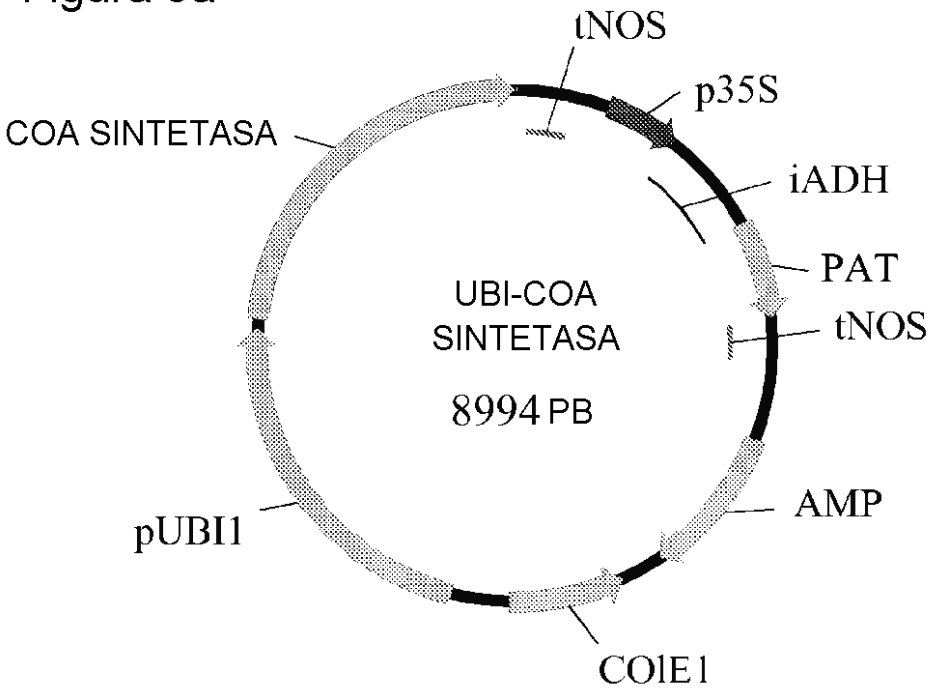
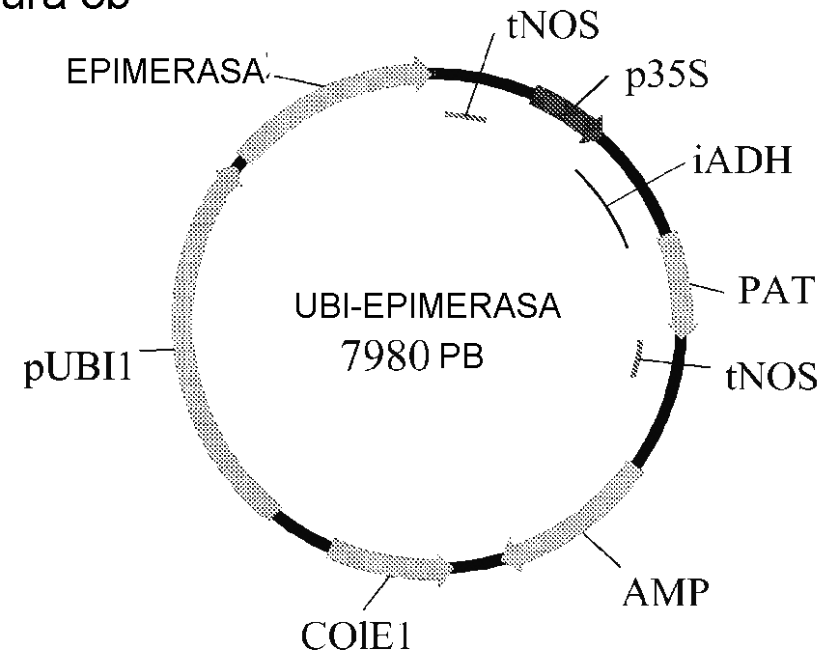



Figura 3b