

PETITORIO

AS: 88.855

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



02 075735

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

licación : 82875735 88888888 Folios: 114
ha (AMD): 2002-08-27 16:53:51
ite : 811 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
endencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: YALE UNIVERSITY

Dirección: 451 College Street, New Haven, CT
06511, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos
Lugar de Constitución: Estados Unidos
Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: RAMIRO CASTRO DUQUE

Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9

Teléfono: 380-2200 Fax: 380-2700
E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 170.322 TP 1003

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Stephen L. Dellaporta, Maria A. Moreno

Dirección: 451 College Street, New Haven, CT 06511, Estados Unidos de América
(Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US 01/06249 Fecha 28-02-2001

Publicación Internacional No. WO 01/64926 A3 Fecha 07-09-2001

6 Título (54): METODO Y COMPOSICION PARA REDUCIR O ELIMINAR LA TRANSMISION DE UN TRANSGENE

7 Clasificación Internacional (51) C12N 15/82

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

28-02-2000

(31) Número de Solicitud

60/185.524

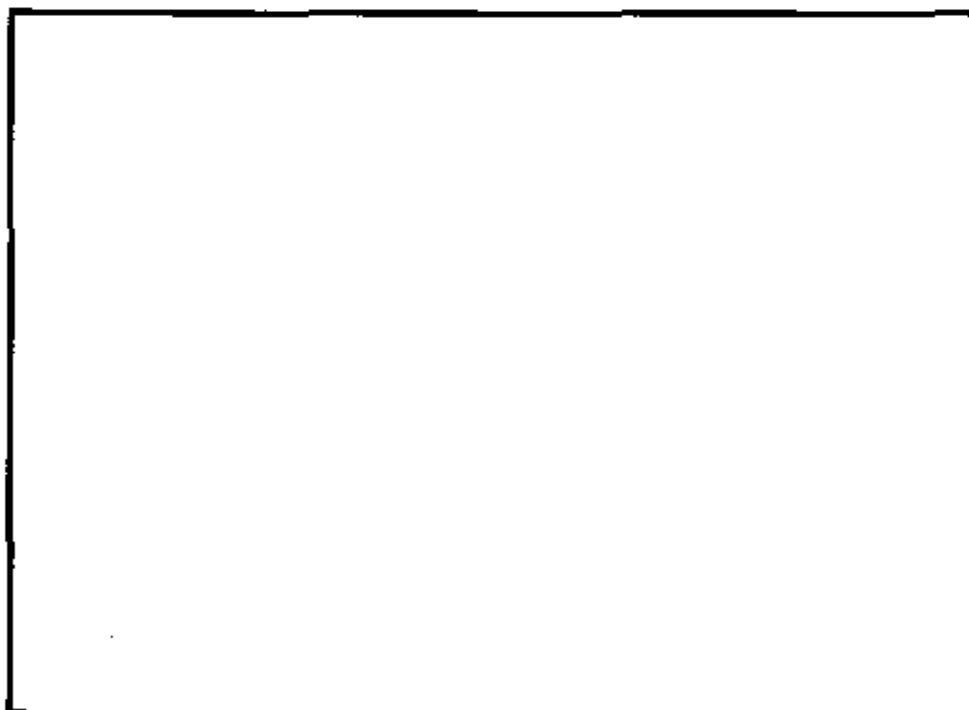
9 Comprobante de pago No. 02-45.678 y 02-45.715

Fecha 1/09/2002

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$378.000
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. \$106.000
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: RAMIRO CASTRO DUQUE

FIRMA:

C.C. 170.322 de Bogotá T.P. 1003 del C.S.J.

3/11

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02875735 88888888
Fecha (AMD): 2002-08-27 16:53:51
Trasite : 011 PCI-PATENT 378 FASE MACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2820 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

Folios: 118

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 46,678
FECHA : JULIO 17 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIAN CASTRO LYDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	5733575	16/07/2002	10,065,560.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	106,000.00
		TOTAL :	\$ 106,000.00

SOM: CIENTO SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

44

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 49,715
FECHA : JULIO 26 DE 2002

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : B2875735 60000000
Fecha (ARB) : 2002-08-27 16:53:51
Tramite : 811 PCI-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2828 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Folios: 110

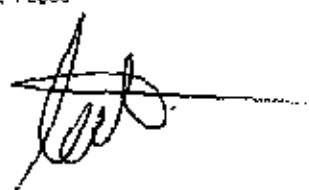
**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	VR. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	5735334	26/07/2002	4,390,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
	TOTAL :	\$ 378,000.00

SON: TRESIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS



RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



1. This document is published in English. It is also published in French, German, Japanese, Korean, Spanish, and Chinese.

(43) International Publication Date
7 September 2001 (07.09.2001)

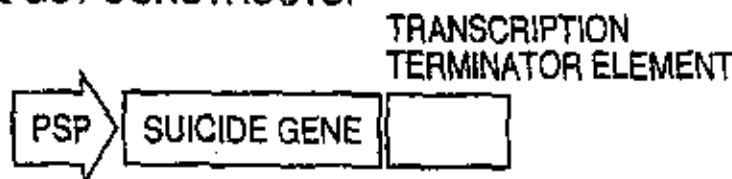
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/64926 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/82, 5/10, A01H 5/00
- (21) International Application Number: PCT/US01/06249
- (22) International Filing Date: 28 February 2001 (28.02.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/185,524 28 February 2000 (28.02.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): YALE UNIVERSITY (US/US); 451 College Street, New Haven, CT 06511 (US).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): DELLAPORTA, Stephen, L. [US/US]; 451 College Street, New Haven, CT 06511 (US). MORENO, Maria, A. [US/US]; 451 College Street, New Haven, CT 06511 (US).
- (84) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS TO REDUCE OR ELIMINATE TRANSMISSION OF A TRANSGENE

ILLUSTRATIVE GST CONSTRUCTS:



PSP = POLLEN-SPECIFIC PROMOTER

(57) Abstract: Genetic constructs and methods are disclosed for the production, maintenance and control of transgenes in transgenic eukaryotic organisms that undergo meiosis in which pollen or sperm can be outcrossed; this includes: transgenic animals, plant cells, plant tissues and whole plants. More specifically, this invention relates to the control of transgene transmission by male and/or female gametes or gametophytes using a gametophytic sterility trait (GST). The genetic constructs and methodologies of the present invention provide the ability to control the undesired spread of transgenes. In addition, this invention also provides the tools and methodologies to enrich a plant or other eukaryotic genome for dispersed and/or stable transposition events.

WO 01/64926 A2

86

METHODS AND COMPOSITIONS TO REDUCE OR ELIMINATE TRANSMISSION OF A TRANSGENE

5 CROSS REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to Provisional Application 60/185,524, filed February 28, 2000, which is hereby incorporated by reference in its entirety.

10 STATEMENT OF RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER FEDERALLY SPONSORED RESEARCH

This invention was partially made with government support under Grant Nos. NIH GM R01 GM38148 and NSF 61-2558.

FIELD OF THE INVENTION

15 This invention relates generally to the production, maintenance and control of transgenes in transgenic eukaryotic organisms that undergo meiosis in which pollen or sperm can be outcrossed; this includes: transgenic animals, plant cells, plant tissues and whole plants. More specifically, this invention relates to the control of transgene transmission by male and/or female gametes or gametophytes. The genetic constructs and methodologies of the present
20 invention provide the ability to control the undesired spread of transgenes. In addition, this invention also provides the tools and methodologies to enrich a plant genome, or any other eukaryotic genome, for dispersed and/or stable transposition events.

BACKGROUND OF THE INVENTION

25 All publications and patent applications herein are incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

Transgenic crops and the application of biotechnology are dramatically altering seed and agrochemical businesses throughout the world. The seeds of commercially important
30 crops have been genetically engineered to be resistant to herbicides and pests, especially insect pests. According to surveys by the United States Department of Agriculture (June, 2000),

genetically modified corn, soybeans and cotton were grown on approximately 25%, 54% and 61%, respectively, of the total U.S. acres for each crop in 2000.

The uncontrolled transmission of heterologous traits in commercially important crop plants is currently a major concern throughout the world and especially within the agricultural community. The undesired dissemination of transgenic pollen may unintentionally harm beneficial insects and may result in the spread of transgenes to related plant species leading to the contamination of food products and the production of herbicide- and pesticide-resistant weedy species.

The biotechnology industry is interested in transferring traits such as tolerances to drought, insects, diseases, salinity, frost and herbicides into cultivated plants which might confer an adaptive advantage over wild plants. Several crop species are known to be cross-compatible with wild species and it is possible that these traits could be inadvertently transferred to wild weedy relatives through sexual hybridization leading to possible economic and ecological harm. Since most forage and turf grasses have undergone relatively little domestication and may even be considered weeds in certain instances (e.g., bermudagrass), there is a high probability of greater problems in the ultimate release and use of such genetically transformed plants. Because forage grasses, in general, are not highly domesticated, possess weedy characteristics, and are highly outcrossing, special difficulties may be encountered in the ultimate release of transgenic forage grasses.

It would be highly desirable to have a method to prevent the undesired transmission of heterologous traits in commercially important crop plants. If this could be achieved, genetic leakage of heterologous traits would be brought under control and the spread of these traits to undesired recipients would be curtailed. Thus, the need exists for a genetic system that selects against male or female gametophytes containing transgenes, thereby preventing, eliminating or reducing the undesired transmission of heterologous traits. In particular, there is a need for a genetic system which allows for the transmission of non-transgenic (i.e., wild type) gametophytes while preventing the transmission of the transgenic (i.e., heterologous) gametophytes from the same plant.

Thus, an object of this invention is to provide recombinant nucleic acid constructs and methods for controlling, reducing or eliminating the undesired transmission of heterologous traits in commercially important crop plants.

SUMMARY OF THE INVENTION

The instant invention is directed to genetic constructs and methods for controlling the spread of heterologous traits in plants. Control is achieved by providing a sex-specific promoter operably linked to a suicide gene that selects against male or female gametes containing the suicide gene. The suicide gene locus is termed the "gametophytic suicide trait" (GST) (Figure 1A). By linking a transgene of interest to a suicide gene under the control of a sex-specific promoter, transmission of the transgene to progeny is effectively eliminated, reduced or prevented because no gametes bearing the GST will be produced.

In one aspect, the invention can be said to broadly consist of a suicide gene under the control of a pollen-specific promoter linked to a transgene of interest. The transgene complex can be introduced into a virgin plant genome and plants can be selected which are hemizygous for the transgene complex. The only pollen produced by the hemizygous plant will lack the transgene complex due to its physical linkage to the suicide gene. Uncontrolled spread of the heterologous trait encoded by the transgene complex is thereby prevented because no pollen containing the transgene complex is produced.

A second aspect of the invention is based on placing the GST in close proximity to a transposon to produce selective enrichment of dispersed transposition events in progeny cells since only those gametes lacking the GST locus will be viable. Since a fraction of the progeny cells produced from viable gametes will have undergone transposition events, selective enrichment of dispersed transposition events is achieved because the transposon is necessarily no longer linked to the GST (the GST destroys those gametes that inherit the GST gene locus) (Figure 1B).

Thus, the present invention provides genetic systems which can be used for the elimination of a GST transgene complex and for the selection for unlinked transpositions. By using the GST together with any transgene, one can completely eliminate male (or female in the case of a female gametophytic-specific promoter: suicide construct) transmission of both the GST and the associated transgene (Figure 2).

This invention provides nucleic acid constructs comprising a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene, wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a gene of interest.

This invention provides nucleic acid constructs comprising a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene, wherein the promoter and the suicide gene combination is linked to a gene of interest. This invention further provides such nucleic acid constructs wherein the promoter is selected from the group consisting of a pollen-

specific promoter and an ovule-specific promoter. This invention still further provides such nucleic acid constructs wherein the suicide gene is selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene. This invention also provides such nucleic acid constructs wherein the gene of interest is selected from the group consisting of a nucleic acid encoding herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content.

This invention provides nucleic acid constructs comprising a pollen-specific promoter or an ovule-specific promoter operably linked to a suicide gene selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene; wherein the promoter and the suicide gene combination is linked to a gene of interest selected from the group consisting of a gene coding for herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content or other agronomic trait of interest.

This invention provides methods for reducing or eliminating male transmission of a transgene locus in a plant comprising:

- a) transforming a plant cell with a nucleic acid construct in which a male gamete-specific promoter is operably linked to a suicide gene, wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a heterologous polynucleotide;
- b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce male gametes lacking said transgene locus.

This invention also provides methods for reducing or eliminating male transmission of a transgene locus in a plant comprising:

- a) transforming a plant cell with a nucleic acid construct in which a pollen-specific promoter is operably linked to a suicide gene;
 - i) wherein said suicide gene is selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene;
 - ii) wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a heterologous polynucleotide;
 - iii) wherein said heterologous polynucleotide is selected from the group consisting of DNA encoding herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content;
- b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce male gametes lacking said transgene locus.

This invention also provides methods for reducing or eliminating female transmission of a transgene locus in a plant comprising:

- a) transforming a plant cell with a nucleic acid construct in which a female gamete-specific promoter is operably linked to a suicide gene, wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a heterologous polynucleotide;
- b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce female gametes lacking said transgene locus.

This invention further provides methods for reducing or eliminating female transmission of a transgene locus in a plant comprising:

- a) transforming a plant cell with a nucleic acid construct in which an ovule-specific promoter is operably linked to a suicide gene;
 - i) wherein said suicide gene is selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene;
 - ii) wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a heterologous polynucleotide;
 - iii) wherein said heterologous polynucleotide is selected from the group consisting of DNA encoding herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content.
- b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce female gametes lacking said transgene locus.

This invention also provides transformed plant cells produced by the methods of the present invention wherein the transformed plant cells are hemizygotic for the nucleic acid construct.

This invention provides nucleic acid constructs comprising a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a transposable element. This invention also provides such nucleic acid constructs which further comprise one or more transposase genes. This invention further provides such nucleic acid constructs which further comprise one or more genes of interest. This invention still further provides such nucleic acid constructs wherein the gene of interest is associated with the transposable element.

This invention provides nucleic acid constructs in which a pollen-specific promoter or an ovule-specific promoter is operably linked to a suicide gene selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene; wherein said promoter and said

suicide gene combination is linked to a transposon, wherein said transposon comprises a selectable marker selected from the group consisting of a gene coding for herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content. This invention also provides such nucleic acid constructs wherein the promoter is
5 selected from the group consisting of a pollen-specific promoter and an ovule-specific promoter. This invention also provides such nucleic acid constructs wherein the suicide gene is selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene.

The present invention provides methods for enriching dispersed transposition events in a population of plant cell progeny comprising:

- 10 a) transforming a plant cell with the nucleic acid construct of any one of the aforementioned nucleic acid constructs to produce a transformed plant cell;
- b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce plant cell progeny in which dispersed transposition events are enriched.

The present invention also provides such methods which include the additional step of
15 isolating the plant cell progeny in which dispersed transposition events are enriched. The present invention also provides plant cells and plants which contain dispersed transposition events and, particularly, the plant cells and plants are hemizygotic for the nucleic acid.

The present invention provides nucleic acid constructs comprising a first promoter wherein the first promoter is a male gamete- or female gamete-specific promoter operably
20 linked to a suicide gene and further comprising a nucleic acid encoding a transposase and a nucleic acid encoding a transposon. The present invention also provides such nucleic acid constructs wherein the transposon comprises a second promoter operably linked to a selectable marker, wherein the selectable marker is not a suicide gene.

The present invention provides nucleic acid constructs in which a pollen-specific
25 promoter or an ovule-specific promoter is operably linked to a suicide gene selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene, wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a nucleic acid encoding transposase; wherein said promoter and said suicide gene combination linked to said nucleic acid encoding transposase comprise a transgene locus which further comprises a transposon; wherein said
30 transposon comprises a polynucleotide sequence encoding a member selected from the group consisting of herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content. The present invention provides such nucleic acid constructs wherein the promoter is selected from the group consisting of a pollen-specific promoter and an ovule-specific promoter. The present invention further provides such nucleic

acid constructs wherein the suicide gene is selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene. The present invention also provides such nucleic acid constructs wherein the transposon comprises a polynucleotide sequence encoding a member selected from the group consisting of herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content.

The present invention also provides methods for enriching stably dispersed transposition events in a population of plant cell progeny comprising:

- a) transforming a plant cell with a nucleic acid constructs of the present invention to produce a transformed plant cell;
- b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce plant cell progeny in which stably dispersed transposition events are enriched.

The present invention also provide such methods further comprising the step of isolating the plant cell progeny in which the stably dispersed transposition events are enriched. The invention further provides plant cells isolated by such methods and plants produced from the plant cells.

This invention provides vectors comprising the nucleic acid constructs of the present invention as well as host cells, recombinant plant cells and transgenic plants comprising the vectors of the present invention. More particularly, this invention provides such cells and transgenic plants which are hemizygotic for the nucleic acid constructs.

Other objects, advantages and features of the present invention become apparent to one skilled in the art upon reviewing the specification and the drawings provided herein.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The foregoing summary, as well as the following detailed description of the invention, will be better understood when read in conjunction with the appended drawings. For the purpose of illustrating the invention, there are shown in the drawings embodiment(s) which are presently preferred. It should be understood, however, that the invention is not limited to the precise arrangements and instrumentalities shown.

In the drawings:

Figure 1A shows an illustrative GST (Gametophytic Sterility Trait) Construct in which a pollen-specific promoter is operably linked to a suicide gene. The GST construct can be physically linked to a gene of interest to form a transgene complex. The GST construct is used to prevent or eliminate transmission of the gene of interest.

Figure 1B shows an illustrative GST construct linked to a transposable element and a transposase source. This construct can be used to enrich a population of plant cell progeny for stably dispersed transposons.

Figure 2 shows a generalized strategy for eliminating a transgene complex from meiotic products and to select for dispersed transpositions.

Figures 3A and 3B show schematics of GST constructs.

Figures 4A and 4B show schematics of pYU904 and pYU905 constructs, respectively.

Figure 5 shows a schematic of pYU846 transposase construct.

10 DETAILED DESCRIPTION

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are described.

It will be appreciated from the above that the tools and methods of the present invention have application to all plants that produce gametes. Such plants include, but are not limited to, forage grasses, turf grasses, forage legumes, vegetables, field crops, trees and ornamental flowers.

20

Definitions

As used herein, the term "allele" refers to any of several alternative forms of a gene.

As used herein, the term "crop plant" refers to any plant grown for any commercial purpose, including, but not limited to the following purposes: seed production, hay production, ornamental use, fruit production, berry production, vegetable production, oil production, protein production, forage production, animal grazing, golf courses, lawns, flower production, landscaping, erosion control, green manure, improving soil tilth/health, producing pharmaceutical products/drugs, producing food additives, smoking products, pulp production and wood production.

As used herein, the term "cross pollination" or "cross-breeding" refer to the process by which the pollen of one flower on one plant is applied (artificially or naturally) to the ovule (stigma) of a flower on another plant.

As used herein, the term "cultivar" refers to a variety, strain or race of plant that has been produced by horticultural or agronomic techniques and is not normally found in wild populations.

The term "dispersed transposition event" refers to the movement of a transposon such that it is no longer linked (*i.e.* in close proximity) to the transposon launch site (donor site).

The term "female" refers to a plant that produces ovules. Female plants generally produce seeds after fertilization. A plant designated as a "female plant" may contain both male and female sexual organs. Alternatively, the "female plant" may only contain female sexual organs either naturally (*e.g.*, in dioecious species) or due to emasculation (*e.g.*, by detasselling).

As used herein, the term "filial generation" refers to any of the generations of cells, tissues or organisms following a particular parental generation. The generation resulting from a mating of the parents is the first filial generation (designated as "F1" or "F₁"), while that resulting from crossing of F1 individuals is the second filial generation (designated as "F2" or "F₂").

The term "gamete" refers to a reproductive cell whose nucleus (and often cytoplasm) fuses with that of another gamete of similar origin but of opposite sex to form a zygote, which has the potential to develop into a new individual. Gametes are haploid and are differentiated into male and female.

The term "gene" refers to any segment of DNA associated with a biological function. Thus, genes include, but are not limited to, coding sequences and/or the regulatory sequences required for their expression. Genes can also include nonexpressed DNA segments that, for example, form recognition sequences for other proteins. Genes can be obtained from a variety of sources, including cloning from a source of interest or synthesizing from known or predicted sequence information, and may include sequences designed to have desired parameters.

As used herein, the term "genotype" refers to the genetic makeup of an individual cell, cell culture, tissue, plant, or group of plants.

As used herein, the term "hemizygous" refers to a cell, tissue or organism in which a gene is present only once in a genotype, as a gene in a haploid cell or organism, a sex-linked gene in the heterogametic sex, or a gene in a segment of chromosome in a diploid cell or organism where its partner segment has been deleted.

A "heterologous polynucleotide" or a "heterologous nucleic acid" or an "exogenous DNA segment" refers to a polynucleotide, nucleic acid or DNA segment that originates from a source foreign to the particular host cell, or, if from the same source, is modified from its

original form. Thus, a heterologous gene in a host cell includes a gene that is endogenous to the particular host cell, but has been modified. Thus, the terms refer to a DNA segment which is foreign or heterologous to the cell, or homologous to the cell but in a position within the host cell nucleic acid in which the element is not ordinarily found. Exogenous DNA segments are
5 expressed to yield exogenous polypeptides.

A "heterologous trait" refers to a phenotype imparted to a transformed host cell or transgenic organism by an exogenous DNA segment, heterologous polynucleotide or heterologous nucleic acid.

As used herein, the term "heterozygote" refers to a diploid or polyploid individual cell
10 or plant having different alleles (forms of a given gene) present at least at one locus.

As used herein, the term "heterozygous" refers to the presence of different alleles (forms of a given gene) at a particular gene locus.

As used herein, the term "homozygote" refers to an individual cell or plant having the same alleles at one or more loci.

As used herein, the term "homozygous" refers to the presence of identical alleles at one
15 or more loci in homologous chromosomal segments.

As used herein, the term "hybrid" refers to any individual cell, tissue or plant resulting from a cross between parents that differ in one or more genes.

As used herein, the term "inbred" or "inbred line" refers to a relatively true-breeding
20 strain.

As used herein, the term "line" is used broadly to include, but is not limited to, a group of plants vegetatively propagated from a single parent plant, via tissue culture techniques or a group of inbred plants which are genetically very similar due to descent from a common parent(s). A plant is said to "belong" to a particular line if it (a) is a primary transformant (T0)
25 plant regenerated from material of that line; (b) has a pedigree comprised of a T0 plant of that line; or (c) is genetically very similar due to common ancestry (e.g., via inbreeding or selfing). In this context, the term "pedigree" denotes the lineage of a plant, e.g. in terms of the sexual crosses effected such that a gene or a combination of genes, in heterozygous (hemizygous) or homozygous condition, imparts a desired trait to the plant.

As used herein, the term "locus" (plural: "loci") refers to any site that has been defined
30 genetically. A locus may be a gene, or part of a gene, or a DNA sequence that has some regulatory role, and may be occupied by different sequences.

The term "male" refers to a plant that produces pollen grains. The "male plant" generally refers to the sex that produces gametes for fertilizing ova. A plant designated as a

"male plant" may contain both male and female sexual organs. Alternatively, the "male plant" may only contain male sexual organs either naturally (e.g., in dioecious species) or due to emasculation (e.g., by removing the ovary).

As used herein, the term "mass selection" refers to a form of selection in which individual plants are selected and the next generation propagated from the aggregate of their seeds.

As used herein, the terms "nucleic acid" or "polynucleotide" refer to deoxyribonucleotides or ribonucleotides and polymers thereof in either single- or double-stranded form. Unless specifically limited, the terms encompass nucleic acids containing known analogues of natural nucleotides that have similar binding properties as the reference nucleic acid and are metabolized in a manner similar to naturally occurring nucleotides. Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof (e.g. degenerate codon substitutions) and complementary sequences as well as the sequence explicitly indicated. Specifically, degenerate codon substitutions may be achieved by generating sequences in which the third position of one or more selected (or all) codons is substituted with mixed-base and/or deoxyinosine residues (Batzer *et al.* (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; Cassol *et al.* (1992); Rossolini *et al.* (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98). The term nucleic acid is used interchangeably with gene, cDNA, and mRNA encoded by a gene.

As used herein, a DNA segment is referred to as "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another DNA segment. For example, DNA for a signal sequence is operably linked to DNA encoding a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it stimulates the transcription of the sequence. Generally, DNA sequences that are operably linked are contiguous, and in the case of a signal sequence both contiguous and in reading phase. However, enhancers need not be contiguous with the coding sequences whose transcription they control. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites or at adapters or linkers inserted in lieu thereof.

As used herein, the term "open pollination" refers to a plant population that is freely exposed to some gene flow, as opposed to a closed one in which there is an effective barrier to gene flow.

As used herein, the terms "open-pollinated population" or "open-pollinated variety" refer to plants normally capable of at least some cross-fertilization, selected to a standard, that may show variation but that also have one or more genotypic or phenotypic characteristics by

which the population or the variety can be differentiated from others. A hybrid, which has no barriers to cross-pollination, is an open-pollinated population or an open-pollinated variety.

As used herein, the term "ovule" refers to the female gametophyte, whereas the term "pollen" means the male gametophyte.

5 As used herein, the term "ovule-specific promoter" refers broadly to a nucleic acid sequence that regulates the expression of nucleic acid sequences selectively in the cells or tissues of a plant essential to ovule formation and/or function and/or limits the expression of a nucleic acid sequence to the period of ovule formation in a plant.

10 As used herein, the term "pollen-specific promoter" refers broadly to a nucleic acid sequence that regulates the expression of nucleic acid sequences selectively in the cells or tissues of a plant essential to pollen formation and/or function and/or limits the expression of a nucleic acid sequence to the period of pollen formation in the plant.

As used herein, the term "phenotype" refers to the observable characters of an individual cell, cell culture, plant, or group of plants which results from the interaction between
15 that individual's genetic makeup (*i.e.*, genotype) and the environment.

As used herein, the term "plant" refers to whole plants, plant organs (*e.g.*, leaves, stems, roots, *etc.*), seeds and plant cells and progeny of it. The class of plants that can be used in the methods of the invention is generally as broad as the class of higher plants amenable to transformation techniques, including both monocotyledonous and dicotyledonous plants.

20 As used herein, the term "promoter" refers to a region of DNA involved in binding RNA polymerase to initiate transcription.

As used herein, the term "recombinant" refers to a cell, tissue or organism that has undergone transformation with recombinant DNA. The original recombinant is designated as "R0" or "R₀." Selfing the R0 produces a first transformed generation designated as "R1" or
25 "R₁."

As used herein, the term "self-incompatible" means the failure, following mating or pollination, of a male gamete and a female gamete to achieve fertilization, where each of them is capable of uniting with other gametes of the breeding group after similar mating or pollination (Mather, *J. Genet.* 25:215-235 (1943)).

30 As used herein, the term "self pollinated" or "self-pollination" means the pollen of one flower on one plant is applied (artificially or naturally) to the ovule (stigma) of the same or a different flower on the same plant.

As used herein, the term "stably dispersed transposition event" refers to a dispersed transposition that does not undergo further transpositions such as secondary transposition events.

As used herein, the term "suicide gene" refers to any gene that expresses a product that is fatal to the cell expressing the suicide gene.

As used herein, the term "synthetic" refers to a set of progenies derived by intercrossing a specific set of clones or seed-propagated lines. A synthetic may contain mixtures of seed resulting from cross-, self-, and sib-fertilization.

As used herein, the term "transformation" refers to the transfer of nucleic acid (i.e., a nucleotide polymer) into a cell. As used herein, the term "genetic transformation" refers to the transfer and incorporation of DNA, especially recombinant DNA, into a cell.

As used herein, the term "transformant" refers to a cell, tissue or organism that has undergone transformation. The original transformant is designated as "T0" or "T₀." Selfing the T0 produces a first transformed generation designated as "T1" or "T₁."

As used herein, the term "transgene" refers to a nucleic acid that is inserted into an organism, host cell or vector in a manner that ensures its function.

As used herein, the term "transgenic" refers to cells, cell cultures, organisms, plants, and progeny of plants which have received a foreign or modified gene by one of the various methods of transformation, wherein the foreign or modified gene is from the same or different species than the species of the plant, or organism, receiving the foreign or modified gene.

As used herein, the term "transposase" refers to an enzyme, enzymes, or more generally, a molecule or molecules that catalyze a transposition event.

As used herein, the term "transposition event" refers to the movement of a transposon from a donor site to a target site.

As used herein, the term "transposon" refers to a genetic element, including but not limited to segments of DNA or RNA that can move from one chromosomal site to another.

As used herein, the term "variety" refers to a subdivision of a species, consisting of a group of individuals within the species that are distinct in form or function from other similar arrays of individuals.

As used herein, the term "vector" refers broadly to any plasmid or virus encoding an exogenous nucleic acid. The term should also be construed to include non-plasmid and non-viral compounds which facilitate transfer of nucleic acid into virions or cells, such as, for example, polylysine compounds and the like. The vector may be a viral vector that is suitable as a delivery vehicle for delivery of the nucleic acid, or mutant thereof, to a cell, or the vector

may be a non-viral vector which is suitable for the same purpose. Examples of viral and non-viral vectors for delivery of DNA to cells and tissues are well known in the art and are described, for example, in Ma *et al.* (1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12744-12746). Examples of viral vectors include, but are not limited to, a recombinant vaccinia virus, a recombinant adenovirus, a recombinant retrovirus, a recombinant adeno-associated virus, a recombinant avian pox virus, and the like (Cranage *et al.*, 1986, *EMBO J.* 5:3057-3063; International Patent Application No. WO94/17810, published August 18, 1994; International Patent Application No. WO94/23744, published October 27, 1994). Examples of non-viral vectors include, but are not limited to, liposomes, polyamine derivatives of DNA, and the like.

OVERVIEW OF THE INVENTION

Constructs and methods are described for the destruction of the male or female gametophyte (microspores or megaspores) for the purposes of eliminating transmission of a transgene locus (gene of interest). In one embodiment, microspore destruction is genetically engineered using a pollen-specific promoter fused to an appropriate suicide gene or through the use of genetic mutations that are unable to be transmitted through one of the sexes.

When hemizygous, eliminating transmission of a transgene locus is achieved by linking a gene of interest to a suicide gene under the control of a male or female-specific promoter. This construct, termed the "gametophytic suicide trait" (GST) induces cell death that is restricted to microspores or megaspores, thereby effectively reducing or eliminating transmission of the gene of interest that is linked to the GST. Since the GST/transgene construct is hemizygous, 50% of the pollen grains will be viable and non-transgenic. Thus, the transmission of a transgene can be controlled while permitting pollination to occur so as to achieve fertilization and ultimately obtain a seed supply for planting or food use. Since many plants produce an over-abundance of pollen, the loss of 50% of the pollen produced will not adversely affect seed set for most plant species. As one example, corn (*Zea mays*) produces as many as 10^7 pollen grains/day for a plant in the peak of a 7 day flowering period (Coe *et al.*, *The Genetics of Corn*, In: *Corn and Corn Improvement*. Third Edition. Editors: Sprague *et al.*, (1988) pp. 81-258).

Eliminating male transmission of a transgene locus can also be used as a novel strategy to enrich for dispersed and/or stable transposition events. This is accomplished by engineering a "transgene complex" containing a transposable element and/or transposase gene along with a "gametophytic suicide trait" (GST). The GST induces cell death that is restricted to microspores, severely reducing male transmission of nearby chromosomal regions and other

transgenes, including the transposon (donor element) and/or transposase gene within the transgene complex.

When the transgene complex is heterozygous in the male parent, approximately 50% of the microspores will undergo destruction, thereby preventing male transmission of the transgene complex and greatly reducing male transmission of linked transposed elements. This elimination of the transposon donor site and nearby transpositions has the net effect of enriching for pollen containing unlinked transpositions and transposed elements that have recombined with the donor transgene complex.

Surviving transposition events can be readily selected in offspring by including an herbicide selectable marker gene within the transposable element. The GST can also be physically linked to the transposase source to eliminate gametes containing a source of transposase. This arrangement prevents transmission of the transposase source to gametes, thereby stabilizing insertions in subsequent generations.

All three components -- the suicide gene or mutation, the transposase source and the transposon -- can be engineered as a unit to provide a robust method of generating dispersed, stable transpositions. An alternative strategy to microspore destruction is to engineer ovule semi-sterility using a megaspore suicide trait to eliminate female transmission of the transgene complex.

20 I. Nucleic Acids

A. Promoters

There are many excellent examples of suitable promoters to drive pollen-specific expression in plants. Pollen-specific promoters have been identified in many plant species such as maize, rice, tomato, tobacco, *Arabidopsis*, *Brassica*, and others (Odell, T. O., *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812; Marrs, K. A., *et al.* (1993) *Dev Genet*, Vol. 14/1:27-41; Kim, (1992) *Transgenic Res*, Vol. 1/4:188-94; Carpenter, J. L., *et al.* (1992) *Plant Cell* Vol. 4/5:557-71; Albani, D. *et al.* (1992) *Plant J*, 2/3:331-42; Rommens, C. M., *et al.* (1992), *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 231/3:433-41; Kloeckener-Gruissem, *et al.* (1992) *Embo J*, Vol. 11/1:157-66; Hamilton, D. A. *et al.* (1992), *Plant Mol Biol*, Vol. 18/2:211-18; Kyoizuka, J., *et al.* (1991), *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 228/1-2:40-8; Albani, D. *et al.* (1991) *Plant Mol Biol* Vol. 16/4:501-13; Twell, D. *et al.* (1991) *Genes Dev*, 5/3:496-507; Thorsness, M. K. *et al.* (1991) *Dev. Biol* Vol. 143/1:173-84; McCormick, S. *et al.* (1991) *Symp Soc Exp Biol* Vol. 45:229-44; Guerrero, F. D. *et al.* (1990) *Mol Gen Genet* Vol 224/2:161-8; Twell, D. *et al.* (1990) *Development* Vol. 109/3:705-13; Bichler, J. *et al.* (1990) , *Eur J Biochem* Vol. 190/2:415-26; van Tunen, *et al.*

(1990), Plant Cell Vol 2/5:393-401; Siebertz, B. *et al.*, (1989) Plant Cell Vol 1/10:961-8; Sullivan, T. D. *et al.*, (1989) Dev Genet Vol 10/6:412-24; Chen, J. *et al.* (1987), Genetics Vol 116/3:469-77). Several other examples of pollen-specific promoters can be found in GenBank. Additional promoters are also provided in U.S. Patent Nos. 5,086,169; 5,756,324; 5,633,438; 5,412,085; 5,545,546 and 6,172,279.

There are also several other eukaryotic sex-specific promoters suitable for use in the instant invention. Examples include: the mouse spermatocyte-specific Pgk-2 promoter (Ando *et al.* (2000) Biochem. Biophys. Res. Comm. 272/1:125-8); the PACAP testis-specific promoter (Daniel *et al.* (2000) Endocrinology, 141/3:1218-27); the mouse mSP-10 spermatid-specific promoter (Reddi *et al.* (1999) Biology of Reproduction, 61/5:1256-66); the mouse sperm-specific promoter (Ramara *et al.* (1998) J. Clin. Invest. 102/2:371-8); the mouse and rat H1t promoters (vanWert *et al.* (1996) J. Cell. Biochem. 60/3:348-62); the human PRM1, PRM2 and TNP2 spermatid-specific promoters (Nelson *et al.* (1995) DNA Sequence 5/6:329-37); the Drosophila exu sex-specific promoter (Crowley *et al.* (1995) Molec. Gen. Genet. 15 248/3:370-4); the mouse testis ACE promoter (Zhou *et al.* (1995) Dev. Genet. 16/2:201-9); the rat GHRH spermatogenic-specific promoter (Srivastava *et al.* (1995) Endocrinology 136/4:1502-8); the Drosophila testis-specific promoter (Lankenau *et al.* (1994) Mol. Cell. Biol. 14/3:1764-75); the spermatocyte-specific hst70 gene promoter (Widlak *et al.* (1994) Acta Biochim. Polonica 41/2:103-5); and the mouse Prm-1 spermatid-specific promoter 20 (Zambrowicz *et al.* (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90/11:5071-5).

For the present invention, any promoter will be suitable if the promoter is specific to one sex (male or female) and specifically drives gene expression after meiosis I when homologous chromosomes have separated into different cells. For instance, gene expression in the tetrad stage of meiosis II, the post-mitotic division of the microspore leading to pollen 25 maturation, the mature pollen grain, or in the germinating pollen grain, would be suitable for the current invention.

B. Suicide Genes

One aspect of the gametophytic suicide trait (GST) is the directed expression of a 30 suicide gene to kill unwanted meiotic products. Examples of genes whose expression results in cell death include, but are not limited to, those that have been described in the literature including the barnase (Custers, J. B., *et al.*, (1997) Plant Mol Biol Vol. 35/6:689-99; Yazynin, S., *et al.*, (1999) FEBS Lett Vol. 452/3:351-4; Goldman, M. H., *et al.*, (1994) Embo J Vol. 13/13:2976-84, 1994), tasselseed2 (DeLong, A., *et al.*, (1993) Cell Vol. 74/4:757-768), and the

diphtheria toxin A gene (Day, C. D., *et al.*, (1995) Development Vol. 121/9:2887-95). Because suicide gene expression is confined to post-meiosis I, only 50% of the gametes will be eliminated when the transgene is hemizygous and segregates normally in meiosis. Viable gametes will not have inherited the suicide gene.

5 According to another aspect of the invention, semi-sterility can also be achieved using antisense RNA technology to inhibit expression of a gene, or genes, essential for viability of the pollen or egg. This technology is discussed in more detail below.

Alternatively, mutations that are incapable of transmission through one of the sexes, such as deletions that are not pollen transmitted, can also be used to achieve semi-sterility.

10 Specific examples of suicide genes include, but are not limited to, the following:

Tassel/seed2 (*ts2*). Genetic and molecular evidence shows that *ts2* is required for pistil elimination in both tassel and ear spikelets. *ts2* expression in pistil cells is coincident with loss of nuclear integrity and cell death. It is not clear how the *ts2* gene product functions in a cell death pathway. On the basis of its similarity to short-chain alcohol dehydrogenases, especially
15 to hydroxysteroid dehydrogenases, two possibilities are theorized. The *ts2* product may metabolize a substrate, perhaps a steroid, required for cell viability. Alternatively, TS2 action may result in the formation of a signaling molecule that activates a cell death response. (Calderon-Urrea *et al.* (1999) Development, 126:435).

Diphtheria Toxin A-chain (DTA). Diphtheria Toxin A-chain (DTA) inhibits protein
20 synthesis, Greenfield *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci.:USA, 80:6853 (1983); Palmiter *et al.*, Cell, 50:435 (1987).

Pectate lyase *pelE*. Pectate lyase *pelE* from *Erwinia chrysanthemi* EC16 degrades pectin, causing cell lysis. Keen *et al.*, J. Bacteriology, 168:595 (1986).

T-urf13 (TURF-13). T-urf13 (TURF-13) from cms-T maize mitochondrial genomes;
25 this gene encodes a polypeptide designated URF13 which disrupts mitochondrial or plasma membranes. Braun *et al.*, Plant Cell, 2:153 (1990); Dewey *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci.:USA, 84:5374 (1987); Dewey *et al.*, Cell, 44:439 (1986).

Gin recombinase. Gin recombinase from phage Mu a gene encodes a site-specific DNA recombinase which will cause genome rearrangements and loss of cell viability when
30 expressed in cells of plants. Maeser *et al.*, Mol. Gen. Genet., 230:170-176 (1991).

Indole acetic acid-lysine synthetase (*iaaL*). Indole acetic acid-lysine synthetase (*iaaL*) from *Pseudomonas syringae* encodes an enzyme that conjugates lysine to indoleacetic acid (IAA). When expressed in the cells of plants, it causes altered developments due to the removal of IAA from the cell via conjugation. Romano *et al.*, Genes and Development, 5:438-

23
25

446 (1991); Spena *et al.*, Mol. Gen. Genet., 227:205-212 (1991); Roberto *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci.:USA, 87:5795-5801.

Barnase. Ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens*, also known as barnase, digests mRNA in those cells in which it is expressed, leading to cell death. Mariani *et al.*,

5 Nature 347:737-741 (1990); Mariani *et al.*, Nature 357:384-387 (1992).

CytA toxin gene. CytA toxin gene from *Bacillus thuringiensis israeliensis* encodes a protein that is mosquitocidal and hemolytic. When expressed in plant cells, it causes death of the cell due to disruption of the cell membrane. McLean *et al.*, J. Bacteriology, 169:1017-1023 (1987); Ellar *et al.*, U.S. Pat. No. 4,918,006 (1990).

10 Suitable cell death genes for use as suicide genes in other eukaryotic organisms include: human PDCD9 (programmed cell death 9) and the *Gallus gallus* pro-apoptotic protein p52 (Carim *et al.* (1999) Cytogenetics and Cell Genetics (Switzerland) 87/1-2:85-8); the *C. elegans* programmed cell death genes CED-3 and EGL-1 (Hengartner *et al.* (1999) 54:213-22); the gene encoding the mammalian homolog of *C. elegans* CED-3: ICE (interleukin-1beta-converting enzyme) (Kondo *et al.* (1998) Investigative Ophthalmology & Visual Science
15 39/13:2769-74); the genes encoding ICE-like proteases Ich-1L, CPP32beta, Mch2alpha and Mch3alpha (Kondo *et al.* (1998) 58/5:962-7); or the mammalian cell death gene Nedd2 (Kumar *et al.* (1997) Leukemia 11 Suppl 3:385-6).

20 C. Transgenics and Heterologous Nucleic Acids

Genes successfully introduced into plants using recombinant DNA methodologies include, but are not limited to, those coding for the following traits: seed storage proteins, including modified 7S legume seed storage proteins (U.S. Patent Nos. 5,508,468, 5,559,223 and 5,576,203); herbicide tolerance or resistance (U.S. Patent Nos. 5,498,544 and 5,554,798;
25 Powell *et al.*, Science 232:738-743 (1986); Kaniewski *et al.*, Bio/Tech. 8:750-754 (1990); Day *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6721-6725 (1991)); phytase (U.S. Patent No. 5,593,963); resistance to bacterial, fungal, nematode and insect pests, including resistance to the lepidoptera insects conferred by the *Bt* gene (U.S. Patent Nos. 5,597,945 and 5,597,946; Hilder *et al.*, Nature 330:160-163; Johnson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9871-9875 (1989);
30 Perlak *et al.*, Bio/Tech. 8:939-943 (1990)); lectins (U.S. Patent No. 5,276,269); and flower color (Meyer *et al.*, Nature 330:677-678 (1987); Napoli *et al.*, Plant Cell 2:279-289 (1990); van der Krol *et al.*, Plant Cell 2:291-299 (1990)).

Of particular interest are genes that confer resistance to a herbicide. Examples include, but are not limited to, the following:

(i) An herbicide that inhibits the growing point or meristem, such as an imidazalinone or a sulfonylurea. Exemplary genes in this category code for mutant ALS and AHAS enzymes as described, for example, by Lee *et al.*, EMBO J. 7: 1241 (1988), and Miki *et al.*, Theor. Appl. Genet. 80: 449 (1990), respectively.

5 (ii) Glyphosate (resistance imparted by mutant 5-enolpyruvyl-3-phosphokimate synthase (EPSP) and *aroA* genes, respectively) and other phosphono compounds such as glufosinate (phosphinothricin acetyl transferase (PAT) and *Streptomyces hygroscopicus* phosphinothricin acetyl transferase (*bar*) genes), and pyridinoxy or phenoxy proprionic acids and cyclohexones (ACCase inhibitor-encoding genes). See, for example, U.S. Pat. No. 4,940,835 to Shah *et al.*, which discloses the nucleotide sequence of a form of EPSP which can confer glyphosate resistance. A DNA molecule encoding a mutant *aroA* gene can be obtained under ATCC accession No. 39236, and the nucleotide sequence of the mutant gene is disclosed in U.S. Pat. No. 4,769,061 to Comai. European patent application No. 0 333 033 to Kumada *et al.* and U.S. Pat. No. 4,975,374 to Goodman *et al.* disclose nucleotide sequences of glutamine synthetase genes which confer resistance to herbicides such as L-phosphinothricin. The nucleotide sequence of a phosphinothricin-acetyl-transferase gene is provided in European application No. 0 242 246 to Leemans *et al.* De Greef *et al.*, Bio/Technology 7: 61 (1989), describe the production of transgenic plants that express chimeric *bar* genes coding for phosphinothricin acetyl transferase activity. Exemplary of genes conferring resistance to phenoxy proprionic acids and cyclohexones, such as sethoxydim and haloxyfop, are the *Acc1-S1*, *Acc1-S2* and *Acc1-S3* genes described by Marshall *et al.*, Theor. Appl. Genet. 83: 435 (1992). The expression of a *Streptomyces bar* gene encoding a phosphinothricin acetyl transferase in maize plants results in tolerance to the herbicide phosphinothricin or glufosinate (U.S. Pat. No. 5,489,520, incorporated herein by reference).

25 For certain target species, different antibiotic or herbicide selection markers may be preferred. Selection markers used routinely in transformation include the *nptII* gene which confers resistance to kanamycin and related antibiotics (Messing & Vierra, Gene 19: 259-268 (1982); Bevan *et al.*, Nature 304:184-187 (1983)), the *bar* gene which confers resistance to the herbicide phosphinothricin (White *et al.*, Nucl Acids Res 18: 1062 (1990), Spencer *et al.* Theor Appl Genet 79: 625-631(1990)), the *hph* gene which confers resistance to the antibiotic hygromycin (Blochinger & Diggelmann, Mol Cell Biol 4: 2929-2931), and the *dhfr* gene, which confers resistance to methotrexate (Bourouis *et al.*, EMBO J. 2(7): 1099-1104 (1983)).

30 Transgenic alfalfa plants have been produced using a number of different genes isolated from both alfalfa and non-alfalfa species including, but not limited to, the following: the

promoter of an early nodulin gene fused to the reporter gene gusA (Bauer *et al.*, The Plant Journal 10(1):91-105 (1996); the early nodulin gene (Charon *et al.*, Proc. Natl. Acad. of Sci. USA 94(16):8901-8906 (1997); Bauer *et al.*, Molecular Plant-Microbe Interactions 10(1):39-49 (1997); NADH-dependent glutamate synthase (Gantt, The Plant Journal 8(3):345-358 (1995)); promoter-gusA fusions for each of three lectin genes (Bauchrowitz *et al.*, The Plant Journal 9(1):31-43 (1996)); the luciferase enzyme of the marine soft coral *Renilla reniformis* fused to the CaMV promoter (Mayerhofer *et al.*, The Plant Journal 7(6):1031-1038 (1995)); Mn-superoxide dismutase cDNA (McKersie *et al.*, Plant Physiology 111(4):1177-1181 (1996)); synthetic cryIC genes encoding a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin (Strizhov *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(26):15012-15017 (1996)); glucanase (Dixon *et al.*, Gene 179(1):61-71 (1996); Masoud *et al.*, Transgenic Research 5(5):313-323); and leaf senescence gene (U.S. Patent No. 5,689,042).

Genes successfully transferred into clover using recombinant DNA technologies include, but are not limited to, the following: Bt genes (Voisey *et al.*, supra); neomycin phosphotransferase II (Quesbenberry *et al.*, supra); the pea lectin gene (Diaz *et al.*, Plant Physiology 109(4):1167-1177 (1995); Eijdsen *et al.*, Plant Molecular Biology 29(3):431-439 (1995)); the auxin-responsive promoter GH3 (Larkin *et al.*, Transgenic Research 5(5):325-335 (1996); seed albumin gene from sunflowers (Khan *et al.*, Transgenic Research 5(3):179-185 (1996)); and genes encoding the enzymes phosphinothricin acetyl transferase, beta-glucuronidase (GUS) coding for resistance to the Basta® herbicide, neomycin phosphotransferase, and an alpha-amylase inhibitor (Khan *et al.*, supra).

Other transgenes of interest include, but are not limited to, those coding for or related to lignin content, cellulose content, nitrogen fixation, improved nutrition, color, vitamin content and recombinantly produced vaccines.

D. Site-Specific Recombination Systems

Methods and constructs for targeting of DNA sequences for insertion into a particular DNA locus, while enabling removal of randomly inserted DNA sequences that occur as a by-product of transformation procedures, are described in U.S. patent Nos. 5,527,695 and 6,114,600. One manner of removing these random insertions is to utilize a site-specific recombinase system. In general, a site-specific recombinase system consists of three elements: two pairs of DNA sequence (the site-specific recombination sequences) and a specific enzyme (the site-specific recombinase). The site-specific recombinase will catalyze a recombination reaction only between two site-specific recombination sequences.

26
26

A number of different site-specific recombinase systems can be used, including but not limited to the Cre/lox system of bacteriophage P1, the FLP/FRT system of yeast, the Gin recombinase of phage Mu, the Pin recombinase of E. coli, and the R/RS system of the pSR1 plasmid. The two preferred site-specific recombinase systems are the bacteriophage P1 Cre/lox and the yeast FLP/FRT systems. In these systems a recombinase (Cre or FLP) will interact specifically with its respective site-specific recombination sequence (lox or FRT respectively) to invert or excise the intervening sequences. The sequence for each of these two systems is relatively short (34 bp for lox and 47 bp for FRT). Currently the FLP/FRT system of yeast is the preferred site-specific recombinase system since it normally functions in a eukaryotic organism (yeast), and is well characterized. It is thought that the eukaryotic origin of the FLP/FRT system allows the FLP/FRT system to function more efficiently in eukaryotic cells than the prokaryotic site-specific recombinase systems.

The FLP/FRT recombinase system has been demonstrated to function efficiently in plant cells. Experiments on the performance of the FLP/FRT system in both maize and rice protoplasts indicates that FRT site structure, and amount of the FLP protein present, affects excision activity. In general, short incomplete FRT sites leads to higher accumulation of excision products than the complete full-length FRT sites. Site-specific recombination systems can catalyze both intra- and intermolecular reactions in maize protoplasts, indicating that the system can be used for DNA excision as well as integration reactions. The recombination reaction is reversible and this reversibility can compromise the efficiency of the reaction in each direction. Altering the structure of the site-specific recombination sequences is one approach to remedying this situation. The site-specific recombination sequence can be mutated in a manner that the product of the recombination reaction is no longer recognized as a substrate for the reverse reaction, thereby stabilizing the integration or excision event.

E. Vectors

Expression Units to Express Exogenous DNA in a Plant

As provided above, several embodiments of the present invention employ expression units (or expression vectors or systems) to express an exogenously supplied nucleic acid sequence in a plant. Methods for generating expression units/systems/vectors for use in plants are well known in the art and can readily be adapted for use in the instant invention. A skilled artisan can readily use any appropriate plant/vector/expression system in the present methods following the outline provided herein.

27
28

The expression control elements used to regulate the expression of the protein can either be the expression control element that is normally found associated with the coding sequence (homologous expression element) or can be a heterologous expression control element. A variety of homologous and heterologous expression control elements are known in the art and can readily be used to make expression units for use in the present invention. Transcription initiation regions, for example, can include any of the various opine initiation regions, such as octopine, mannopine, nopaline and the like that are found in the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Alternatively, plant viral promoters can also be used, such as the cauliflower mosaic virus 35S promoter to control gene expression in a plant. Lastly, plant promoters such as prolifera promoter, fruit-specific promoters, Ap3 promoter, heat shock promoters, seed-specific promoters, etc. can also be used. The most preferred promoters will be most active in male or female gametes.

Either a gamete-specific promoter, a constitutive promoter (such as the CaMV or Nos promoter), an organ-specific promoter (such as the E8 promoter from tomato) or an inducible promoter is typically ligated to the protein or antisense encoding region using standard techniques known in the art. The expression unit may be further optimized by employing supplemental elements such as transcription terminators and/or enhancer elements.

Thus, for expression in plants, the expression units will typically contain, in addition to the protein sequence, a plant promoter region, a transcription initiation site and a transcription termination sequence. Unique restriction enzyme sites at the 5' and 3' ends of the expression unit are typically included to allow for easy insertion into a preexisting vector.

In the construction of heterologous promoter/structural gene or antisense combinations, the promoter is preferably positioned about the same distance from the heterologous transcription start site as it is from the transcription start site in its natural setting. As is known in the art, however, some variation in this distance can be accommodated without loss of promoter function.

In addition to a promoter sequence, the expression cassette can also contain a transcription termination region downstream of the structural gene to provide for efficient termination. The termination region may be obtained from the same gene as the promoter sequence or may be obtained from different genes. If the mRNA encoded by the structural gene is to be efficiently processed, DNA sequences which direct polyadenylation of the RNA are also commonly added to the vector construct. Polyadenylation sequences include, but are not limited to the *Agrobacterium* octopine synthase signal (Gielen *et al.*, EMBO J 3:835-846

(1984)) or the nopaline synthase signal (Depicker *et al.*, Mol. and Appl. Genet. 1:561-573 (1982)).

The resulting expression unit is ligated into or otherwise constructed to be included in a vector that is appropriate for higher plant transformation. The vector will also typically contain a selectable marker gene by which transformed plant cells can be identified in culture. Usually, the marker gene will encode antibiotic resistance. These markers include resistance to G418, hygromycin, bleomycin, kanamycin, and gentamicin. After transforming the plant cells, those cells having the vector will be identified by their ability to grow on a medium containing the particular antibiotic. Replication sequences, of bacterial or viral origin, are generally also included to allow the vector to be cloned in a bacterial or phage host, preferably a broad host range prokaryotic origin of replication is included. A selectable marker for bacteria should also be included to allow selection of bacterial cells bearing the desired construct. Suitable prokaryotic selectable markers also include resistance to antibiotics such as ampicillin, kanamycin or tetracycline.

Other DNA sequences encoding additional functions may also be present in the vector, as is known in the art. For instance, in the case of *Agrobacterium* transformations, T-DNA sequences will also be included for subsequent transfer to plant chromosomes.

The sequences of the present invention can also be fused to various other nucleic acid molecules such as Expressed Sequence Tags (ESTs), epitopes or fluorescent protein markers.

ESTs are gene fragments, typically 300 to 400 nucleotides in length, sequenced from the 3' or 5' end of complementary-DNA (cDNA) clones. Nearly 30,000 *Arabidopsis thaliana* ESTs have been produced by a French and an American consortium (Delseny *et al.*, FEBS Lett. 405(2):129-132 (1997); *Arabidopsis thaliana* Database, <http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis>). For a discussion of the analysis of gene-expression patterns derived from large EST databases, see, e.g., M. R. Fannon, TIBTECH 14:294-298 (1996).

Biologically compatible fluorescent protein probes, particularly the self-assembling green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria*, have revolutionized research in cell, molecular and developmental biology because they allow visualization of biochemical events in living cells (Murphy *et al.*, Curr. Biol. 7(11):870-876 (1997); Grebenok *et al.*, Plant J. 11(3):573-586 (1997); Pang *et al.*, Plant Physiol. 112(3) (1996); Chiu *et al.*, Curr. Biol. 6(3):325-330 (1996); Plautz *et al.*, Gene 173(1):83-87 (1996); Sheen *et al.*, Plant J. 8(5):777-784 (1995)).

Site-directed mutagenesis has been used to develop a more soluble version of the codon-modified GFP called soluble-modified GFP (smGFP). When introduced into *Arabidopsis*, greater fluorescence was observed when compared to the codon-modified GFP, implying that smGFP is 'brighter' because more of it is present in a soluble and functional form (Davis *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 36(4):521-528 (1998)). By fusing genes encoding GFP and beta-glucuronidase (GUS), researchers were able to create a set of bifunctional reporter constructs which are optimized for use in transient and stable expression systems in plants, including *Arabidopsis* (Quaedvlieg *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 37(4):715-727 (1998)).

Berger *et al.* (*Dev. Biol.* 194(2):226-234 (1998)) report the isolation of a GFP marker line for *Arabidopsis* hypocotyl epidermal cells. GFP-fusion proteins have been used to localize and characterize a number of *Arabidopsis* genes, including geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) (Zhu *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 35(3):331-341 (1997)).

Disabling Genes

An example of an effective disabling modification would be a single nucleotide deletion occurring at the beginning of a gene that would produce a translational reading frameshift. Such a frameshift would disable the gene, resulting in non-expressible gene product and thereby disrupting functional protein production by that gene. If the unmodified gene encodes a protease, for example, protease production by the gene could be disrupted if the regulatory regions or the coding regions of the protease gene are disrupted.

In addition to disabling genes by deleting nucleotides, causing a translational reading frameshift, disabling modifications would also be possible by other techniques including insertions, substitutions, inversions or transversions of nucleotides within the gene's DNA that would effectively prevent the formation of the protein encoded by the DNA.

It is also within the capabilities of one skilled in the art to disable genes by the use of less specific methods. Examples of less specific methods would be the use of chemical mutagens such as hydroxylamine or nitrosoguanidine or the use of radiation mutagens such as gamma radiation or ultraviolet radiation to randomly mutate genes. Such mutated strains could, by chance, contain disabled genes such that the genes were no longer capable of producing functional proteins for any one or more of the domains. The presence of the desired disabled genes could be detected by routine screening techniques. For further guidance, see U.S. Patent No. 5,759,538.

Antisense Encoding Vectors

Methods for inhibiting expression in plants using antisense constructs, including generation of antisense sequences *in situ* are described, for example, in U.S. Patents 5,107,065; 5,254,800; 5,356,799; 5,728,926; and 6,184,439. The later two patents being entitled:

- 5 "Antisense gene systems of pollination control for hybrid seed production".

Other methods that can be used to inhibit expression of an endogenous gene in a plant may also be used in the present methods. For example, formation of a triple helix at an essential region of a duplex gene serves this purpose. The triplex code, permitting design of the proper single stranded participant is also known in the art. (See H. E. Moser, *et al.*, Science 10 238:645-650 (1987) and M. Cooney, *et al.*, Science 241:456-459 (1988)). Regions in the control sequences containing stretches of purine bases are particularly attractive targets. Triple helix formation along with photocrosslinking is described, e.g., in D. Praseuth, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:1,349-1,353 (1988).

15 II. Transformation

A. Plant Transformation

To introduce a desired gene or set of genes by conventional methods requires a sexual cross between two lines, and then repeated back-crossing between hybrid offspring and one of the parents until a plant with the desired characteristics is obtained. This process, however, is 20 restricted to plants that can sexually hybridize, and genes in addition to the desired gene will be transferred.

Recombinant DNA techniques allow plant researchers to circumvent these limitations by enabling plant geneticists to identify and clone specific genes for desirable traits, such as resistance to an insect pest, and to introduce these genes into already useful varieties of plants. 25 Once the foreign genes have been introduced into a plant, that plant can then be used in conventional plant breeding schemes (e.g., pedigree breeding, single-seed-descent breeding schemes, reciprocal recurrent selection) to produce progeny which also contain the gene of interest.

Genes can be introduced in a site directed fashion using homologous recombination. 30 Homologous recombination permits site-specific modifications in endogenous genes and thus inherited or acquired mutations may be corrected, and/or novel alterations may be engineered into the genome.

Homologous recombination and site-directed integration in plants are discussed in U.S. Patent Nos. 5,451,513; 5,501,967 and 5,527,695.

31
m

B. Transformation Methods

Methods of producing transgenic plants are well known to those of ordinary skill in the art. Transgenic plants can now be produced by a variety of different transformation methods including, but not limited to, electroporation; microinjection; microprojectile bombardment, also known as particle acceleration or biolistic bombardment; viral-mediated transformation; and *Agrobacterium*-mediated transformation (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,405,765; 5,472,869; 5,538,877; 5,538,880; 5,550,318; 5,641,664; 5,736,369 and 5,736,369; Watson *et al.*, Recombinant DNA, Scientific American Books (1992); Hinchee *et al.*, Bio/Tech. 6:915-922 (1988); McCabe *et al.*, Bio/Tech. 6:923-926 (1988); Toriyama *et al.*, Bio/Tech. 6:1072-1074 (1988); Fromm *et al.*, Bio/Tech. 8:833-839 (1990); Mullins *et al.*, Bio/Tech. 8:833-839 (1990); and, Raineri *et al.*, Bio/Tech. 8:33-38 (1990)).

Transgenic alfalfa plants have been produced by many of these methods including, but not limited to, *agrobacterium*-mediated transformation (Wang *et al.*, Australian Journal of Plant Physiology 23(3):265-270 (1996); Hoffman *et al.*, Molecular Plant-Microbe Interactions 10(3):307-315 (1997); Trieu *et al.*, Plant Cell Reports 16:6-11 (1996)) and particle acceleration (U.S. Patent No. 5,324,646).

Transformation has also been successfully accomplished in clover using *agrobacterium*-mediated transformation (Voisey *et al.*, Biocontrol Science and Technology 4(4):475-481 (1994); Quesbenberry *et al.*, Crop Science 36(4):1045-1048(1996); Khan *et al.*, Plant Physiology 105(1):81-88 (1994); Voisey *et al.*, Plant Cell Reports 13(6):309-314 (1994)).

Genetic transformation has also been reported in numerous forage and turfgrass species (Conger B.V. Genetic Transformation of Forage Grasses in Molecular and Cellular Technologies for Forage Improvement, CSSA Special Publication No. 26, Crop Science Society of America, Inc. E.C. Brummer *et al.* Eds. 1998, pages 49-58). These include orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) red fescue (*Festuca rubra* L.), meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) and redtop (*Agrostis alba* L.).

Successful gene transfer in such forages and turfgrasses has been accomplished by direct uptake of DNA by protoplasts and by bombardment of cells or tissues with DNA coated microprojectiles. In both cases, the transfer is followed by whole plant regeneration. Much of the work has focused on developing and improving protocols for the transformation and have used the reporter gene *uidA* coding for -glucouronidase (GUS) and the selectable marker *bar* that confers tolerance to phosphinothricin-based herbicides. Proof of the transformation has

been provided by polymerase chain reaction (PCR) techniques; northern hybridization analysis of transcribed RNA, western blot analysis of soluble protein (gene product), and southern blot hybridization of total genomic DNA.

5 III. Hemizygosity

A transgenic plant formed using *Agrobacterium* transformation methods typically contains a single gene on one chromosome, although multiple copies are possible. Such transgenic plants can be referred to as being hemizygous for the added gene. A more accurate name for such a plant is an independent segregant, because each transformed plant represents a
10 unique T-DNA integration event (U.S. Patent No. 6,156,953). A transgene locus is generally characterized by the presence and/or absence of the transgene. A heterozygous genotype in which one allele corresponds to the absence of the transgene is also designated hemizygous (U.S. Patent No. 6,008,437).

Assuming normal hemizygosity, selfing will result in maximum genotypic segregation
15 in the first selfed recombinant generation, also known as the R₁ or R₁ generation. The R₁ generation is produced by selfing the original recombinant line, also known as the R₀ or R₀ generation. Because each insert acts as a dominant allele, in the absence of linkage and assuming only one hemizygous insert is required for tolerance expression, one insert would segregate 3:1, two inserts, 15:1, three inserts, 63:1, etc. Therefore, relatively few R₁ plants
20 need to be grown to find at least one resistance phenotype (U.S. Patent Nos. 5,436,175 and 5,776,760).

As mentioned above, self-pollination of a hemizygous transgenic regenerated plant should produce progeny equivalent to an F₂ in which approximately 25% should be
25 homozygous transgenic plants. Self-pollination and testcrossing of the F₂ progeny to non-transformed control plants can be used to identify homozygous transgenic plants and to maintain the line. If the progeny initially obtained for a regenerated plant were from cross pollination, then identification of homozygous transgenic plants will require an additional generation of self-pollination (U.S. Patent 5,545,545).

30 IV. Semi-Sterility and Genetic Sterility Filter

A. The Gametophytic Sterility Trait (GST)

The GST can be composed of two or three elements: a sex-specific promoter, a suicide gene and, optionally, a region encoding a transposon and/or transposase. Normally, the GST construct ends in a transcription terminator element. The inclusion of a transposon or a

transposase source is specific to the application of selecting for dispersed transpositions and not necessarily used for the purposes of eliminating transmission of transgenes.

Sex-specific promoters that may be used include but are not limited to: pollen-specific promoters from maize, rice, tomato, tobacco, *Arabidopsis* and *Brassica*. Several other examples can be found in GenBank. The promoter must be specific to one sex (male or female) and specifically drive gene expression after meiosis I when homologous chromosomes have separated into different cells.

The suicide gene is used to kill unwanted meiotic products. Suicide genes include but are not limited to: barnase, tasselseed2 and the diphtheria toxin A gene. Two alternatives to using a suicide gene include 1) using antisense RNA technology to inhibit expression of genes essential to the viability of the pollen or the egg; or 2) mutations that are incapable of transmission through one of the sexes, such as deletions that are not pollen-transmitted. Both of these alternatives can be used to achieve semi-sterility.

B. Semi-Sterility and Genetic Sterility Filter

The terms "semi-sterility" and "genetic sterility filter" are used by the inventors to convey the idea that since suicide gene expression is confined to post-meiosis I, only 50% of gametes will be eliminated when the GST locus is hemizygous and segregates normally in meiosis. This is due to the fact that when the GST locus is present in the genome in a single copy (hemizygous condition), the suicide gene will be transmitted to approximately one-half of the products of meiosis, resulting in a 50% sterility rate. Pollen inheriting the GST will not survive if a pollen specific promoter is operably linked to the suicide gene.

The production of 50% viable pollen is necessary for the recovery of dispersed transpositions and/or to prevent transgene transmission without a major effect on male fertility.

C. Gametophytic Semi-Sterility

The current invention describes the use of a technology that utilizes gametophytic "semi-sterility", such as pollen semi-sterility, to generate a "genetic sterility filter" that eliminates gametes that inherit a specific transgene complex. Incorporation of a pollen-specific promoter into the GST prevents the transmission of transgenes linked to the GST in pollen inheriting this transgene complex.

This transgene complex may also contain a launching site for a transposable element and/or transposase gene. In this case, the elimination of the transgene complex, along with the transposon donor site and/or transposase, has the net effect of eliminating nearby transpositions

34
5

while enriching for transposition events that have recombined with the transgene complex or that are dispersed (no longer linked to the GST) throughout a genome. This methodology overcomes several current limitations of transposon mutagenesis strategies that favors mostly localized over dispersed transpositions. The invention greatly improves on the current use of negative selectable markers to achieve transposon dispersion (Sundaresan, V., *et al.*, (1995) *Genes Dev.* 9/14:1797-810; Tissier, A.F. *et al.*, (1999) *The Plant Cell* Vol. 11:1841-1852). Moreover, the use of the genetic sterility filter to eliminate transmission of a transposase source stabilizes the newly transposed elements in progeny, thereby eliminating somatic or secondary transposition events that hamper mutation identification.

The nature of the semi-sterility trait and its associated transposon and/or transposase, may differ in details depending on the choice of suicide genes, promoters, transposon systems, and species. It is emphasized, however, that the same basic technology of semi-sterility can be used to recover transpositions in many plants, both monocots and dicots, in such species such as maize, rice, soybeans, wheat, oats, barley, and in non-plant systems, such as animals and fungi, that can be sexually propagated. Furthermore, an alternative strategy to microspore elimination is to eliminate female transmission of the transgene complex by engineering a megaspore suicide trait.

The semi-sterility trait is used to eliminate the products of meiosis (gametes) that carry a particular chromosomal region, such as a transposon launching site and/or transposase gene.

This "genetic sterility filter" is used to eliminate male or female transmission of a transgene complex. This elimination process has the net effect of enriching for unlinked (dispersed) transposed elements or elements that recombined from the launching site; it is also used to simultaneously eliminate transmission of other genes, such as a transposase gene, thereby stabilizing transpositions in progeny. To achieve semi-sterility, a number of preferred methods are contemplated by the instant invention. One method relies on directing microspore-specific expression of a suicide gene to kill unwanted microspores. This method is achieved by employing a specific promoter, such as a pollen-specific promoter, fused to an appropriate suicide gene, thereby killing only the products of meiosis that have inherited the gene fusion. For a single copy transgene in hemizygous condition, this represents 50% of the gametes. Because pollen is produced in large excess, reducing pollen fertility by 50% has no major consequence on subsequent seed production.

The aspect of the current invention relating to generating semi-sterility differs from previous methods aimed at achieving full male-sterility for hybrid seed production that are known in the art. In these methods, the aim has been to achieve complete male sterility to

facilitate the commercial production of hybrid seed. This usually involves expression of the suicide gene in the sporophyte or in all microspores. For instance, barnase expression in tapetal cells results in complete male sterility (Beals, T.P. *et al.* (1997) *The Plant Cell*. Vol. 9:1527-45). In hybrid seed production, pollen semi-sterility would be insufficient to achieve the desired result, *i.e.* outcrossing of male-sterile (female) parent. In cases where a microspore-specific suicide gene and its associated elements are present in the genome in a single copy (in hemizygous condition), the suicide gene will be transmitted to approximately one-half of the products of meiosis, resulting in an average of 50% semi-sterility, a rate of viable pollen production that is commercially unacceptable for hybrid seed production. For the present invention, the production of 50% viable pollen is necessary and important to recover dispersed transpositions and/or to prevent transposase transmission. Hence, the gametophytic sterility trait is used as a filter to eliminate undesirable genomes while at the same time allowing other genomes (non-transgenic and genomes containing transposed elements without the donor element and/or transposase gene present) to be transmitted. In one embodiment, the present invention makes use of this "genetic sterility filter" to eliminate a transgene complex containing a transposon launching site and/or transposase source.

V. Breeding Methods

Open-Pollinated Populations. The improvement of open-pollinated populations of such crops as rye, many maizes and sugar beets, herbage grasses, legumes such as alfalfa and clover, and tropical tree crops such as cacao, coconuts, oil palm and some rubber, depends essentially upon changing gene-frequencies towards fixation of favorable alleles while maintaining a high (but far from maximal) degree of heterozygosity. Uniformity in such populations is impossible and trueness-to-type in an open-pollinated variety is a statistical feature of the population as a whole, not a characteristic of individual plants. Thus, the heterogeneity of open-pollinated populations contrasts with the homogeneity (or virtually so) of inbred lines, clones and hybrids.

Population improvement methods fall naturally into two groups, those based on purely phenotypic selection, normally called mass selection, and those based on selection with progeny testing. Interpopulation improvement utilizes the concept of open breeding populations; allowing genes to flow from one population to another. Plants in one population (cultivar, strain, ecotype, or any germplasm source) are crossed either naturally (*e.g.*, by wind) or by hand or by bees (commonly *Apis mellifera* L. or *Megachile rotundata* F.) with plants

36
20

from other populations. Selection is applied to improve one (or sometimes both) population(s) by isolating plants with desirable traits from both sources.

There are basically two primary methods of open-pollinated population improvement. First, there is the situation in which a population is changed *en masse* by a chosen selection procedure. The outcome is an improved population that is indefinitely propagable by random-mating within itself in isolation. Second, the synthetic variety attains the same end result as population improvement but is not itself propagable as such; it has to be reconstructed from parental lines or clones. These plant breeding procedures for improving open-pollinated populations are well known to those skilled in the art and comprehensive reviews of breeding procedures routinely used for improving cross-pollinated plants are provided in numerous texts and articles, including: Allard, Principles of Plant Breeding, John Wiley & Sons, Inc. (1960); Simmonds, Principles of Crop Improvement, Longman Group Limited (1979); Hallauer and Miranda, Quantitative Genetics in Maize Breeding, Iowa State University Press (1981); and, Jensen, Plant Breeding Methodology, John Wiley & Sons, Inc. (1988).

Mass Selection. In mass selection, desirable individual plants are chosen, harvested, and the seed composited without progeny testing to produce the following generation. Since selection is based on the maternal parent only, and there is no control over pollination, mass selection amounts to a form of random mating with selection. As stated above, the purpose of mass selection is to increase the proportion of superior genotypes in the population.

Synthetics. A synthetic variety is produced by crossing *inter se* a number of genotypes selected for good combining ability in all possible hybrid combinations, with subsequent maintenance of the variety by open pollination. Whether parents are (more or less inbred) seed-propagated lines, as in some sugar beet and beans (*Vicia*) or clones, as in herbage grasses, clovers and alfalfa, makes no difference in principle. Parents are selected on general combining ability, sometimes by test crosses or topcrosses, more generally by polycrosses. Parental seed lines may be deliberately inbred (e.g. by selfing or sib crossing). However, even if the parents are not deliberately inbred, selection within lines during line maintenance will ensure that some inbreeding occurs. Clonal parents will, of course, remain unchanged and highly heterozygous.

Whether a synthetic can go straight from the parental seed production plot to the farmer or must first undergo one or two cycles of multiplication depends on seed production and the scale of demand for seed. In practice, grasses and clovers are generally multiplied once or twice and are thus considerably removed from the original synthetic.

transposase in trans can transpose transposons that do not encode transposase but contain terminal sequences, usually inverted repeats, required for transposition (non-autonomous elements).

A. Ds Elements

5 In one of the preferred embodiments, a Ds element is contemplated such that it contains the terminal sequences required for transposition (Coupland, G., *et al.*, (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9385-8; Chatterjee, S. *et al.*, (1995) Mol Gen Genet. 249:281-8), a minimal promoter (-47 CaMV 35S promoter) fused to GUS reporter gene for enhancer detection; in opposite orientation, a splice acceptor site fused to an enhanced fluorescent, dual-spectrum
10 GFP gene (Haseloff, J., *et al.*, (1997) Proc Natl Acad Sci USA. 94:2122-7; Haseloff, J., *et al.*, (1999) Methods Mol Biol. 122:241-59; Haseloff, J. (1999) Methods Cell Biol. 58:139-51) for gene trapping purposes. This Ds element can be used to screen for enhancer traps in one insertion orientation or gene traps in the other orientation, with respect to target gene transcription. A second embodiment using Ds substitutes a transcriptional activator at one end
15 of the Ds element in order to generate gain-of-function mutations. Both elements contain a *lox P* site for site-specific recombination (Osborne, B.L., *et al.*, (1995) 7:687-701; Medberry, S.L., *et al.*, (1995) Nucleic Acids Res. 23:485-90; Qin, M., *et al.*, (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:1706-10) and the *bar* gene Thompson, C.J., *et al.*, (1986) EMBO J. 6:2519-23) for herbicide (Finale®) for tissue culture and soil selection. Finale® is the registered trademark of
20 a glufosinate herbicide.

B. Utility of Transposon and Insertion Mutations in Plants

Transposons have great utility in genetic analysis and functional genomic analysis of bacterial, fungal, plant and animal genomes. In plants, genetically engineered transposons
25 have been successfully introduced into several species (for review see Sundaresan, V., (1996) Trends Plant Sci. Vol. 1:184-190) including rice (Izawa, T. *et al.*, (1997) Plant Mol Biol Vol. 35/1-2:219-29), tobacco, Arabidopsis, lettuce and several others. Several investigators have come up with ingenious methods to enhance the efficiency of recovering transposition events, including methods for positive selections for transposition (Fedoroff, N.V. *et al.*, (1993) Plant
30 J. Vol.3:273-289; Honma, M. A. *et al.*, (1993) Proc Natl Acad Sci USA Vol. 90/13:6242-6), selection for unlinked elements, (Tissier *et al.*, (1999) The Plant Cell Vol. 11:1841-1852; W. R.; Sundaresan, *et al.*, (1995) Genes Dev. 9/14:1797-810), dispersed launching sites throughout a genome (Cooley, M. B. *et al.*, (1996) Mol Gen Genet Vol. 252/1-2:184-94,

3/7
MT

While mass selection is sometimes used, progeny testing is generally preferred for polycrosses, because of their operational simplicity and obvious relevance to the objective, namely exploitation of general combining ability in a synthetic.

The number of parental lines or clones that enter a synthetic vary widely. In practice, numbers of parental lines range from 10 to several hundred, with 100-200 being the average. Broad based synthetics formed from 100 or more clones would be expected to be more stable during seed multiplication than narrow based synthetics.

Hybrids. A hybrid is an individual plant resulting from a cross between parents of differing genotypes. Commercial hybrids are now used extensively in many crops, including corn (maize), sorghum, sugarbeet, sunflower and broccoli. Hybrids can be formed in a number of different ways, including by crossing two parents directly (single cross hybrids), by crossing a single cross hybrid with another parent (three-way or triple cross hybrids), or by crossing two different hybrids (four-way or double cross hybrids).

Strictly speaking, most individuals in an out breeding (*i.e.*, open-pollinated) population are hybrids, but the term is usually reserved for cases in which the parents are individuals whose genomes are sufficiently distinct for them to be recognized as different species or subspecies. Hybrids may be fertile or sterile depending on qualitative and/or quantitative differences in the genomes of the two parents. Heterosis, or hybrid vigor, is usually associated with increased heterozygosity that results in increased vigor of growth, survival, and fertility of hybrids as compared with the parental lines that were used to form the hybrid. Maximum heterosis is usually achieved by crossing two genetically different, highly inbred lines.

The production of hybrids is a well-developed industry, involving the isolated production of both the parental lines and the hybrids which result from crossing those lines. For a detailed discussion of the hybrid production process, see, *e.g.*, Wright, Commercial Hybrid Seed Production 8:161-176, In Hybridization of Crop Plants, *supra*.

VI. Transposons and Transposable Elements

Transposons are genetic elements capable of transposition (movement) from a donor chromosomal site to a target site on the same chromosome or different chromosome. Transposons cause mutations by insertion into coding sequences, introns, and promoters, often completely eliminating target gene activity. Mutations caused by transposons can often be destabilized by subsequent excision of the transposon from the gene. One or more proteins, collectively referred to "transposase", are required for the excision and integration of the transposon. Transposons that encode their own source of transposase are referred to as autonomous elements. Supplying

Knapp, S. *et al.*, (1994) *Mol Gen Genet* Vol. 243/6:666-73; Osborne, B. I. *et al.*, (1991) *Genetics* Vol. 129/3:833-44; Takken, F. L. *et al.*, (1998) *Plant J* Vol. 14/4:401-11, Thomas, C. M. *et al.*, (1994) *Mol Gen Genet* Vol. 242/5:573-85; van der Biezen, E. A. *et al.*, 1996 *Mol Gen Genet* Vol. 251/3:267-80) and adding features into elements such as enhancer and gene traps (for reviews see Sharknes, W.C., (1990) *Biotechnology* 8:827-831; W. R.; Sundaresan, *et al.*, (1995) *Genes Dev* 9/14:1797-810) and transcriptional activation (Fritze, K. *et al.* (1995) *Methods Mol Biol* Vol. 44:281-94; Kakimoto, T., (1996) *Science* Vol. 274/5289:982-5; Kardailsky, I.; *et al.*, (1999) *Science* Vol. 286/5446:1962-5).

Even given the enormous progress in the utility of transposons, they still have limitations for functional genomic analysis. Transpositions are often intrachromosomal, often within a short physical distance between donor and target sites (Moreno, M.A *et al.*, (1992) *Genetics* Vol. 131:939-956; Athma, P. *et al.*, (1992) *Genetics* Vol. 131:199-209). This limitation means that most new insertions occur in regions surrounding the donor site (launching site) with many fewer elements found dispersed randomly throughout the genome. Secondly, the process of transposition is not usually controlled leading to a great many somatic insertions, which are not transmitted to progeny, and developmentally early transpositions that can lead to non-concordance in germinally transmitted events. The inability to control transpositions somatically and temporally can result in a high background of false positive insertions in genes of interest due to the non-correspondence between somatic and germinal mutational events.

C. Current State-of-the-Art Methods to Recover Dispersed Transpositions

Two methods are currently available to partially overcome the limitation of non-dispersed transpositions. One method makes use of first dispersing transposon launching sites throughout a genome. This method, however, requires a large number of transgenic starter lines to achieve widespread genome coverage. A second method to disperse transposition events is to employ a negative selectable marker(s), such as *iaaH*, *peh4*, *R404*, or a *cytosine deaminase* gene, to select against the donor site containing the transposon and/or transposase. Selection against the donor element also selects against nearby (linked) transpositions resulting in enrichment for unlinked transpositions. Negative selections have been used in *Arabidopsis* to recover unlinked *Ds* and *Spm* transpositions (W. R.; Sundaresan, *et al.*, (1995) *Genes Dev.* 9/14:1797-810; Tissier, A.F., *et al.*, (1999) *The Plant Cell* Vol. 11:1841-1852) and two negative selectable markers are based on proherbicide conversion (O'keefe, D.P. *et al.*, (1994) *Plant Physiol* Vol. 105:473-482; Dotson, S.B. *et al.*, (1996) *The Plant Journal* Vol. 10/2:383-

4/0
40

392), a process theoretically amenable to soil selections.

Nevertheless, the use of negative selectable markers imposes serious limitations on the recovery of large numbers of independent transpositions. First, several of these markers require the use of tissue-culture based (W. R.; Sundaresan, *et al.*, (1995) *Genes Dev.*

- 5 9/14:1797-810; *transposition* (Fedoroff, N.V. *et al.*, (1993) *Plant J.* Vol.:3:273-289), a labor-intensive procedure that adds great expense and time to the process of recovering large numbers of dispersed transpositions. Second, negative selections are based on the elimination of progeny carrying linked elements or transposase, or both, by chemical (Tissier, A.F., *et al.*, (1999) *The Plant Cell* Vol. 11:1841-1852; W. R.; Sundaresan, *et al.*, (1995) *Genes Dev.*
- 10 9/14:1797-810). Progeny elimination can be problematic when seed number is limited. For instance, in a plant such as rice (*Oryza sativa*), a predominantly self-pollinating species, outcrossing is tedious and time-consuming, greatly limiting the number of progeny that can be readily obtained. Hence, if transposition rates are low and unlinked transpositions represent the minority of transposition events, it would be costly and impractical to use negative
- 15 selections to recover dispersed transpositions. For instance, accounting for a rate of 1-5% transposition, 50% meiotic segregation, and only 30% unlinked transpositions, to recover 10,000 transpositions by outcrossing would require an estimated several million progeny plants. Finally, the use of negative selectable agents, such as proherbicides, can have a serious environmental impact and be costly due to the applications of chemicals that may be needed to
- 20 select for large numbers of progeny carrying dispersed transpositions. Moreover, most of these chemicals are not approved for field use.

VII. Transposase

Florally Expressed Transposase

- 25 A further limitation associated with using transposons for *mutagenesis*, *gene-tagging* and functional genomic analysis, is the lack of developmental and temporal control over the transposition process. In most cases transposase gene expression, under the control of its own promoter, or under the control of constitutive promoters, occurs during vegetative development of the plant. Vegetative expression of a transposase source leads to somatic transpositions.
- 30 These transpositions are transmitted to progeny (germinal transpositions) only when these somatic cell lineages later produce megaspores or microspores. This is problematic for two reasons. One reason is that transpositions that occur during vegetative or early reproductive development can be clonally propagated and later transmitted into many gametes, resulting in a large number of non-independent elements recovered in progeny. This is undesirable when

41
u1

large numbers of independent transpositions are needed for functional genomic analysis or gene-tagging. Second, somatic transpositions often do not include lineages that give rise to gametes, such as those occurring in epidermal lineages or in terminal vegetative structures. These transpositions are never meiotically transmitted and therefore go unrecovered in progeny. This is problematic because these somatic events can be falsely identified in tissue DNA samples as mutations, yet are never recovered in progeny. This is especially problematic when mutational screens are PCR-based examples chemical (Tissier, A.F., *et al.*, (1999) *The Plant Cell* Vol. 11:1841-1852; McKinney, E.C., *et al.*, (1995) *Plant J.* Vol. 8:613-622; Krysan, P.J *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93:8145-8150; Frey, M *et al.*, (1997) *Science* Vol. 277:696-699).

In a further embodiment of the instant invention, to minimize the problem of somatic transpositions, a transposase gene is placed under the control of a floral-specific promoter that drives gene expression in subepidermal lineages of the flower that lead to the production of microspores and megaspores. Such promoters include those found in genes such as *agamous*, *apetala1*, *apetala2*, *apetala3*, *pistillate*, and their homologs found in other plant species such as maize, and rice. For example, the *apetala3* promoter drives expression of a reporter gene in petal and sepal primordial cells of the developing floral meristems. Transposase expression under the control of the *ap3* promoter results in transpositions that are confined to floral development and, when occurring in lineages that give rise to microspores, these events will be transmitted to the next generation. Control of transposition by this method has two effects: 1) it shuts down somatic transpositions; and 2) it leads to a large number of independent transpositions when pollen is derived from many different floral meristems. Hence, somatic tissue can be sampled without the concern of somatic or secondary transpositions, and each floral meristem becomes an independent source of transposition events.

VIII. Rice - A Model Plant System

A. Rice Agriculture in the US and Worldwide

Approximately half of the world's population derives its caloric intake mainly from rice. Annual worldwide production levels are over 400 million metric tons, grown on over 200 million hectares (Anonymous (2000) USDA World Agriculture Supply and Demand Estimates. USDA Agricultural Marketing Service. Publication WASDE-362).

At present, the U.S. produces 7.5 million metric tons of rice per year, planted on 1.4 million hectares, resulting in \$1.7 billion dollars in commerce (Anonymous (2000) USDA World Agriculture Supply and Demand Estimates. USDA Agricultural Marketing Service.

*2
42

Publication WASDE-362). More than two-thirds of the rice produced in this country is exported to markets, mainly in Asia and Latin America, making the U.S. the third largest exporter worldwide.

Approximately 99% of the rice varieties currently grown are the result of public breeding programs, many originating from breeding programs sponsored by CGIAR international research centers (<http://www.cgiar.org/irri/crucial.htm>) such as International Rice Research Institute (IRRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT). The majority of U.S. rice varieties are developed in the states of Arkansas, Louisiana, Mississippi, Texas and California. Agricultural biotechnology is becoming increasingly important to develop modern varietal rice lines; biotechnology development is expected to greatly assist the U.S. rice farmers competing in this global marketplace

B. Rice as a Model System for Monocot Development

Cereals include the most important food crops in the world, and are considered a relatively recent taxon, evolving from a common ancestor only 65 million years ago (Martin, W., *et al.*, (1989) *Nature* 339:46-48; Moore, G., *et al.*, (1995) *Trends Genet.* 11:81-82). This young history is reflected in a remarkable degree of conservation in gene structure and order even though differences have arisen in genome size, haploid chromosome number, and variations in repetitive sequence composition (Moore, G., *et al.*, (1993) *Bio/technology* 11:584-589). For example, the maize genome is 8-fold larger than that of rice (Ahn, S. *et al.*, (1993) *Genetics* 90:7980-7984) and organized into a different number of chromosomes, yet comparative molecular analysis has shown that extensive synteny can be identified between much of their genomes (Ahn, S. *et al.*, (1993) *Genetics* 90:7980-7984; Bennetzen, J.L. *et al.*, (1993) *Trends Genet.* 9:259-261).

Rice is an outstanding model plant for the cereal grasses. Rice can be used to investigate basic biological issues and to learn about agronomic traits such as yield, hybrid vigor, and single and multigenic disease resistance. Different races of rice are adapted to a wide variety of environmental situations, from tropical flooding to temperate dry land, so it is a model for real life adaptive responses.

Rice has a relatively short generation time (90-120 days), making it possible to obtain three or more generations per year. A large collection of mutations have been discovered and characterized in rice.

Transgenic rice is efficiently generated by either *Agrobacterium*-mediated (Hiei, Y., *et al.*, (1994) *Plant J.* 6:271-82; Hiei, Y., *et al.*, (1997) *Plant Molec Bio.* 35:203-218; Zhang, J., *et*

43
43

et al., (1997) *Mol Biotechnol.* 8:223-31) or biolistic methods (Christou, P., *et al.*, (1991) *Biotechnology.* 9:957-962; Buchholz, W.G., *et al.*, (1998) *Methods Mol Biol.* 81:383-96). Most importantly, rice has a genome size approximately 500 megabases (Mb) (Arumanagathan, K. *et al.*, (1991) *Plant Mol. Biol. Report.* 9:208-218), only about 3-fold larger than that of the *Arabidopsis* genome, and scheduled to be sequenced around 2004. As a member of the Graminae and an important crop plant, a wealth of fundamental information about important aspects of plant biology can be learned from the rice genomics (McCouch, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1983-5; Wilson, W.A., *et al.*, (1999) *Genetics.* 153:453-73).

C. Rice Genomics

Rice is one of the most densely mapped plant genomes (McCouch, S.R., *et al.*, (1997) *Plant Mol Biol.* 35:89-99; Panaud, O., *et al.*, (1996) *Mol Gen Genet.* 252:597-607). The two best-developed recombinational maps are those developed at Cornell (<http://genome.cornell.edu/rice/>) and at the Rice Genome Project (RGP) in Japan (<http://www.dna.affrc.go.jp>), on which more than 3,000 RFLP and SSR markers have been mapped. The YAC-based physical map of rice covers more than 64% of the genome and contains 4,000 mapped ESTs (Ashikawa, I., *et al.*, (1999) *Genome.* 42:330-7). A PAC library of 71,000 clones has been mapped with STSs and ESTs and the mapped clones cover approximately 30% of the genome. Two BAC libraries with 37,000 and 55,000 members have been BAC-end sequenced and finger printed and a BAC-based physical map has been constructed (<http://www.genome.clemson.edu/projects/rice/>).

The rice genome is estimated to contain 500 Mb (Arumanagathan, K. *et al.*, (1991) *Plant Mol. Biol. Report.* 9:208-218) and 340,000 genes. The International Rice Genome Sequencing Project was formed in 1998 to obtain the complete genome sequence of *Oryza sativa ssp. japonica* cv. Nipponbare. Ten countries are collaborating in this effort. Currently about 10 Mb have been submitted to GenBank.

D. Utility of a Transposon-Based Genomics Program

The main justification for the use of transposons is their distinct advantage over other types of mutagens for functional genomic studies. In rice, T-DNA and retrotransposon mutagenesis have serious limitations. Currently, both methods require continual tissue culture selection and somatic regeneration to recover insertions, processes that are inefficient, time-consuming and prone to induction of somaclonal variation (Bao, P.H., *et al.* (1996) *Transgenic*

X4
44

Res. 5:97-103; Evans, D.A. (1989) *Trends Genet.* 5:46-50). Both agents generate only stable insertions, which subsequently limit the utility of any mutant allele. To further complicate matters, T-DNA insertions are often large, complex tandem arrays, causing difficulties with molecular analysis of mutant alleles (McKinney, E.C., *et al.*, (1995) *Plant J.* 8:613-622;

- 5 Krysan, P.J., *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8145-8150; Krysan, P.J., *et al.*, (1999) *Plant Cell* 11:2283-2290; Galbiati, *et al.*, (2000) *Functional & Integrative Genomics*, *in press*).

- In many instances, single loss-of-function mutations, such as T-DNA- or retrotransposon-induced alleles, will not provide sufficient information to derive gene function. For instance, based on limited studies to date, many gene disruptions do not produce a readily discernable phenotype (McKinney, E.C., *et al.*, (1995) *Plant J.* 8:613-622; Krysan, P.J., *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8145-8150). This does not imply lack of gene importance, however, since many of these genes will have partially redundant, overlapping or specific functions not detectable based on morphological or developmental screening of mutant lines. More detailed information, such as expression analysis and additional alleles, will be necessary.
- 10
15

- On the other hand, two-element transposon mutagenesis, such as the *Ac/Ds* system, can generate stable gene disruptions by simple insertion. Genetically engineered *Ds* elements have been successfully introduced into several plant species (for review see Martienssen, R.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2021-6; Sundaresan, V. (1996) *Trends Plant Sci.* 1:184-190) including rice (Izawa, T., *et al.* (1997) *Plant Mol Biol.* 35:219-29).
- 20

- The utility of transposons for functional genomics has been greatly enhanced by building features into synthetic transposons such as enhancer and gene traps (for reviews see Martienssen, R.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2021-6; Sharknes, W.C. (1990) *Biotechnology* 8:827-831; Sundaresan, V., Springer, *et al.*, (1995) *Genes Dev.* 9:1797-810) and transcriptional activation (Fritze, K. *et al.*, (1995) *Methods Mol Biol.* 44:281-94; Kakimoto, T. (1996) *Science*. 274:982-5; Kardailsky, I., *et al.*, (1999) *Science*. 286:1962-5). By incorporating such features, even genes that are genetically redundant can be functionally analyzed. Most importantly, the ability to remobilize a transposon creates the unique opportunity to efficiently generate derivative alleles and to efficiently mutate nearby genes by localized transposition properties of these elements (Long, D., *et al.*, (1997) *Plant J.* 11:145-8; Jones, J.D.G., *et al.*, (1990) *Plant Cell*. 2:701-707; Osborne, B.I., *et al.*, (1991) *Genetics*. 129:833-44). Starting with a just a few, well-characterized transgenic lines and the appropriate
- 25
30

X
45

genetic strategies, an extensive collection of dispersed transpositions can be efficiently generated without the need for subsequent tissue culture selection or regeneration.

E. Randomly Dispersing Ds Throughout the Rice Genome

5 The present invention includes methods that may be applied to specific genomes, including but not limited to, the rice genome. Rice is an outstanding model plant for the cereal grasses. In applying the methods of the instant invention to the rice genome, one goal is to produce an extensive collection of stable Ds insertions that are distributed throughout the rice genome. To accomplish this task, several genetic strategies are contemplated, with the main
10 goals of minimizing non-independent transpositions, dispersed Ds transpositions throughout the rice genome, and stabilized transposed elements in progeny. A specific strain contemplated for use in the methods of the instant invention is *Oryza sativa ssp. japonica* cv. Nipponbare, the strain being sequenced by the IRGSP.

In one embodiment of the instant invention, randomly dispersing Ds throughout the rice
15 genome is contemplated. Because Ds tends to transpose locally often over short genetic distances, genetic strategies must be used to counter this bias. In the past, this has been accomplished using various methods that basically involve selecting against the Ds launching site in progeny (Sundaresan, V., et al., (1995) *Genes Dev.* 9:1797-810; Tissier, A.F. et al., (1999) *The Plant Cell* 11:1841-1852), or by initially dispersing many launching sites
20 throughout a genome (Osborne, B.I., et al., (1991) *Genetics*. 129:833-44; Cooley, M.B., et al., (1996) *Mol Gen Genet.* 252:184-94; Knapp, S., et al., (1994) *Mol Gen Genet.* 243:666-73; Takken, F.L., et al., (1998) *Plant J.* 14:401-11; Thomas, C.M., et al., (1994) *Mol Gen Genet.* 242:573-85; van der Biezen, E.A., et al., (1996) *Mol Gen Genet.* 251:267-80).

Two strategies for dispersing Ds transpositions are contemplated. The first method is
25 broadly directed to including a pollen-specific suicide trait gene on the Ds launching site to eliminate transmission of the launching site along with any linked transposed elements. The suicide trait is engineered by incorporating a pollen-specific promoter driving expression of an appropriate cell death gene. Since the launching site construct is single copy and hemizygous in stock plants, 50% of the products of meiosis inherit T-DNA and undergo genetic suicide; the
30 remaining products produce viable pollen. Those transposed Ds that have recombined, either intra- or inter-chromosomally with the launching site, are pollen transmitted. These elements are readily detected in progeny by incorporating an herbicide marker (*bar* gene) into the Ds element. The herbicide marker serves a dual purpose - as an initial tissue-culture selectable

x6
u0

marker for rice transformation, and later as a soil-based selection for progeny harboring unlinked *Ds* elements.

The pollen suicide method has distinct advantages over previous strategies to select for unlinked transpositions. Its main advantage is that pollen is produced in vast excess and pollen semi-sterility is environmentally sound and will have little, if any, impact on seed production. In progeny, 50% of the testcross offspring (or 75% when selfing) are culled by negative selection simply because they inherit the launching site (and/or transposase gene, as explained below). In rice, when outcrossing is required to recover transpositions, seed production can be a limiting factor. Moreover, chemicals, such as proherbicides used for negative selection (Tissier, A.F., *et al.*, (1999) *The Plant Cell*. 11:1841-1852; Dotson, S.B., *et al.*, (1996) *The Plant Journal*. 10:383-392) are neither commercially available nor federally approved for field use. Tissue culture based negative selections (Sundaresan, V., *et al.*, (1995) *Genes Dev.* 9:1797-810; Kobayashi, T., *et al.*, (1995) *Jpn J. Genet.* 70:409-22) are impractical in rice.

In one embodiment of the instant invention, the pollen-specific suicide trait is engineered using an appropriate promoter driving the expression of a suicide gene. Several suicide genes are available, including the *barnase* gene (Goldman, M.H., *et al.*, (1994) *EMBO J.* 13:2976-84), related RNases (Fedorova, N.D., *et al.*, (1994) *Mol Biol (Mosk)*. 28:468-71), diphtheria toxin A chain gene (Tsugeki, R., *et al.*, (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:12941-6; Nilsson, O., *et al.*, (1998) *Plant J.* 15:799-804; Uk Kim, *et al.*, (1998) *Mol Cells.* 8:310-7; Day, C.D., *et al.*, (1995) *Development* 121:2887-95) and others (DeLong, A., *et al.*, (1993) *Cell*. 74:757-768). Use of the *barnase* gene has been shown to be an effective way to generate microspore-autonomous cell death when fused to a pollen-specific promoter (Custers, J.B., *et al.*, (1997) *Plant Mol Biol.* 35:689-99). In contrast to previous methods, the methods of the instant invention depend on generating semi-sterility, as opposed to complete male sterility, which may be achieved in one aspect of the present invention by engineering *barnase* expression specifically in microspores. Several promoters are available for this purpose, including both rice (Zou, J.T., *et al.*, (1994) *Amer. J. Botany.* 81:552-561) and maize pollen-specific promoters (Hamilton, D.A., *et al.*, (1992) *Plant Mol Biol.* 18:211-8), and pollen-specific promoters from several dicotyledonous species (Twell, D., *et al.*, (1991) *Genes Dev.* 5:496-507; Kulikauskas, R., *et al.*, (1997) *Plant Mol Biol.* 34:809-14; Custers, J.B., *et al.*, (1997) *Plant Mol Biol.* 35:689-99; Albani, D., *et al.*, (1991) *Plant Mol Biol.* 16:501-13; Kim, Y., *et al.*, (1992) *Transgenic Res.* 1:188-94; Twell, D., *et al.*, (1990) *Development.* 109:705-13; van Tunen, A.J., *et al.*, (1990) *Plant Cell.* 2:393-401). In a preferred embodiment, a heterologous pollen-specific promoter, such as the maize promoter (Hamilton, D.A., *et al.*,

X-7
UP

(1992) *Plant Mol Biol.* 18:211-8), is contemplated to minimize the possibility of gene silencing.

Evaluation of the effectiveness of the pollen suicide mechanism in eliminating T-DNA (launching sites), may be achieved for example, by employing a construct containing the suicide gene and the bar gene transformed into an organism such as rice via *Agrobacterium*-mediated T-DNA transformation (Hiei, Y., *et al.*, (1994) *Plant J.* 6:271-82; Hiei, Y., *et al.*, (1997) *Plant Molec Bio.* 35:205-218; Zhang, J., *et al.*, (1997) *Mol Biotechnol.* 8:223-31). Several single copy T-DNA lines (SCTLs) would then be identified by Southern analysis (Ausubel, F.M., *et al.*, (1987) In: *Current protocols in molecular biology*, ed. Chanda, V.B. Boston: John Wiley & Sons, Inc.). To test for the efficiency of T-DNA elimination, a PCR experiment would then be performed on unselected outcross progeny for detecting transmission of the T-DNA. This analysis would be performed on DNA pools from unselected progeny (e.g. a minimum of 384 DNA pools, each pool containing 12 plants). Using this evaluation procedure, it is contemplated that other constructs may be tested, such as those that include a transposase source (explained below), the pollen suicide gene, and the *Ds*-bar element.

F. Transposase Expression

A further embodiment of the instant invention is directed to enriching for independent transpositions while minimizing the recovery of non-independent ones. One way to accomplish this is by delaying transposition in development to prevent the early clonal propagation and meiotic transmission of non-independent events. Control over the developmental timing of transposition is achieved by using heterologous promoters driving the *Ac* transposase gene (Rommens, C.M., *et al.*, (1992) *Mol Gen Genet.* 231:433-41; Balcells, L. *et al.*, (1994) *Plant Mol Biol.* 24:789-98; Scofield, S.R., *et al.*, (1992) *Plant Cell.* 4:573-82; Swinburne, J., *et al.*, (1992) *Plant Cell.* 4:583-95; Grevelding, C., *et al.*, (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6085-9). Several heterologous promoters are envisaged in the instant embodiment.

In a preferred embodiment the strategy to enrich for independent transpositions is to limit transposase expression exclusively to floral development, preferably excluding pistil expression (for reasons explained below), to prevent vegetative transpositions. A floral-specific promoter may be used to drive transposase expression during the formation of stamen primordia and several are available that preclude pistil expression such as rice (Moon, Y.H., *et al.*, (1999) *Plant Mol Biol.* 40:167-77; Kang, H.G., *et al.*, (1998) *Plant Mol Biol.* 38:1021-9;

X8
48

Greco, R., *et al.*, (1997) *Mol Gen Genet.* 253:615-23) or maize MADS-box gene promoters (Mena, M., *et al.*, (1996) *Science* 274:1537-40; Mena, M., *et al.*, (1995) *Plant J.* 8:845-54). To enhance the frequency of transposition, both full-length cDNA and a truncated version of *Ac* transposase may be used in rice. The truncated version (ORF103-807) has been shown to
5 enhance the frequency of transposition in heterologous plant species (Houba-Herlin, *et al.*, (1990) *Mol Gen Genet.* 224:17-23; Li, M.G. *et al.*, (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:6044-8).

Limiting transposase expression to floral development means that each floret represents an independent source of transpositions. Statistically, the recovery of non-independent
10 transposition is low – if pollen from each anther is considered a source of independent transpositions then the frequency of progeny seed derived from pollen from the same anther will be unlikely – at least six times more anthers (six per spikelet) will be produced than seed (one per spikelet). Embodiments of the instant invention include the use of 35S-driven transposase (full-length and truncated) and florally-expressed transposase constructs
15 transformed into rice along with a simple *Ds* element inserted into the 5' UTR of a *bar* gene. Single copy insert lines are then identified by Southern analysis and these plants are outcrossed to wild type, male-sterile IR36 females. Progeny seedlings are then subjected to two foliar applications of Finale® (see below) to select progeny in which *Ds* has excised. Based on the mechanism of *Ac/Ds* transposition (Chen, J., *et al.*, (1987) *Genetics.* 117:109-116; Chen, J., *et al.*, (1992) *Genetics* 130:665-676; Greenblatt, I.M. *et al.*, (1962) *Genetics.* 47:489-501) more
20 than 50% of these progeny contain linked or unlinked transposed *Ds* elements. Finale®-resistant progeny from each stock are analyzed by Southern analysis to determine the effectiveness of recovery of independent transpositions.

Once transposed, the *Ds* element needs to be stabilized, yet still have the ability to be
25 remobilized. To stabilize transposed *Ds* elements, the appropriate transposase gene is included within the final T-DNA construct containing the *Ds* launching site. The pollen suicide process or *bar* antisense strategy eliminates the transposase source along with the T-DNA, thereby stabilizing any transposed *Ds* element in progeny. Reintroducing transposase in subsequent generations can easily destabilize the *Ds* element, permitting localized mutagenesis of
30 neighboring genes (Long, D., *et al.*, (1997) *Plant J.* 11:145-8; Ito, T., *et al.*, (1999) *Plant J.* 17:433-44) or reconstitucional (saturation) mutagenesis (Moreno, M.A., *et al.*, (1992) *Genetics.* 131:939-956; Athma, P., *et al.*, (1992) *Genetics.* 131; Das, L. *et al.*, (1995) *Plant Cell.* 7:287-94) of any single gene.

49
49

EXAMPLES

Example 1. Genetic Constructs.

pYU904 - Synthetic Ds element

The synthetic Ds element was constructed by combining the 5' and 3' ends of *Ac* required for transposition. Primers P643 (aagcttggccatattgcagtcac) (SEQ ID NO:1) and P644 (aagcttgctcgagcagggatgaaagtaggatggga) (SEQ ID NO:2) are used to amplify the 5' end of the *Activator* element (*Ac*) from coordinates 4312 to 4565 bp (GenBank Accession X01380) (SEQ ID NO:3) while adding a *Hind* III cloning site to the 3' end and both a *Hind* III and *Xho* I site to the 5' end of the fragment. Primers P645 (gaattccctcgagttagggatgaaaacggcggtaac) (SEQ ID NO:4) and P646 (gaattcgaatatagttttcattgtgtgat) (SEQ ID NO:5) are used to amplify the 3' end of the *Ac* element from coordinates 1 to 221 bp with the additional *Eco*RI and *Xho*I restriction sites were added to the 3' end of the fragment and an additional *Eco*RI restriction site was added to the 5' end of the fragment being amplified. These fragments were individually cloned in the vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen).

Plasmid pYU890 contained the 5' end fragment of the *Ac* element, and plasmid pYU892 contained the 3' end fragment of the *Ac* element.

pYU892 was digested with *Eco*RI (New England Biolabs), and the 230 base pair (bp) *Eco*RI insert was cloned into the *Eco*RI site of pUC19 (GenBank Accession M77789) to generate pYU899.

pYU890 was digested with *Hind*III (New England Biolabs), and the 250 bp insert was subcloned into the *Hind*III site of plasmid pYU899 giving rise to plasmid pYU902. This plasmid contains the 5' and 3' ends of *Ac*, required for transposition, and an internal polylinker site for subsequent cloning purposes.

A deletion derivative (pYU903) of pBLUESCRIPT II K/S (Stratagene) was constructed by first digesting with *Sac* I and *Sal* I, filling in with Klenow and religated. The plasmid was then digested with *Asp* 718 and *Apa* I, filled in with Klenow and religated. The derivative plasmid represents a deletion of the restriction sites of the *Kpn*I-*Sac*I polylinker but with an intact *Xho*I cloning site.

pYU902 was digested with *Xho*I (New England Biolabs), and the internal 571 bp fragment was cloned into the *Xho*I site of pYU903 giving rise to pYU904 (Figure 4A). This plasmid contains the 5' and 3' ends of *Ac*, and multiple cloning site within the Ds element that are now unique for the plasmid. This Ds element is referred to as "Ds-polylinker".

50
50

pYU905 - Ds Element containing Selectable Marker Gene

A 1.1 kb *Sma* I fragment containing the *bar* gene from *Streptomyces hygroscopicus* (Genbank Accession X17220) (SEQ ID NO:6) is fused to a 0.6 kb CaMV 35S promoter fragment (Benfey and Chua, 1990) and 3' polyadenylation signal element (coordinates 514-813) (GenBank Accession V00090) (SEQ ID NO:7) to create the plasmid pYU117.

Plasmid pYU 117 was digested with *Hind*III and *Sna*BI (new England Biolabs) and the 1.8 kb fragment containing the CaMV 35S promoter-*bar* gene-terminator gene was filled in with Klenow fragment DNA polymerase (New England Biolabs). The modified fragment was cloned into the *S*n site of pYU904 to generate pYU905 (Figure 4B).

pYU905 contains the CaMV 35S-driven *bar* gene inside the *Ds*-polylinker transposable element. This synthetic *Ds* element is termed "*Ds-bar*".

pYU846 - Transposase source

The plasmid pKU108A contains a transposase cDNA with a truncated reading frame (ORF103-807) (Lee and Starlinger, PNAS 87:6044-6048, 1990) was digested with *Nco*I and *Bam*HI (New England Biolabs). The internal 2.1 kb fragment was purified and subcloned into pRTL2 (Restrepo-Hartwig and Carrington, J. Virology 66:5662) previously digested with the same enzymes. The resulting plasmid, pYU846 (Figure 5), contained a transcriptional fusion between the CaMV 35S promoter, the truncated *Ac* transposase cDNA (amino acids 103-807) and the 35S polyadenylation sequence.

GST constructs

Two examples of GST constructs based on the *barnase* gene of *Bacillus amyloliquefaciens* are shown in Table 1 (SEQ ID NO:15) and Table 2 (SEQ ID NO:16). These constructs are derived by replacing the tapetal-specific tobacco promoter TA29 (Genbank Accession A18052) (SEQ ID NO:8) with a dicot pollen-specific promoter from *Arabidopsis thaliana* (At59) or monocot pollen-specific promoter from *Oryza sativa* (rice) (GenBank Accession Z16402) (SEQ ID NO:9).

The At59 promoter and 5' UTR is amplified from *A. thaliana* Col-0 genomic DNA using primers P755 (accgatgtgagttttctttcttccat) (SEQ ID NO:10) and P756 (ttataggaaaattccagcagctcagcat) (SEQ ID NO:11). These primers simultaneously amplify the promoter and 5' UTR sequence while introducing a 5' *Pst* I cloning site and a 3' *Nco* I site situated at the start of translation. This *Nco* I is fused to a 0.74 kb *Nco* I - *Eco* RI site of the *barnase* gene containing the nopaline synthase polyadenylation signal element at the 3' end to create the At59PSP:*barnase*:nos transgene (Table 1)(Figure 3A).

Likewise, the rice pollen-specific promoter (GenBank Accession Z16402) (SEQ ID NO:9) is amplified from *Oryza sativa* ssp. indica IR36 genomic DNA using primers P731 (gaattccgggcatggcctccttag) (SEQ ID NO:12) and P732 (ccatggatgatgtggctgcaaatg) (SEQ ID NO:13) which amplify a promoter and 5' UTR fragment while introducing a 5' EcoRI site and including the 3' Nco I site at the start of translation. This 0.74 kb Eco RI - Nco I fragment is ligated to the Nco I site of the barnase gene containing the nopaline synthase polyadenylation signal element at the 3' end to create the OsPSP:barnase:Nos transgene (Table 2)(Figure 3B).

T-DNA Construct

The T-DNA vector pPZP200 (GenBank Accession U10460) (SEQ ID NO:14) is digested with Pst I ligated to the 3.2 kb Pst I fragment from pYU846 to generate pYU1001. pYU1001 is digested with Asp 718, filled in with Klenow, and ligated to the T4 DNA polymerase-treated 1.2 kb Pst I - Eco RI At59:barnase:nos gene fragment (pYU1002) or to the 1.3 kb Klenow-treated Eco RI OsPSP:barnase:nos gene fragment (pYU1003).

pYU1002 or pYU1003 is digested with Sal I and ligated to the 2.3 kb Xho I Ds-bar element derived from pYU905 to give plasmid pYU1004 containing the GST, transposase source and Ds-bar element.

Table 1. Sequence and Features of AT59:Barnase:Nos GST Construct

FEATURES		Location/Qualifiers
5	misc_feature	840..1245 /note="3' regulatory sequence containing the polyadenylation site derived from the nopaline synthase gene from Agrobacterium T-DNA"
10	5'UTR	193..503 AA changed to CC at 3' end to create NcoI site
	TATA_signal	364..368
	primer_bind	1..30 change from CCAT to TGCA
15	primer_bind	complement(480..501) primer to amplify At59 promoter and introduce NcoI site
	CDS	504..839 /note="coding sequence of the barnase gene"
	promoter	1..392 At59 promoter region
20	misc_feature	1241..1246 Eco RI cloning site
	misc_feature	1..6 Pst I cloning site
BASE COUNT		400 a 232 c 235 g 375 t
ORIGIN		
25		1 ctgcagggga tttttttaat tacttgatg ataattattt tcaatagacc tagagacttg 61 atatatacta cgtttaataa tcatatgtag tatgtatgat taattaagta aatacaaaaa 121 tagttacctc aagtttttaa ggtgctattg ggttaattatc tcagtaaaaa taattattaga 181 tcaaggcaca aataactgaa aatatccaga aaagaaggat taacaaaagg catccaaaat 241 ctataattgg gtttttttga gaaatgacca tagagattta aatcaatggt tgtctaatct 301 atgttaattc tcaatctctc attgaactct ctcactctct tttctctctc cccagttcct 361 gggtatttaa gcaatcaggt gattcaaatc tttaatcttc taatcccgcc aggcctatct 421 gaaacaacaa cctccggttg aggtttttgc gggaaaatat aaagttcaca ggctttgggc 481 tctgcatttg caatatattt accatgggtac cgggttatcaa caggtttgac ggggttgagg 541 attatcttca gacatatcat aagctacctg ataattacat tacaatatca gaagcacaag 601 cctcgggctg ggtggcatca aaagggaacc ttgcagacgt cgtccggggg aaaagcatcg 661 gcggagacat cttctcaaac aggggaaggca aactccggg caaaagcggg cgaacatggc 721 gtgaagcgga tattaactat acatcaggct tcagaaattc agaccggatt ctttactcaa 781 gcgaactggc gatttacaaa acaacggacc attatcagac ctttcaaaaa atcagataac 841 gaaaaaaacg gcttcttggt gaggcggtt ttttcagctt tacataaagt gtgtaataaa 901 tttttcttca aactctgato ggtcaatttc acttccggg nnnctctaga ggatccgaag 961 cagatcggtc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctggt gccgggtctg 1021 cgatgattat catataattt ctggtgaatt acgttaagca tgtaataatt aacatgtaat 1081 gcattgacgt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaac 1141 acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gccggtgcat 1201 ctatgttaact agatcgggaa gatcccgagg taccgagctc gaattc (SEQ ID NO:15)

Table 2. Sequence and Features of OsPSP:Barnase: Nos GST Construct

FEATURES		Location/Qualifiers					
5	misc_feature	1208..1213					
		/note="Eco RI cloning site"					
	misc_feature	807..1212					
10		/note="3' regulatory sequence containing the polyadenylation site derived from the nopaline synthase gene from Agrobacterium T-DNA"					
	CDS	471..806					
		/note="coding sequence of the barnase gene"					
15	misc_feature	1..6					
		/note="Eco RI cloning site"					
	promoter	6..470					
		/note="OsPSP promoter region"					
BASE COUNT		374 a	279 c	239 g	317 t		
ORIGIN							
20	1	gaattccggg	ccatggcacc	ctttagaatg	gaggaattta	agtgaattg	agctaaacta
	61	tgtgaacatc	ctatgaagtt	actgcattca	agggcgccca	catgaattct	attcagggtc
	121	ccaagttgtg	ggcttcggtg	acgtcaaaat	tgcacagatt	tctggctggc	taaaacaccc
25	181	acaacggcaa	taatagcctc	gctcgtcaaa	acattcacc	atttttagct	tggtcatcat
	241	caaaagtagg	atcaaatcaa	caatctgctt	tctcttcagc	cactcgatcc	caacgggcac
	301	tccaacgatt	cctacttgaa	ggacagccat	ggaaatcctc	caggttcccc	aggttactta
30	361	taccacagct	cgaatccggt	ccaaaccagg	ccatttcagt	acccctctct	cacattttcc
	421	ccaaataata	atagagggaag	gggaaaaaca	catttgcagc	cacatcatcc	atggtaccgg
	481	ttatcaaac	gtttgacggg	gttgcggatt	atcttcagac	atatcataag	ctacctgata
35	541	attacattac	aaaatcagaa	gcacaagccc	tgggtggggt	ggcatcaaaa	gggaaccttg
	601	cagacgtcgc	tccggggaaa	agcatcgccg	gagacatctt	ctcaaacagg	gaaggcaaac
	661	tcccggggcaa	aagcgggacg	acatggcggtg	aagcgggat	taactatata	tcagggttca
40	721	gaaattcaga	cgggattctt	tactcaagcg	actggctgat	ttacaaaaca	acggaccatt
	781	atcagacott	tacaaaaatc	agataacgaa	aaaaacggct	tctgaggag	gccgtttttt
	841	tcagctttac	ataaagtgtg	taataaattt	ttcttcaaac	tctgatcggt	caatttcact
45	901	ttccggnnnn	ctctagagga	tcogaagcag	atcgttcaaa	catttggcaa	taaagtttct
	961	taagattcga	tctgtttgcc	ggtcttgcga	tgattatcat	ataatttctg	ttgaattacg
	1021	ttaagcatgt	aataattaac	atgtaattgca	tgacgttatt	tatgagatgg	gtttttatga
50	1081	ttagagtccc	gcaattatac	atttaatacg	cgatagaaaa	caaaatatag	cgcgcaaac
	1141	aggataaatt	atcgcgcgcg	gtgtcatcta	tgttactaga	tccgggaagat	ccccgggtac
	1201	cgagctcgaa	ttc	(SEQ ID NO:16)			

4
A**Example 2. Preventing or Eliminating Transmission of a Transgene**

When hemizygous, eliminating transmission of a transgene locus is achieved by linking a gene of interest to a suicide gene under the control of a male- or female-specific promoter.

This construct, termed the "gametophytic suicide trait" (GST) induces cell death that is restricted to the microspores or megaspores which receive the GST, thereby effectively reducing or eliminating transmission of the gene of interest that is linked to the GST.

The gene carrying the special trait (i.e., transgene of interest) that you want to eliminate from transgenic pollen can be placed anywhere as long as it is in physical proximity to the GST. Because the GST transgene complex is hemizygous, there will be complete linkage in the GST transgene complex and there is no concern that the GST and other genes and/or transgenes will recombine.

The methods of this invention can be used with *in planta* or seed transformation techniques that do not require culture or regeneration. Examples of these techniques are described in Bechtold, N., *et al.* (1993) CR Acad. Sci. Paris/Life Sciences 316:1 118-93; Chang, S. S., *et al.* (1990) Abstracts of the Fourth International Conference on Arabidopsis Research, Vienna, p. 28; Feldmann, K. A. and Marks, D. M (1987) Mol. Gen. Genet. 208:1-9; Ledoux, L., *et al.* (1985) Arabidopsis Inf Serv. 22:1-11; Feldmann, K. A. (1992) In: Methods in Arabidopsis Research (Eds. Koncz, C., Chua, N-H, Schell, J.) pp. 274-289; Chee, *et al.*, U.S. Pat. Ser. No. 5,376,543.

Arabidopsis.

Plasmids containing the GST constructs (i.e., At59PSP:barnase:nos or OsPSP:barnase:Nos) linked to the *bar* transgene are transformed by electroporation into *Agrobacterium* and then into *Arabidopsis* using the vacuum infiltration method (Bechtold *et al.*, 1993, *supra*). As discussed previously, the *bar* gene construct codes for phosphinothricin acetyl transferase (PAT) driven by the CaMV 35S promoter to provide resistance to phosphinothricin (PPT).

Transformants are selected based on resistance to PPT, and T2 seed is generated from a number of independent lines. This seed is plated on GM media containing various concentrations of herbicide and scored for germination and survival. Multiple transgenic lines overexpressing either the wild type or the resistant mutant produce significant numbers of green seedlings on an herbicide concentration that is lethal to the empty vector control.

The transgene or gene of interest to be included in the transgene complex and the initial transgenic lines need only be characterized for number of transgene loci and complexity of the

transgene insertion in order to identify lines with single-copy, non-tandemly duplicated insertions. Characterization of the initial transgenics is accomplished by PCR and/or Southern analysis, both methods being well known to those skilled in the art of DNA amplification and gel electrophoresis.

5 Transformed plants hemizygous for the GST/transgene of interest, in this example the *bar* gene, are grown under the same growing conditions with transformed plants homozygous/heterozygous for the transgene of interest alone (*i.e.*, no GST is present with the transgene) and with control, wild-type plants (*i.e.*, plants lacking both GST and the transgene of interest) using appropriate statistical procedures (*e.g.*, randomized complete block design or
10 lattice design). Pollen is collected from each of the individual plants and analyzed for the transgene and/or controlled crosses to wild-type plants are conducted and the seed is collected on a per plant basis and the resultant seeds/plants are analyzed for the transgene.

Plants hemizygous for the GST/transgene complex and wild-type plants produce pollen and/or seeds/plants all of which fail to contain the transgene of interest. In contrast, plants
15 heterozygous for the transgene produce pollen and seeds/plants which show normal segregation for the transgene of interest. Plants homozygous for the transgene of interest produce pollen all of which contain the transgene of interest. Plants homozygous for the transgene of interest when crossed to wild-type plants produce F2 seeds/plants which show normal segregation patterns for the transgene of interest. Thus, plants hemizygous for the
20 GST/transgene complex fail to produce pollen with the transgene while plants homozygous or heterozygous for the transgene alone produce at least some pollen which does contain the transgene of interest.

This is the same situation for the dispersed transposition aspect of the invention. The initial transgene complex carries both the GST and transposon and/or transposase. After the
25 transgenic lines are generated, they are selected for dispersed transpositions. That is, one or two transgenic lines are all that are needed for subsequent selections. No further transformation is necessary. An additional, optional transgene, such as the CaMV 35S promoter/*bar* gene construct can be added if desired to aid in the selection of transformants.

30 Turfgrass

A nucleic acid construct (GST) in which the gene encoding barnase under the control of a pollen-specific promoter from maize is made such that the Roundup® resistance gene is linked to the GST. A virgin (*i.e.*, wild-type) turfgrass genome is transformed with the

transgene complex containing the three elements (maize pollen-specific promoter, barnase gene, Roundup® resistance gene) such that the resultant transgenic plant is hemizygous for the transgene complex.

The transgenic plant is vegetatively propagated to yield progeny plants that are also hemizygous for the transgene complex. Although all plants generated asexually from the transgenic plants are resistant to Roundup® treatment, transmission of the Roundup® resistance gene via cross-pollination is eliminated because no viable transgenic pollen is produced.

Since the GST construct is male-specific, the hemizygotic transgenic lines can be maintained by crossing to wild-type pollen. When transgene elimination is required (e.g., in selection for dispersed transpositions) then the hemizygotic transgenic lines are used as males (pollen donors) and crossed to wild-type females. In this instance, only non-transgenic pollen or pollen containing dispersed transpositions would be propagated. For the purposes of eliminating unwanted pollen transmission of a transgene (e.g., herbicide resistance in turfgrass), the hemizygotic transgenic lines can be planted and only wild-type pollen will survive.

Alfalfa

A nucleic acid construct (GST) in which the gene encoding barnase, under the control of a pollen-specific promoter from rice, is made such that a Bt gene is linked to the GST. A virgin (i.e., wild-type) alfalfa genome is transformed with the transgene complex containing the three elements (rice pollen-specific promoter, barnase gene, Bt gene) such that the resultant transgenic plant is hemizygous for the transgene complex.

The hemizygotic transgenic plant is vegetatively propagated to yield progeny plants that are also hemizygous for the transgene complex. Although the plant is resistant/tolerant to certain lepidopteran insect pests, transmission of the Bt gene via cross pollination is eliminated because no viable transgenic pollen is produced.

Transformed Corn

In the case of corn, the GST/transgene complex is inserted into the corn genome and the "female" parent carries the transgene complex. Upon hybridization with wild-type pollen, only 1/2 of the progeny hybrid seed will carry the transgene complex (not a problem for functional genomics applications). This limitation is circumvented by using a flip or lox recombinase

system – the GST trait is kept inactive and homozygous until the hybrid is produced. At that point, *frt*- or *cre*-mediated recombination activates the GST trait (e.g., by removing a DNA block to transcription or by activating transcription), now present in all hybrid progeny instead of 1/2. The transgene complex containing activated GST is eliminated from any pollen inheriting the transgene complex (e.g. 50% of the meiotic products).

Example 3. Enriching Dispersed Transposition Events

By physically linking the sterility trait to a transposon launching site and/or transposase source, the “genetic sterility filter” is used to highly enrich for dispersed and/or stabilized transposition events without the use of chemicals and without the need to select against progeny containing linked transposition events and/or transposase source.

For instance, when 50% pollen sterility is achieved, the remaining viable haploid genomes will not have inherited the suicide gene and its associated elements such as the transposon launching site and/or transposase gene because of normal homologous chromosome segregation, independent assortment and meiotic recombination. A fraction of these viable genomes will contain newly transposed elements, especially those elements that have assorted independently or recombined from the launching site and its associated suicide gene. Therefore, the “genetic sterility filter” eliminates gametes containing transposed elements that remain linked to the launching site and/or gametes containing a transposase gene.

If the remaining viable pollen is used to fertilize ovules, either by controlled pollinations or by wind-pollination, a fraction of the resultant progeny will contain transposed elements. These progeny are readily identified by the inclusion of a selectable or screenable marker inside of the transposon, such as the petunia, *Arabidopsis*, or *Agrobacterium* CP4 EPSPS gene (Padgett, S. R. *et al.*, (1987) *Arch Biochem Biophys* Vol. 258/2:564-73; Klee, H. J. *et al.*, 1987 *Mol Gen Genet* Vol. 210/3:437-42; Hoef, A., *et al.*, (1998) *Food Addit Contam* Vol.15/7:767-74; Harrison, L. A., *et al.*, (1996) *J Nutr* Vol. 126/3:728-40), encoding glyphosate (Roundup®) resistance (Malik, J., *et al.*, (1989) *Biofactors* Vol. 2/1:17-25); or a variety of acetolactate synthase (ALS) genes, encoding resistance to sulfonylurea herbicides (Whitcomb, C. E. (1999) *Toxicol Ind Health* Vol. 15/1-2:231-9), such as the *Arabidopsis* multiherbicide-resistant gene, *csr1-4* (Mourad, G. *et al.*, (1994) *Mol Gen Genet* Vol.: 243/2:178-84), or the *bar* gene from *Streptomyces* (Thompson, C.J *et al.*, (1986) *EMBO J.* Vol. 6:2519-2523), encoding resistance to phosphinothricin (Finale®), to name a few.

In the case of the transmission of an autonomous element, such as *Ac*, progeny

containing dispersed transposed Ac elements are identified by classical genetic means such as transactivation of a Ds-induced reporter gene. In one embodiment of the instant invention, the transposon is constructed with a pollen survival gene that permits only viable pollen that contain transposed elements, thereby completely eliminating the need for chemical selection or screens.

If the GST complex additionally contains a transposable element, then the frequency of transposition (both to linked and unlinked sites) can be high, depending on the source of transposase and other factors. Assuming a transposition frequency of 5%, 70% of which may be linked, then 30% are unlinked and 15% of these (random independent assortment of the transposon with the GST chromosome) will be recovered in progeny and easily identified by herbicide resistance contained on the transposable element. If we want to recover 100,000 independent insertions, an estimate of the number of seed required would be: $(100,000 \times 2/3)/0.05 = 13,333,333$ F1 seed needed. These could be generated and screened (recovered as individual plants) in less than 3 years.

Example 4. Enriching Stably Dispersed Transposition Events

A further embodiment of the instant invention is directed to inclusion, in the transgene complex, in addition to the transposon launching site and the suicide gene, other genes such as a transposase source. In this embodiment, the "genetic sterility filter" enriches for dispersed elements while also eliminating the transmission of the transposase source to progeny.

The simultaneous elimination of the transposon donor site and transposase gene has the added benefit of transmitting transposed elements that are stabilized (*i.e.* no longer transposing due to loss of the transposase gene) thereby preventing additional transpositions (secondary transpositions) from occurring.

Other embodiments of the instant invention include positioning the transposase source and transposon launching sites in separate transgene complexes. For instance, the launching site and the transposase source can be brought together in one genome on separate elements to achieve the same enrichment for dispersed transpositions. Moreover, in cases where localized transposition is desirable, *i.e.*, to saturate a specific chromosomal region with insertions or to recover insertions in nearby genes of interest, the transposase source is eliminated by the sterility filter method without necessarily eliminating linked transpositions.

Example 5. Rice - A Model Plant System

A. Rice Transformation

Rice transgenics are generated employing a 24-well microtiter-based method that permits high throughput transgenic production. The method is an adaptation of published protocols (Hiei, Y., *et al.*, (1994) *Plant J.* 6:271-82; Hiei, Y. *et al.* (1997) *Plant Molec Bio.* 35:205-218; Zhang, J., *et al.*, (1997) *Mol Biotechnol.* 8:223-31) and involves an entirely liquid culturing and transformation system that allows the production of transgenic from scutellar callus induction, co-cultivation with *Agrobacterium*, treatment with Timentin, and shoot regeneration. This system is used to generate ca. 50-100 independent transgenic lines each month.

A tissue sample from each transgenic line is collected, DNA extracted and analyzed by Southern to identify lines that contain single copy T-DNA inserts (SCTLs). Shoots from SCTLs are micropropagated, rooted and transplanted to soil according to methods well known to one skilled in the art.

B. Genetic Methodologies

A broad-based, high volume-crossing program is available at CIAT for the generation of stocks, seed and transposon lines. Typically, about 1000 controlled (hand) crosses are made each cycle, including single, doubled, top and backcrosses. Number of F1 seeds obtained depends on the cross type and breeding objectives.

Crosses can be made throughout the year under biosafety-approved screenhouse conditions. Three plantings of parents at intervals of from 7 to 10 days are made to assure simultaneous flowering. Parents are grown in large pots or grown in the field in a hybridization block when employing the male-sterile female line.

For hand pollinations, the methods for crossing are: selection of parent plants, emasculation of panicles (removal of anthers for the female parent), covering of emasculated florets with a glassine bag, pollination of female parent with pollen collected from the male parent, covering of the pollinated panicle with the glassine bag, and identification of panicles used for crossing with a crossing tag containing relevant information about the parents, dates, and name of the person who did the crossing. For detailed information on the hybridization of rice see, for example, Coffman, W. R. and R. M. Herrera (1980) *Rice, In: Hybridization of Crop Plants*, W. R. Fehr and H. H. Hadley, Editors, Chapter 36: 511-522, American Society of Agronomists.

Selected F1 and T1 plants are harvested individually to produce F2 seeds. About 25 days after pollination hybrid seed is harvested, threshed, cleaned, placed in coin envelopes. This seed is stored under low humidity and temperature. T1 seed are grown in flats and selected for herbicide resistance by two foliar applications of 0.05% Finale® at 25 and 35 days after germination.

C. Sample Tracking

A relational, barcode sample tracking database can be used to track plants, seed, and DNA samples through the workflow. Each transgenic that is created is assigned a unique (alphanumeric) identifier. Stock plants derived from transgenics carry this identifier and a second unique stock identifier. All stocks that enter the production nurseries carry the transgenic/stock identifiers and testcross seed derived from each stock are assigned a unique identifier for each cross (T1 seed lot).

After Finale® selection, each resistant plant is assigned a unique line identifier. This information is coded on a plant label with two tearoff labels; each one contains identical alphanumeric identifiers and associated barcode. One tearoff label is attached to tissue sample and the other remains on the plant, ultimately stapled to the seed package. A widget bar code reader logs tissue samples into a database that then tracks samples through the DNA extraction queue and ultimately into a position of a 384-microtiter plate used for PCR amplification and DNA sequencing.

D. High-Throughput DNA Isolation and Normalization

Tissue samples are lyophilized prior to DNA extraction. Lyophilized tissue for shipping in plastic bags is sealed with desiccant. Tissue is ground with zirconium silica beads (ATGC, Inc.) by rapidly shaking 96-384 tubes on a commercial 10 gal paint shaker (Fluid Dynamics, Inc.).

The DNA is extracted using a high throughput, parallel method adapted from previously published methods (Galbiati, M., *et al.*, (2000) *Functional & Integrative Genomics*, *in press*) and the purified DNA is stored in 96-format microtiter plate. DNA concentration is measured robotically by the Picogreen method (Molecular Probes, Inc.) using a Spectrofluor plate reader and Genesis robotics workstation (Tecan, Inc.).

To make a second working plate for PCR analysis, DNA is normalized robotically by removing a fixed amount of DNA from each well together with the appropriate amount of

buffer into a second microtiter plate. Mother-daughter replicas of these normalized working plates are made robotically and samples are shipped for amplification and sequencing.

The feasibility of this entire procedure, including scripts, from tissue extraction to normalization, has been enabled for both maize and *Arabidopsis*.

E. Selection of Transposon Lines

Selection of transposon lines involves transgenic production and genetic testing for the recovery of single copy lines (SCLs), scaleup, sample tracking, processing and shipping followed by a production phase. Methods including DNA fingerprinting of T-DNA both in *Agrobacterium* inoculants and in primary rice transgenics, *Agrobacterium*-mediated transformation protocols, and methods for rice regeneration, micropropagation, and transplantation to soil may be employed.

Tissue is collected from each transgenic line, DNA extracted and analyzed by Southern analysis to identify single copy T-DNA lines (SCLs). All SCLs may be maintained in shoot culture and shipped for micropropagation. Rooted plantlets may be transplanted to soil and tested for transposition rates.

F. Stock Production

Genetic data on transposition frequencies is used to select for the best transgenic lines for continual stock production. Rooted shoots are transplanted to soil and further propagated by simple division to increase the numbers of male plants in the production nursery.

In one embodiment, if transpositions are limited to stamen development, an alternative, but not mutually exclusive method of stock propagation, is to cross wild-type pollen to the female transgenic plants - T-DNA elimination and transposition will not occur in this direction. Therefore, this seed can simply be replanted each season to generate additional stock for new transposition selections.

The flowering time for the rice variety Nipponbare is 60 days when grown at or near the equator. By using an equatorial location it is possible to achieve nearly 4 plant generations each year. The abbreviated generation time and constant year-round growing conditions in Cali, Mexico make rice genetics nearly as efficient as *Arabidopsis*.

62
62

G. Foundation Seed Production

In one embodiment of the instant invention, the objective is to select for single, dispersed transpositions and to recover these insertions in hemizygous condition. This permits the recovery of non-lethal, recessive lethal and female haplo-insufficient mutations.

To produce T1 seed, stock plants are crossed as males to male-sterile female plants in the nursery. Efficient outcrossing in rice can be achieved by interplanting males and male-sterile females. Male-sterility in Nipponbare is not presently available so a nuclear male sterility (*ms*) mutation is introgressed from an *O. sativa* ssp. *indica* strain into Nipponbare in the nurseries. The introgression process is greatly accelerated by marker-assisted mapping and breeding, selecting backcross progeny for the *ms* mutation and Nipponbare markers.

The *ms* locus is first mapped using previously characterized simple sequence repeat (SSR) markers (McCouch, S.R., et al., (1997) Plant Mol Biol. 35:89-99; Panaud, O., et al., (1996) Mol Gen Genet. 252:597-607). 7000 SSR sequences are available from the Monsanto rough draft (www.rice-research.org). Linked SSRs are used to follow the *ms* allele during introgression, while unlinked SSRs throughout the genome are used to select against donor germplasm.

Two backcrosses and one self pollination should be sufficient to transfer the *ms* allele to the Nipponbare background. The F1 crosses are made and F2 progeny are generated. The introgressed *ms* line is made available for T1 seed production. A 1:1 line segregating for the *ms* phenotype is used in the nursery, genotyped by SSR analysis, and the male-fertile plants culled. Transposon stocks are hybridized to *ms/ms* female plants to generate T1 seed for *Ds* line selection.

H. Transposon Line Selection

T1 seed is planted in flats and 25-day-old seedlings are selected by a foliar application of 0.05% Finale® followed by a second treatment 10-15 days later. Finale®-resistant plants are bar-coded and transplanted to the nursery and allowed to self-pollinate to generate T2 seed.

A tissue sample (ca. 1-2 gm leaf tissue) from each plant is collected, placed in bar-coded tubes, lyophilized and prepared for DNA extraction.

T2 seed from each line are collected, threshed, placed in bar-coded envelopes and prepared for storage or public distribution.

64/64

What is claimed is:

1. A nucleic acid construct comprising a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene, wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a gene of interest.
2. A nucleic acid construct comprising a pollen-specific promoter or an ovule-specific promoter operably linked to a suicide gene selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene; wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a gene of interest selected from the group consisting of a gene coding for herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content or other agronomic trait of interest.
3. The nucleic acid construct of claim 1 wherein said promoter is selected from the group consisting of a pollen-specific promoter and an ovule-specific promoter.
4. The nucleic acid construct of claim 1 wherein said suicide gene is selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene.
5. The nucleic acid construct of claim 1 wherein said gene of interest is selected from the group consisting of a nucleic acid encoding herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content.
6. A vector comprising the nucleic acid construct of claim 1.
7. A vector comprising the nucleic acid construct of claim 2.
8. A host cell comprising the vector of claim 6.
9. A host cell comprising the vector of claim 7.
10. A recombinant plant cell comprising the vector of any one of claims 6-7.
11. A transgenic plant comprising the vector of any one of claims 6-7.

12. The transgenic plant of claim 11, wherein the transgenic plant is hemizygotic for the nucleic acid construct.

5 13. A method for reducing or eliminating male transmission of a transgene locus in a plant comprising:

a) transforming a plant cell with a nucleic acid construct in which a male gamete-specific promoter is operably linked to a suicide gene, wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a heterologous polynucleotide;

10 b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce male gametes lacking said transgene locus.

14. A method for reducing or eliminating male transmission of a transgene locus in a plant comprising:

15 a) transforming a plant cell with a nucleic acid construct in which a pollen-specific promoter is operably linked to a suicide gene;

i) wherein said suicide gene is selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene;

20 ii) wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a heterologous polynucleotide;

iii) wherein said heterologous polynucleotide is selected from the group consisting of DNA encoding herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content;

25 b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce male gametes lacking said transgene locus.

15. A method for reducing or eliminating female transmission of a transgene locus in a plant comprising:

30 a) transforming a plant cell with a nucleic acid construct in which a female gamete-specific promoter is operably linked to a suicide gene, wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a heterologous polynucleotide;

b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce female gametes lacking said transgene locus.

16. A method for reducing or eliminating female transmission of a transgene locus in a plant comprising:

- 5 a) transforming a plant cell with a nucleic acid construct in which an ovule-specific promoter is operably linked to a suicide gene;
- 10 i) wherein said suicide gene is selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene;
- ii) wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a heterologous polynucleotide;
- 10 iii) wherein said heterologous polynucleotide is selected from the group consisting of DNA encoding herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content.
- 15 b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce female gametes lacking said transgene locus.

17. The transformed plant cell of claim 13, 14, 15 or 16, wherein the transformed plant cell is hemizygotic for the nucleic acid construct.

20 18. A nucleic acid construct comprising a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a transposable element.

19. The nucleic acid construct of claim 18, further comprising a transposase gene.

25

20. The nucleic acid construct of claim 18 or claim 19 further comprising a gene of interest.

21. The nucleic acid construct of claim 20, wherein the gene of interest is associated with the transposable element.

30

22. A nucleic acid construct in which a pollen-specific promoter or an ovule-specific promoter is operably linked to a suicide gene selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene; wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a transposon, wherein said transposon comprises a selectable marker

17/67

selected from the group consisting of a gene coding for herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content.

23. The nucleic acid construct of claim 22 wherein said promoter is selected from the group
5 consisting of a pollen-specific promoter and an ovule-specific promoter.

24. The nucleic acid construct of claim 22 wherein said suicide gene is selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene.

10 25. A vector comprising the nucleic acid construct of claim 18.

26. A vector comprising the nucleic acid construct of claim 22.

27. A host cell comprising the vector of claim 18.

15

28. A host cell comprising the vector of claim 22.

29. A recombinant plant cell comprising the vector of claim 18 or claim 22.

20 30. The recombinant plant cell of claim 29, wherein the recombinant plant cell is hemizygotic for the nucleic acid construct.

31. A transgenic plant comprising the vector of claim 18 or claim 22.

25 32. The transgenic plant of claim 31, wherein the recombinant plant cell is hemizygotic for the nucleic acid construct.

33. A method for enriching dispersed transposition events in a population of plant cell progeny comprising:

- 30 a) transforming a plant cell with the nucleic acid construct of any one of claims 18-24 to produce a transformed plant cell;
b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce plant cell progeny in which dispersed transposition events are enriched.

2A

34. The method of claim 33 further comprising:

c) *isolating said plant cell progeny in which dispersed transposition events are enriched.*

35. A plant cell isolated by the method of claim 34.

36. A plant produced from the plant cell of claim 35.

37. The plant cell of any one of claims 33, 34 or 35, wherein the plant cell is hemizygotic for the nucleic acid.

38. A nucleic acid construct comprising a first promoter wherein the first promoter is a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene and further comprising a nucleic acid encoding a transposase and a nucleic acid encoding a transposon.

39. The nucleic acid construct of claim 38, wherein the transposon comprises a second promoter operably linked to a selectable marker, wherein the selectable marker is not a suicide gene.

40. A nucleic acid construct in which a pollen-specific promoter or an ovule-specific promoter is operably linked to a suicide gene selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene, wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a nucleic acid encoding transposase; wherein said promoter and said suicide gene combination linked to said nucleic acid encoding transposase comprise a transgene locus which further comprises a transposon; wherein said transposon comprises a polynucleotide sequence encoding a member selected from the group consisting of herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content.

41. The nucleic acid construct of claim 40 wherein said promoter is selected from the group consisting of a pollen-specific promoter and an ovule-specific promoter.

42. The nucleic acid construct of claim 40 wherein said suicide gene is selected from the group consisting of barnase, tasselseed2 and diphtheria toxin A gene.

43. The nucleic acid construct of claim 40 wherein said transposon comprises a polynucleotide sequence encoding a member selected from the group consisting of herbicide resistance, antibiotic resistance, insecticide resistance, nitrogen fixation, improved nutrition and cellulose content.

5

44. A vector comprising the nucleic acid construct of claim 38.

45. A vector comprising the nucleic acid construct of claim 40.

10 46. A host cell comprising the vector of claim 44.

47. A host cell comprising the vector of claim 45.

15 48. The host cell of claim 46 or claim 47, wherein the nucleic acid construct is hemizygotic.

49. A recombinant plant cell comprising the vector of any one of claims 44-45.

20 50. The recombinant plant cell of claim 49, wherein the nucleic acid construct is hemizygotic.

51. A transgenic plant comprising the vector of any one of claims 44-45.

52. The transgenic plant of claim 51, wherein the nucleic acid is hemizygotic.

25

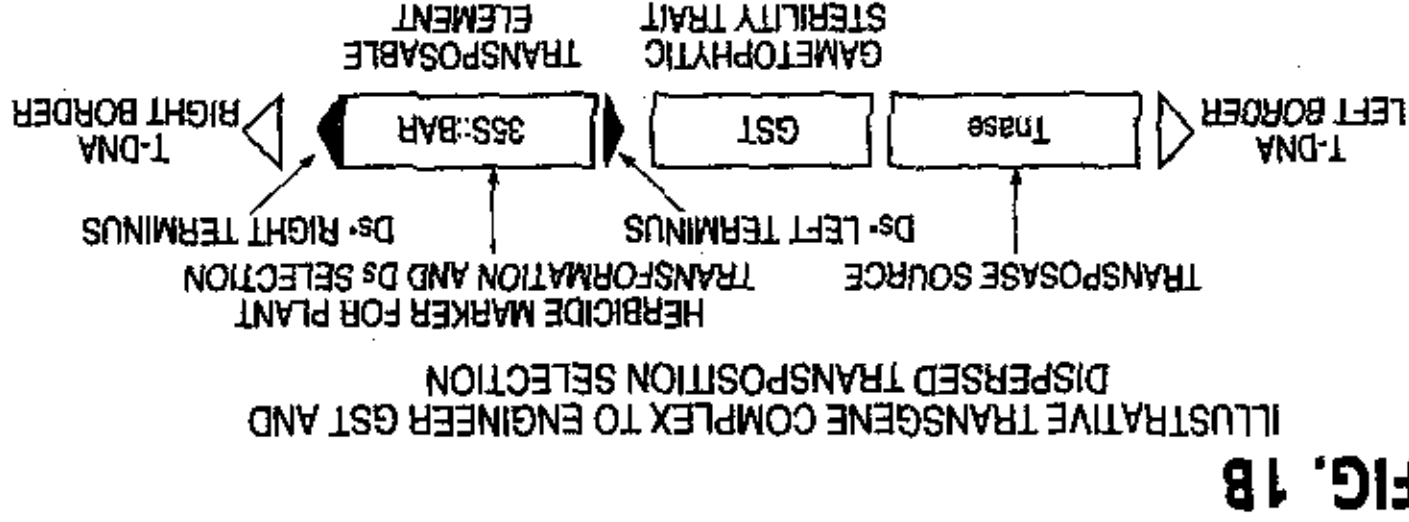
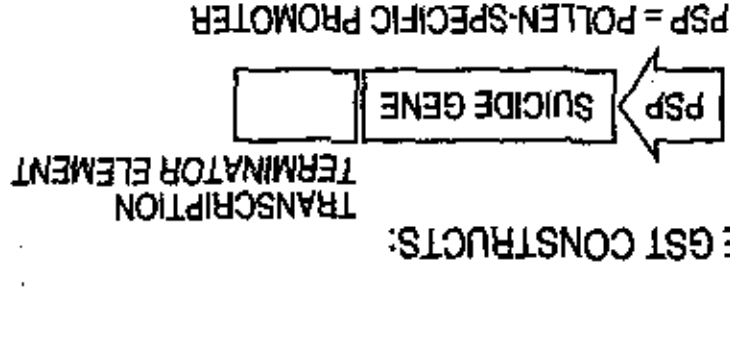
53. A method for enriching stably dispersed transposition events in a population of plant cell progeny comprising:

a) transforming a plant cell with a nucleic acid construct of any one of claims 38-43 to produce a transformed plant cell;

30 b) propagating said transformed plant cell through meiosis to produce plant cell progeny in which stably dispersed transposition events are enriched.

54. The method of claim 53 further comprising:

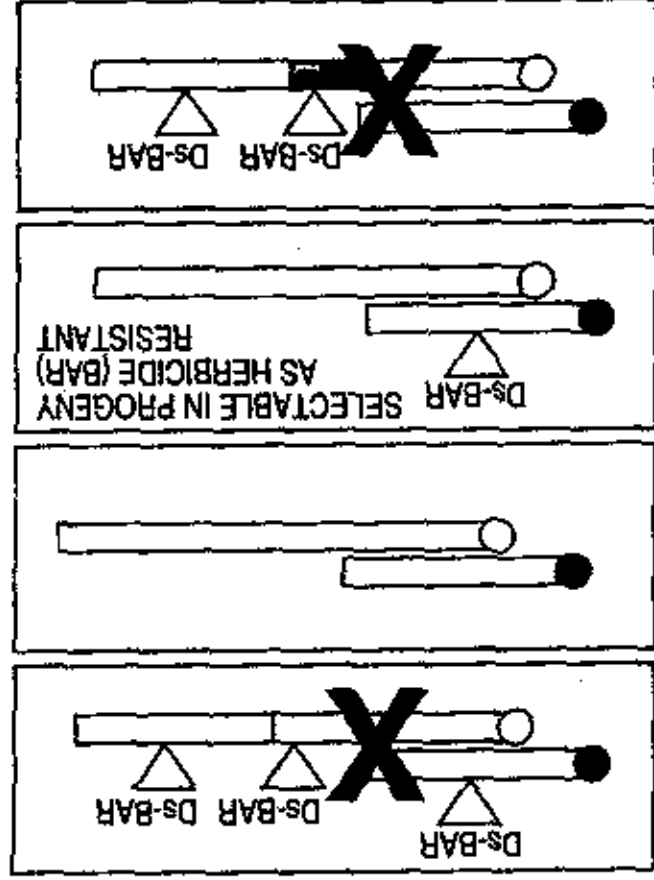
71



Handwritten marks at the top left of the page.

CROSSING OVER BETWEEN TRANSGENE COMPLEX AND LINKED Ds ELEMENT NOT SHOWN

X = LETHAL PRODUCTS (GST+)



MEIOTIC PRODUCTS

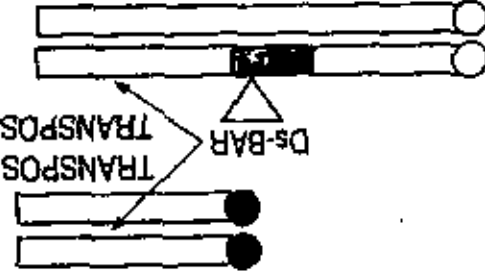
STRATEGY TO ELIMINATE TRANSGENES AND TO SELECT FOR DISPERSED TRANSPOSITIONS

FIG. 2



MEIOSIS

TRANSPOSITION TO UNLINKED SITE



HEMIZYGOUS PARENT

* ONLY TWO CHROMOSOME SETS ARE SHOWN TRANSGENE COMPLEX: GREY BOX

Handwritten signature

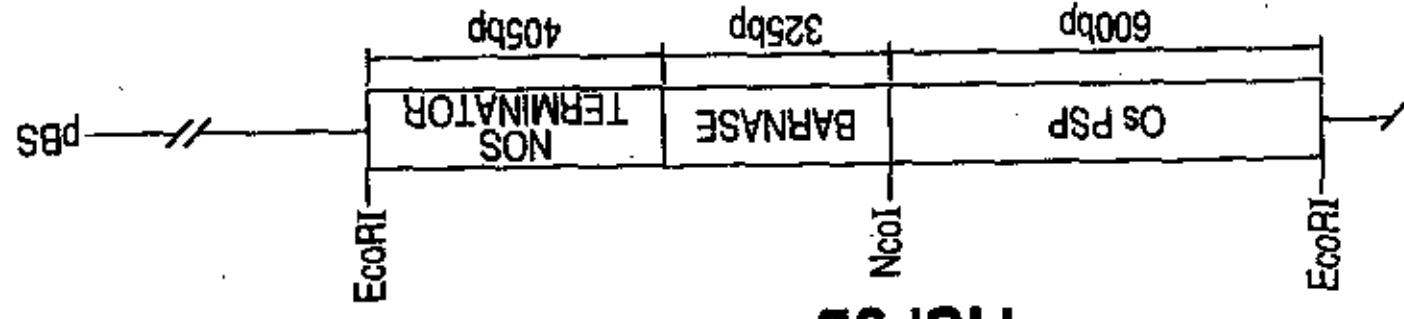


FIG. 3B

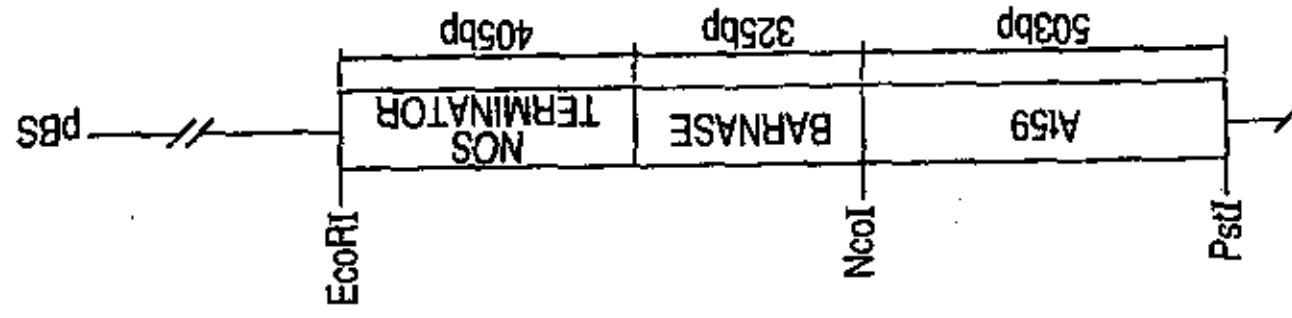


FIG. 3A
GST CONSTRUCTS

4/5

FIG. 4A

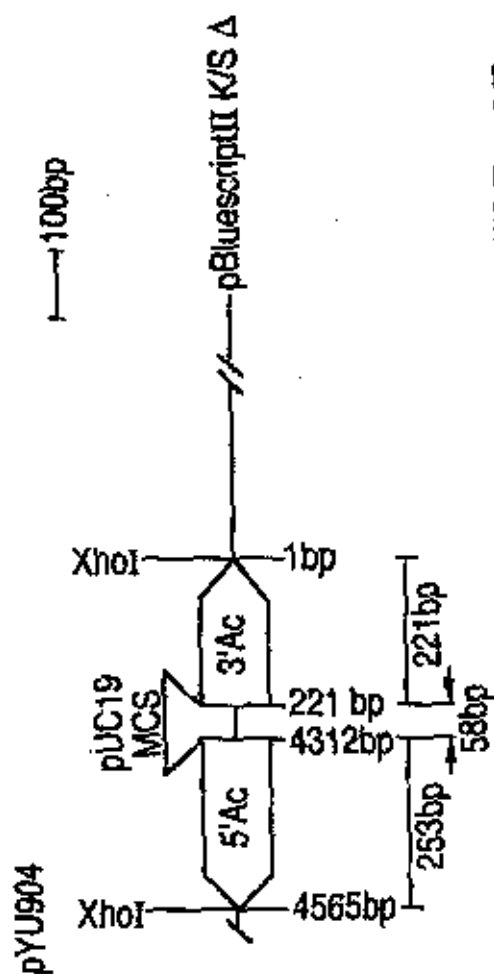
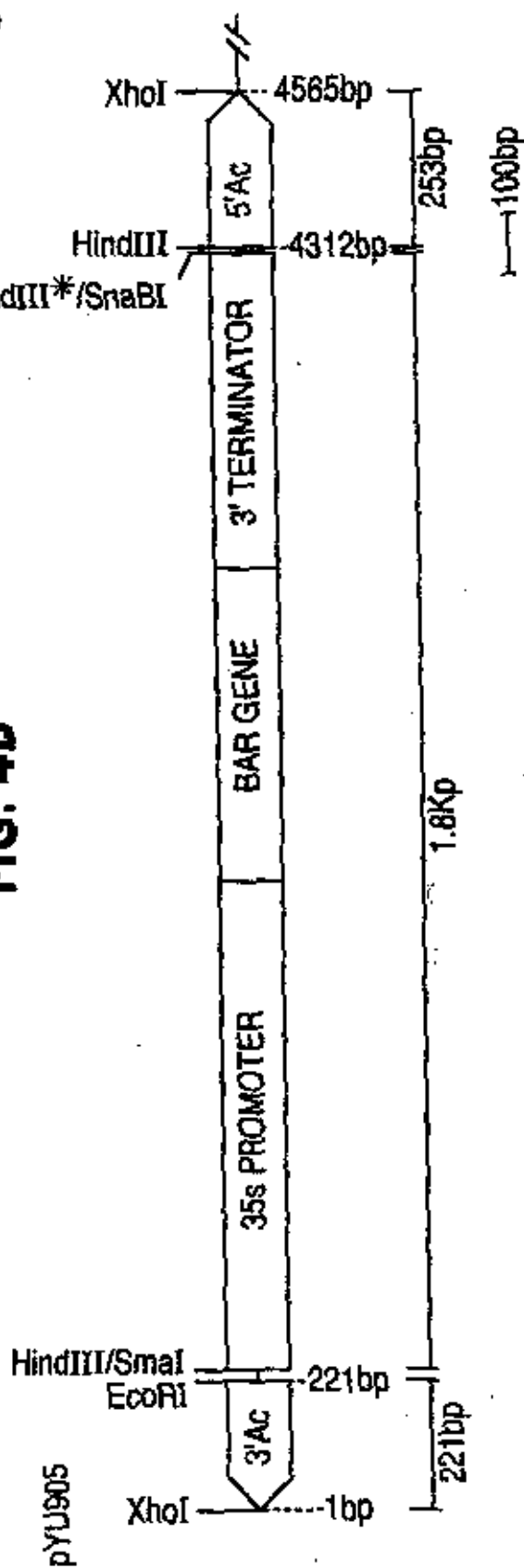
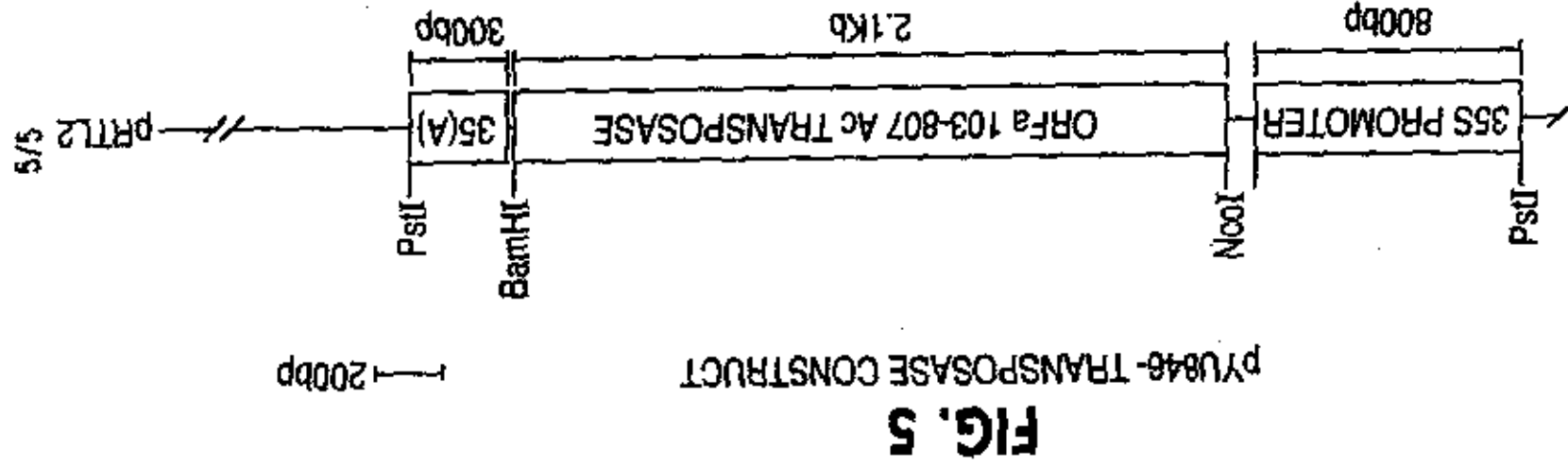


FIG. 4B





SEQUENCE LISTING

<110> Dellaporta, Stephen L.
Moreno, Maria A.
Yale University

<120> Methods and Compositions to Reduce or Eliminate
Transmission of a Transgene

<130> 44574-5078-WO

<140>

<141>

<150> US 60/185,524

<151> 2000-02-28

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' PCR primer

<400> 1

aagctttggc catattgcag tcatcc

26

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' PCR primer

<400> 2

aagcttgctc gagcaggat gaaagtagga tggga

35

<210> 3

<211> 4565

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<223> Transposable element Ac

<400> 3

tagggatgaa aacggtcggt aacggtcggt aaaatacctc taacgttttc attttcatat 60
ttaacttgcg ggaacggaac gaaaacggga tataccggtt acgaaaacga acgggataaa 120

tacggtaatc gaaaaccgat acgatccggc cgggttaaag tcgaaatcgg acgggaaccg 180
 gtatttttgt tcggtaaaat cacacatgaa aacatatatt caaaacttaa aaacaaatat 240
 aaaaaattgt aaacacaagt ctttaattaaa catagataaa atccatataa atctggagca 300
 cacatagttt aatgtagcac ataagtata agtcttgggc tcttggctaa cataagaagc 360
 catataagtc tactagcaca catgacacaa tataaagttt aaacacata ttcataatca 420
 cttgtccaca totggatcac ttagcatgca taaactatta caaccaaggo tcatctgtca 480
 acaaacataa gacacattgc tcatggagag gagccacttg ctacatcttc attattctta 540
 gaaaattcta ttggtcttc atoctgttaa tacacaaaaa taagtcagtt ttggataaat 600
 aaatacatat agaagaacat gaattgatat gcaggagga taaataaata catataggag 660
 aacatgaatc tgtgaactaa cagcgtctgg agctaggcag cttagcagca ggccttaaca 720
 gctgggagcc taacagctag cagctagcag ccaatcaaaa caaggcgaca aggcgcagtc 780
 agtgagatca aaaaatctgt aatgccagcc atgcaggag tataacacgg ctgggcagca 840
 aggcgcagtc ctcaaaaaca ggcgacagca aacagcccat gcacaaaac agtagtgaat 900
 aatagcaaat taatagccca tgcacgaagt aaataataat ctttaaatat ctcattcata 960
 tgattctcat gatttgttgc agcagcaata acagagtcta gcaectcgag atcaccaato 1020
 attgttggaa aatatgtagc accttgatg acacaaatat gcacaaatat aagtaaaata 1080
 attgttgaat aactataaat tggaaactta ttataacata tatgcattca cttttctag 1140
 atgtgtctac ccaatctttt gtgcataatca aagcttcaac aatctccgaa ccaagacgat 1200
 tgggttaagg atcaacaaca cgaccacag cactgaacgc agactcagaa gcaacagttg 1260
 acacttgtat tgctagcaca tcccttgcaa ttgggtgag aataggatat tctgcaacc 1320
 ttcctctcca ccatgataaa atatcaaaat gaccactatg ctcaaaaagg ggttcagaca 1380
 tatatttato caattcattt gactctactt gatcataatc ctcaaatca tgcacaaagt 1440
 tttgaaatc atcatcttca ttttccatca aggtatcaco catactatca ttagtagttg 1500
 tctttgtctt tggagctgaa ggactacaac tagaatagaa ttgatacaat tttctaata 1560
 ccttaacaaa gtcactatca tgaactttgt atgaatcac atgaaatttt ttcatataga 1620
 actcaatcaa tattttcttg taactagggt caaggaagca tgcacagct agtgcaatat 1680
 tagacacttt ccaatatttc tcaactttt cactcattgc aagggccatt ctctaata 1740
 caaatttttc atgaacacac cattggtcaa tcaaatctt tatctcacag aaactttgt 1800
 aaaataaatt tgcagtggaa tattgagtac cagataggag ttcagtgaga tcaaaaaact 1860
 tcttcaaaa cttaaaaaga gttaatgcca tcttccact ctgggcttta ggacaaattg 1920
 catcgtacct acaataattg acatttgatt aattgagaat ttataatgat gacatgtaca 1980
 acaattgaga caaacatacc tgcgaggatc acttgtttta agccttatta gtgcaggctt 2040
 ataataaag gcacccctca acatcaata ggttgaattc catctagtgt agacatcata 2100
 tgagatccct ttagatttat ccaagtcaca ttcactagca cacttcatta gttcttcca 2160
 ctgcaaggga gaagatttta cagcaagaa aatcgctttg atttcttcaa ttgttctgc 2220
 aattacagcc aagccatctt ttgcaacca gttcagtatg tgacaagcac acctcacatg 2280
 aaagaaagca ccatcacaaa ctgatttga atcagtgtcc tgcapaatct caattatata 2340
 gtgcacagct acttcatttg cactagcatt atccaaagac aaggcaaca attttttctc 2400
 aatgttccac ttaaccatga ttgcagtga ggtttgtgat aacctttggc cagtgtgycg 2460
 ccttcaaca tgaaaaaagc caacaattct tttttggaga caccaatcat catcaatcca 2520
 atggatgggt acacacatgt atgacttatt ttgacaagat gtccacatat ccatagttgt 2580
 actgaagcga gactgaacat ctttttagtt tccatacaac tttcttttt cttccaaata 2640
 caaatccatg atatattttc tagcagtga acgggaactt attggaaagt gagggcgag 2700
 agacttaaca aactcaacaa agtactcatg ttctacaata ttgaaaggat attcatgcat 2760
 gattattgac aaatgaagct tcttttaggt aaccacttca tctacttat aaggctcaat 2820
 gagatttatg tctttgccat gatccttttc actttttaga cacaactgac ctttaactaa 2880
 actatgtgat gttctcaagt gatttggaaa tccgcttgtt ccatgatgac cctcagcct 2940
 atacttagcc ctgcaattag gaaagtgc atgtcccat acctgaacgt atttctttcc 3000
 atcgacctcc acttcaattt ccttcttggg gaaatgctgc catacatccg atgtgcactt 3060
 ctttgcctcc tctgtgggtg cttcttcttc ggggttcagg tgtggctgtg gttgtggttc 3120
 tgggttgggt tgtgggtgtg gttgtggttc atgaacaata gccatatcat cttgactcgg 3180
 atctgtagct gtaccatttg cattactact gcttacacto tgaataaaat gctctcggc 3240
 ctgagctgtt gatgatgatg gtgatgtgcg gccacatcca tgcacacgag caogtgcag 3300
 tacattctga atccgactag aagaggtctt agcttttctt tccaaacctg ttataaacag 3360
 atttttcgta ttattctaca gtcaatatga tcttcccaa tctacaacca attagtaatg 3420
 ctaatgctat tgctactgtt tttctaatat atacctgag catatgcaga gaatacggaa 3480

ttgtgtttgc gagtagaagg cgtctttgtg gtagacatca aottggccaa tcttatggct 3540
 gagcctgagg gaggattatt tccaaacgga ggcgctatct gaggaatgga gtctgtagccg 3600
 gctagccgaa gtggagagca gagccttga cagcaggtgt tcagcaatca gcttgggtgt 3660
 gtactgctgt gacttgtgag cacttggacg gctggacagc aatcagcagg tgttgacag 3720
 cccctggaca gcacacaaat gacacaacag ctctgggtgaa tgggtgctgac gtgctgtact 3780
 gctaagtgt gtgagcctgt gagcagcctt ggagacaggg agacccgga tggccggatg 3840
 ggcgagcgcc gagcagtga ggtctggagg accgctgacc gcagatggcg gatggcggat 3900
 gggcggaacc cggatggcg agcagtggag tggaggtctg ggcgatggg cggaccgcg 3960
 cggcgatggg cggatcgga gcagtggagt ggagggcgga ccgtggatgg cggcgtctgc 4020
 gtccggcggtg ccgctgcacg gccgtcacgg cgtgtggtgc ctggtgcagc ccagcgccg 4080
 gccggctggg agacagggag agtcggagag agcagggcag agcagagcgc gtcccgccg 4140
 tggcgctgcg gctggcgcg tccggactcc ggcggtggcg cgtggcgcg tgtgaatgtg 4200
 tgatgctgtt actcgtgtgg tgcctggcg cctgggagag aggcagagca gcgttgcga 4260
 ggtattttctt acatgggctg ggctcagtg gttatggatg ggagttggag ctggccatat 4320
 tgcagtcate ccgaattaga aaatacggta acgaaacggg atcatccga ttaaaaaagg 4380
 gateccggty aaacggtcgg gaaactagct ctaccgtttc cgtttccgtt taccgttttg 4440
 tatateccgt ttcggttcgg ttttctgttt ttacctggg ttcgaaatcg atcgggataa 4500
 aactaacaaa atcggttata cgataacggg cggtagcgga ttttcccatc ctactttcat 4560
 cctg 4565

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' PCR primer

<400> 4

gaattccctc gagtagggat gaaaacggtc ggtaac

36

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' PCR primer

<400> 5

gaattcgaat atatgttttc atgtgtgat

29

<210> 6

<211> 615

<212> DNA

<213> Streptomyces hygroscopicus

<220>

<223> bar gene for phosphinothricin acetyl transferase

<400> 6

 gaattcgagc tgggtacccg gggatctacc atgagccag aacgacgcc ggccgacatc 60
 cgcgtgcca ccgagggcga catgcggcg gtctgcacca tegtcaacca ctacatogag 120

acaagcaagg tcaacttcgg taccgagcgg caggaacggg agggagtggac ggaacgacctc 180
 gtccgtctgc gggagcgcta tccctggctc gtggccgagg tggacggcga ggtcgccggc 240
 atcgccctacg cgggcccctg gaaggcagcg aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc 300
 gtgtacgtct ccccccgcga ccagcggacg ggactgggct ccacgtctta caccacctg 360
 ctgaagtccc tggaggcaca gggcttcaag agcgtggctg ctgtcatcgg gctgcccac 420
 gacccgagcg tgcgcagcga cgaggcgctc ggatatgccc cccgcgccat gctgcccggc 480
 gccggcttca agcaccggaa ctggcatgac gtgggtttct ggcagctgga ctccagcctg 540
 ccggtaccgc cccgtccggc cctgcccgtc accgagatct gatgacccgg gggatccctg 600
 caggcatgca agctt 615

<210> 7

<211> 831

<212> DNA

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<220>

<221> polyA_signal

<222> (514)..(813)

<400> 7

cgagcatttt atggatttct ttcagatgag actagttcaa gcttgaaaat taagcccccc 60
 cccgaaatc atcgccagag gtctgtccag cccggcatct atatatagcg ccaatatagt 120
 ttgtcttaca caaacacacc tcacatcatg aatttcgag atactccctt ggctccctc 180
 gacctagagt gggcatgcga agagtttatc aaaacttatg gtgcattctc acaattggaa 240
 acagtagagg taatccaaac aaacaatggg ctgctgtatt tgtatggcaa aggttcactc 300
 tcacagcggg ttcattgacac acacctcaaa ttttaaggaga aggaagaatt atccttcaact 360
 accataaagc cagctgagat gaaggcgcaa caaagtgatt taacttatta tgtcgccatt 420
 tttcaagcga actatttctt gtgggtttca aatccagaga aaggctttct gagatgccat 480
 aatcgcccat ttctgtaccg catagtagcc catggatcga tgagctaagc tagctatata 540
 atcaatttat gtattacaca taatatcgca ctacgtcttt catctacggc aatgtaccag 600
 ctgatataat cagttattga aatattcttg aatttaaaat tgcattcaata aatttatgtt 660
 tttgcttggg ctataatacc tgaattgcta ttttatcaat aaatatttaa actatatctc 720
 tttcaagata tcattcttta caagtatacg tgtttaaatt gaataccata aatttttatt 780
 tttcaaatat atgtaaaatt atgaaatggg agtgggtggc accgagctca a 831

<210> 8

<211> 1287

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Construct-
 TA29:barnase:A. tumefaciens poly-A site

<400> 8

atctagctaa gtataactgg ataatttgca ttaccagatt gaatatagtg ccaacaaga 60
 agggacaatt gacttgtcac ttatgaaag atgattcaaa catgattttt tatgtactaa 120
 tatataacat ctactcgaat taaagcgaca taggctcgaa gtatgcacat ttagcaatgt 180
 aaattaaatc agttttttaa tcaagctaaa agcagaactg cataagggtg gtggctggac 240
 tagaataaac atcttctcta gcacagcttc ataattgaat ttccataact gaaatcaggg 300
 tgagacaaaa ttttggtact ttttctcac actaagtcca tgtttgcaac aaattaatac 360
 atgaaacctt aatgttaccc tcagatttagc ctgtactctc ccatttctc cgaaatgctc 420
 caacaaaagt tsgttttgca agttgttgtg tatgtcttgt gctctatata tgccttctg 480
 gtgcaagtgt aacagtacaa catcatcact caaatcaaa tttttactta aagaatttag 540

80

```
ctaccatggt accggttate aacacgtttg acgggggttg ggattatett cagacatate 600
ataagctacc tgataattac attacaaaat cagaagcaca agccctcggc tgggtggcat 660
caanaaggaa ccttgcagac gtcgctccgg ggaanaagcat cggcggagac atcttctcaa 720
acagggaagg caaatctccg ggcaaaagcg gacgaacatg gctggaagcg gatattaact 780
atacatcagg cttcagaaat tcagacccga ttctttactc aagcgactgg ctgatttaca 840
aaacaacgga ccattatcag acctttacaa aaatcagata acgaaaaaaa cggcttcctg 900
cggaggccgt ttttttcagc ttacataaaa gtgtgtaata aatttttctt caaactctga 960
tcgggtcaatt tcaactttccg gnnnnctcta gaggatccga agcagatcgt tcaaacattt 1020
ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgcccgtct tgcatgatt atcatataat 1080
ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga 1140
gatgggtttt tatgattaga gtcccgaat tatacattta atacgcgata gaaaaaanaa 1200
tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgct atctatgta ctagatccgg 1260
aagatccccg ggtaccgagc tcgaatt 1287
```

<210> 9

<211> 1303

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<223> Pollen-specific gene

<400> 9

```
ccggggccatg gcattccttta gaatggagga atttaagtga aattgagcta aactatgtga 60
acatcctatg aagttactgc attcaaggcg ccaacatga aatctattca ggttcccaag 120
ttgtggggtt ccgtaacgto aaaattcgac agattttctg ctggctaana caccacaac 180
ggcaataata gcctcgctcg tcaaaacatt caccatttt tagcttggto atcatcaaaa 240
gtaggatcaa atcaacaato tgccttctct tcagccactc gatcccaacg gcattctcaa 300
cgattcctac ttgaaggaca gccatggaaa tctccaggt tcccaggtt acttatacca 360
cagctcgaaat ccgttcocaa ccaggccatt tcagtaacct cctctcacat ttccoccaa 420
taataataga ggaaggggaa aaacacattt gcagccacat catccatggc ctctctccgc 480
accattccgg tgatcttcgg catctctctc tatgtccttg ccagcactgc cactgccacc 540
gacgcaccag actacgtcgt ccaaggccgt gtctactgtg acacgtgccc cggcaggttc 600
gagaccaatg tcaccgagta tatcaagggt aaggaaattc ttttttgggt caggaggtctg 660
caatgaaaat gctgaaatga ataacctcgc atatatgagc agcagaactt aggaagacca 720
aagaactgca gaggttgtgc atcaatttgt aaacatgana cgttaacctg gttagaagtc 780
cagcattggc tcaactgac tcttgattgc aggtgccaag gtcaggctgg agtgcaagca 840
ctttggcacc gacaaggctg agcgtgcgat tgacgggtgtg actgatgaga ccgggacata 900
caagattgag ctcaaggaca gccatgagga ggacatctgc gaggttgtcc tgcctccacg 960
cccccttgca aactgctctg aaatcgaggc cgaaagggat cgtgcccgtg ttttgcctac 1020
caggaatgtc ggcattctgtg acaacctgag cttagccaac ccactegget acctcaagga 1080
ctaccactgc ccgtctgggg cgtgctccta gcagttcgac ctggctgatg atgataacga 1140
gtaatgcgat gatcgctatg gaacctccgg agaggctgca ttaattataa atcagttaga 1200
ggcttgcaaa atagcatgga tctatctgaa aggcagaact aagcatatgt caaaacatga 1260
aatgtacact catcactaag tactcaactg tgactacctg agg 1303
```

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' PCR primer

<400> 10
accatgtga gtttctttct tctccat

27

<210> 11
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' PCR primer

<400> 11
ttataggaaa attccagcag ctcagcat

28

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' PCR primer

<400> 12
gaattccggg ccattggcatt ctttag

26

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' PCR primer

<400> 13
ccatggatga tctggctgca aatg

24

<210> 14
<211> 6741
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Cloning
vector pFZP200 for plant transformation

<400> 14
agtactttga tccaaacctt ccgtgtctat agtgcagtcg gcttctgacg ttcagtgcag 60
ccgtcttctg aaaacgacat gtgcacaaag tcttaagtta cgcgacaggg tgcggccctg 120
cccttttctt gggtttttct tgcggcgtgt tttagtgcga taaagtagaa tacttgcgac 180
tagaacggga gacattacgt catgaacaaag agcgccgccc ctggcctgct gggctatgcc 240
cgcgtcagca cgcagaccca ggacttgacc aaccacgggg cgaactgca cgcggccggc 300
tgaccaaacg tgttttcgga gaagatcacc ggcaccaggg gcgaccgccc ggagctggcc 360

aggatgcttg accacctacg ccttgccgac gttgtgacag tgadccaggct agaccgcctg 420
 gccgcgagca ccgcgcacct actggacatt gcgcgagcga tccaggaggc ccggcgccggc 480
 ctgcgtagcc tggcagagcc gtgggcccgc accaccacgc ccggccggcg catggtgttg 540
 accgtgttcg ccggcattgc cgagttcgag cgttccctaa tcatcgaccg caccgcggagc 600
 gggcgcgagg ccgccaaggc ccgaggcggtg aagttttggc ccgcacctac cctcaccccg 660
 gcacagatcg cgcacgcccg cgagctgacg gaccaggag ggcgcacccg gaaagaggcg 720
 gctgcactgc ttggcggtga tgcctcgacc ctgtaccccg cacttgagcg cagcgaggaa 780
 gtgacgcaca ccgaggccag ggcggcggtt gcttcccggt aggacgcatt gaccgaggcc 840
 gacgccttgg ccggcgccga gaatgaacgc caaggaggac aagcatgaaa ccgcaccagg 900
 accgcccagg cgaaccgttt ttcattaccg aagagatoga ggcggagatg atcgccggcg 960
 ggtacgtgtt ccgagccccc gcgcacgtct caaccgtgcg gctgcattga atcctggccg 1020
 gccgcgtctt aaaaagggtg tgtgtatttg agtaaacag cttgcgtcat gcggtcgctg 1140
 cgtatattgt gcgatgagta aataaacaaa taccgaagg gaaagcatga aggttatcgc 1200
 tctacttaac cagaaaggcg ggtcaggcaa gacgaccatc gcaaccatc tagcccgccg 1260
 cctgcaactc gccggggccg atgttctgtt agtcgattcc gatccccagg gcagtgcccg 1320
 cgattggggc gccgtgcccg aagatcaacc gctaacccgt gtcggcatcg accgcccagc 1380
 gattgaccgc gacgtgaagg ccacgcggcg gcgcgacttc gtagtgatcg accgagccgc 1440
 ccaggccggc gacttggtcg tctcccgcat caaggcagcc gacttcgtgc tgattccggc 1500
 gcagccaagc ccttacgaca tatgggccac ccgcgacctg gtggagctgg ttaagcagcg 1560
 cattgaggtc accgatggaa ggctacaagg ggcctttgtc gtgtcgccgg cgtacaaagg 1620
 caccgcctac ggcggtgagg ttgcgcaggc gctggccggg tacgagctgc ccattcttga 1680
 gtcccgctac ccgcagcccg tgagctaccc aggcactgcc gcgcgcggca caaccgttct 1740
 tgaatcagaa ccgcaggggc acgttgcgcg cgaggtccag gcgctggccg ctgaaattaa 1800
 atcaaaactc atttgagtta atgaggtaaa gagaaatga gcaaaagcac aaacacgcta 1860
 agtgccggcc gtcgagcgcc accgagcagc aaggctgcaa cgttggccag cctggcagac 1920
 accccagcca tgaagcgggt caactttcag ttgcggcgcg aggatcacac caagctgaag 1980
 atgtacgcgg taogccaagg caagaccatt accgagctgc tatctgaata catcgccag 2040
 ctaccagagt aaatgagcaa atgaataaat gagtagatga attttagcgg cttaaaggagg 2100
 ccgcatggaa aatcaagaac aaccaggcac cgacgcctg gaatgcacca tgtgtggagg 2160
 aacggcggtt tggccaggcg taagcggtcg ggttgtctgc ccgccttgc atggcactgg 2220
 aacccccag ccgcaggaa cggcggtgac gtcgcaaac atccggcccg gtaaaatcg 2280
 ggcggcgctt ggggtgatgac ctggtggaga agttgaaggc cgcgcaggcc gccagccggc 2340
 aacgcctcga ggcagaagca cgcgccggtg atctgtggca agcggtcgct gatcgaatcc 2400
 gcaaaagaat ccggcaaccg ccggcagccg gtgcgcctgc gattaggaag ccgcccagg 2460
 ggcagcagca accagatttt ttgttccga tgcctatga cgtgggcacc ccgatatgtc 2520
 gcagcatcat ggacgtggcc gttttccgtc tgtcgaagcg tgacpgacga gctggccagg 2580
 tgatccgcta ccgagcttcca gacgggcaag tagaggttcc ccgaggcccg gccggcatgg 2640
 ccagtgtgtg ggattacgac ctggtactga tggcggttcc ccactcaacc gaatccatga 2700
 accgataccg ggaagggaag ggagacaagc ccggcccggt gttccgtcca cagtttgcg 2760
 acgtactcaa gttctgcggc cgagccgatg ggcgaaagca gaaagacgac ctggtagaaa 2820
 cctgcattcg gttaaacacc accgacgttg ccactgcagc taagaagaag gccagaagc 2880
 gccgcctggt gacggtatcc gaggggtgaag ccttgattag ccgctacaag atcgtaaga 2940
 gcgaaaccgg gcggccggag tacatcgaga tccagctagc tgattggatg tacgcgaga 3000
 tcaagaagg caagaaccgg gacgtgtga cggttcacc ccattacttt ttgactgac 3060
 ccgcatcgcc ccgttttctc taocgcctgg caccgcctgc ccagggcaag gcagaagcca 3120
 gatggttgtt caagacgac taogaaagca gtggcagcgc ccgagagttc aagaagttct 3180
 gtttcaccgt gcgcaagctg atcggttcaa atgacctgac gtagtacgat ttgaaggagg 3240
 aggcggggca ggttggcccg atctagtcca tgcgctacc caacctgac gagggcgaag 3300
 catccgcccg ttcctaatgt accgagcaga tgcagggca aattgcctca gcagggaaa 3360
 aaggtcgaaa aggttctctt cctgtggata gcacgtacat tgggaacca aagcgtaca 3420
 ttgggaaccg gaaccgctac attgggaacc caaagccgta cattgggaac cgttcacaca 3480
 tgtaagtga tgatataaaa gagaaaaaag gcgatttttc ccgctaaaaa tctttaaaac 3540
 ttattaaaac tcttaaaacc cgcctggcct gtgcataant gtcgtggcag ccgacagccg 3600
 aagagctgca aaaagcgcct acccttcggt cgtgcgctc cctacgccc gccgttgcg 3660
 gtcggcctat ccgggcgctt ggccgctcaa aaatggctgg cctacggcca ggcaatctac 3720

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Construct-
AT59:Barnase:Nov GST

<400> 15

```
ctgcagggga ttttttaast tacttgatg ataattattt tcaatagacc tagagacttg 60
atatatacta cgtttaataa tcatatgtag tatgtatgat taattaagta aatacaaaaa 120
tagttacetc aagttttaaa ggtgctattg ggtaattatc tcaagtaaaa taatattaga 180
tcaaggcaaa aataactgaa aatatccaga aaagaaggat taacaaaagg catccaaat 240
ctataattgg gttttttgga gaaatgacca tagagattta aatcaatggg tgtctaactc 300
atgtaatttc tcaatctctt attgaactct ctcatctctt tttctctctt cccagttctt 360
ggttattaaa gcaatcaggt gattcaaatc ttaaatcttt taatcccggc aggcctatct 420
gaaacaacaa cctccgtttg aggtttttgc gggaaaatat aaagttcaca ggctttgggc 480
tctgcatttg caatatattt accatgggtc cggttatcaa cagctttgac ggggttgagg 540
attatcttca gacatatcat aagctaacctg ataattacat tacaatatca gaagcacaag 600
ccctcggtcg ggtggcatca aaagggaaac ttgcagacgt cgtccggggg aaaagcatcg 660
gaggagacat cttctcaaac aggggaaggca aactcccggg caaaagcggg cgaacatggc 720
gtgaagcgga tattaactat acatcaggct tcagaaattc agaccggatt ctttactcaa 780
gcgactggct gatttadcaa acacgggacc attatcagac ctttacaaaa atcagataac 840
gaaaaaaacg gcttcctgcy gaggcogctt tcttcagctt tacataaagt gtgtaataaa 900
ttttcttcca aactctgate ggtcaatttc actttccggn nnnctctaga ggatccgaag 960
cagatcgctc aaacattttg caataaagtt tcttaagatt gaactctgtt gccggtcttg 1020
cgatgattat catataattt ctggtgaatt acgttaagca tgtaataatt aacatgtaat 1080
gcattgaogtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacattraat 1140
acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcggcg ggggtgtcat 1200
ctatgttact agatcgggaa gatcccgggg taccgagctc gaattc 1246
```

<210> 16

<211> 1213

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Construct-
OsPSP:Barnase:Nov GST

<400> 16

```
gaattccggg ccattggcat ctttagaatt gaggaattta agtgaaattg agctaaacta 60
tgtgaacatc ctatgaagtt actgcattca agggcgccaa catgaaatct attcagggtc 120
ccaagttgtg ggcttccgta acgtcaaaat tcgacagatt cctggctggc taaaacaccc 180
acaacggcaa taatagcttc gctcgteaaa acattcacc ctttttagct tggtcattat 240
caaaagtagg atcaaatcaa ccatctgoot tctcttcagc cactcgatcc caacgggcatc 300
tccaacgatt cctacttgaa ggacagccat ggaaatcttc caggttcccc aggttactta 360
taccacagct cgaatccgtt ccaaacccag ccatttcagt accctctctt cacattttcc 420
ccaantaata atagagggaag gggaaaaaca catttcagc cacatcatcc atgggtacgg 480
ttatcaaac ctttgacggg gttgcggatt atcttcagac atatcataag ctacctgata 540
attacattac aaatcagaa gcacaagccc tcggctgggt ggcattcaaaa gggaacctty 600
cagacgtcgc tccggggaaa agcatcggcg gagacatctt ctcaaacagg gaaggcaaac 660
tcccgggcaa aagcggadga acatggcgctg aagcggatat taactatata tcagggttca 720
gaaattcaga cggattctt tactcaagcg actggctgat ttacaaaaa accgaccatt 780
accagacctt tacaataatc agataacgaa aaaaacgggt tccgcgagg gccgtttttt 840
tcagctttac ataaagtgtg taataaattt tcttcaaac tctgacgggt caatttcaat 900
ttccggnnnn ctctagagga tccgaagcag atcgttcaaa catttggcaa taaagtctct 960
```

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



INTERNATIONAL BUREAU OF PATENT COOPERATION
35, rue de la Harpe, 1201 Genève, Suisse
P.O. Box 6809, 12111 Genève, Suisse
P.O. Box 18, 8001 Zürich, Suisse

(43) International Publication Date
7 September 2001 (07.09.2001)

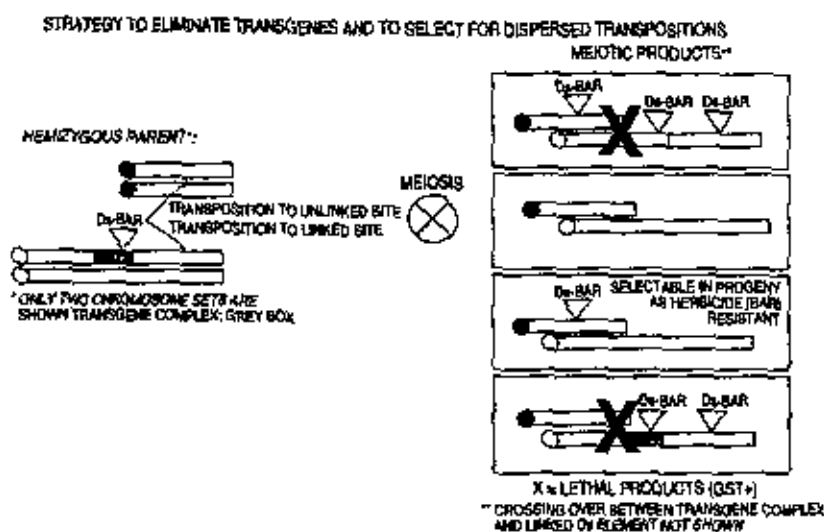
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/64926 A3

- (51) International Patent Classification⁷: C12N 15/82, S10, A01H 5/00
- (74) Agent: VEITENHEIMER, Erich, E.; Morgan, Lewis & Bockius LLP, 1800 M Street, NW, Washington, DC 20036 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/06249
- (22) International Filing Date: 28 February 2001 (28.02.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/185,324 28 February 2000 (28.02.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): YALE UNIVERSITY (US/US); 451 College Street, New Haven, CT 06511 (US).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): DELLAPORTA, Stephen, L. [US/US]; 451 College Street, New Haven, CT 06511 (US). MORENO, Maria, A. [US/US]; 451 College Street, New Haven, CT 06511 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GM, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW). Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM). European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR). OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
2 May 2002

(Continued on next page)

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS TO REDUCE OR ELIMINATE TRANSMISSION OF A TRANSGENE



(57) Abstract: Genetic constructs and methods are disclosed for the production, maintenance and control of transgenes in transgenic eukaryotic organisms that undergo meiosis in which pollen or sperm can be outcrossed; this includes: transgenic animals, plant cells, plant tissues and whole plants. More specifically, this invention relates to the control of transgene transmission by male and/or female gametes or gametophytes using a gametophytic sterility trait (GST). The genetic constructs and methodologies of the present invention provide the ability to control the undesired spread of transgenes. In addition, this invention also provides the tools and methodologies to enrich a plant or other eukaryotic genome for dispersed and/or stable transposition events.

87

International Application No.
PCT/US 01/06249

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the holds searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPQ-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 25695 A (LEEMANS JAN ; WILLIAMS MARK (BE); PLANT GENETIC SYSTEMS NV (BE)) 23 December 1993 (1993-12-23) the whole document	1-14, 17
X	WO 96 26283 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV ; MICHIELS FRANK (BE); BOTTERMAN JOHAN (BE)) 29 August 1996 (1996-08-29) the whole document	1, 2, 4-14, 17
X	WO 97 13401 A (LEE JANG YONG ; HODGES THOMAS K (US); HUQ ENAMUL (US); LYZNIK LESZE) 17 April 1997 (1997-04-17) the whole document	1, 2, 4-14, 17
X	WO 91 02068 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 21 February 1991 (1991-02-21) the whole document	1-12, 15-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

 Patient family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date is another citation or other special reason (as specified)
- "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "X" later document published after the international filing date of priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "A" documents member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 2002

Date of mailing of the international search report

14 02 2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5618 Patentweg 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/06249

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PLI/US 01/06249

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9325695	A	23-12-1993	CA	2137559 A1	23-12-1993
			WO	9325695 A1	23-12-1993
			EP	0644943 A1	29-03-1995
			US	5977433 A	02-11-1999
			US	5750867 A	12-05-1998
			AU	5457494 A	24-05-1994
			CA	2148483 A1	11-05-1994
			EP	0668786 A1	30-08-1995
			WO	9409836 A2	11-05-1994
			US	5550060 A	27-08-1996
WO 9626283	A	29-08-1996	AU	715758 B2	10-02-2000
			AU	4940596 A	11-09-1996
			CA	2213394 A1	29-08-1996
			WO	9626283 A1	29-08-1996
			EP	0811070 A1	10-12-1997
			JP	11500617 T	19-01-1999
			US	6025546 A	15-02-2000
WO 9713401	A	17-04-1997	AU	716781 B2	09-03-2000
			AU	7662896 A	30-04-1997
			CA	2234557 A1	17-04-1997
			EP	0876094 A1	11-11-1998
			JP	11514233 T	07-12-1999
			NZ	322673 A	29-09-1999
			WO	9713401 A1	17-04-1997
			US	5677175 A	14-10-1997
			US	5929307 A	27-07-1999
WO 9102068	A	21-02-1991	AT	197816 T	15-12-2000
			AU	6273390 A	11-03-1991
			CA	2038933 A1	08-02-1991
			DE	69033667 D1	04-01-2001
			DE	69033667 T2	29-03-2001
			DK	412006 T3	05-03-2001
			WO	9102068 A1	21-02-1991
			EP	0412006 A1	06-02-1991
			ES	2152208 T3	01-02-2001
			IE	902830 A1	27-02-1991
			IL	95267 A	15-06-1998
			JP	3504806 T	24-10-1991
			JP	3143120 B2	07-03-2001
			PT	94905 A ,B	22-05-1991
			US	5633441 A	27-05-1997
			US	5767374 A	16-06-1998
			ZA	9006179 A	29-05-1991
WO 9604393	A	15-02-1996	US	5723765 A	03-03-1998
			AU	696668 B2	17-09-1998
			AU	3205095 A	04-03-1996
			BR	9508471 A	28-10-1997
			CA	2196410 A1	15-02-1996
			EP	0775212 A2	28-05-1997
			JP	10503377 T	31-03-1998
			TR	960448 A2	21-07-1996
			US	5977441 A	02-11-1999
			WO	9604393 A2	15-02-1996
			US	5925808 A	20-07-1999

IN THE EUROPEAN PATENT OFFICE
UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY

In re Application of: YALE UNIVERSITY *ET AL.*
International Application No. PCT/US01/06249
International Application Filed: 28 February 2001
Priority Date: 28 February 2000
Title: METHODS AND COMPOSITIONS TO REDUCE OR ELIMINATE
TRANSMISSION OF A TRANSGENE

European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
The Netherlands

Attention: EPO International Searching Authority
Authorized Officer - Andria Overbeke-Siepkens

RESPONSE TO INVITATION TO PAY ADDITIONAL FEES
UNDER PCT ARTICLE 17(3)(a) and Rule 40.1

Dear Officer Overbeke-Siepkens:

In response to the Invitation to Pay Additional Fees dated 17 October 2001,
Applicants request that the International Search Report be established on the basis of all
of the claims (Group 1 and Group 2). Applicants hereby submit payment in the amount of
EUR 945.00 to establish the international examination for all the claims (Group 1 and
Group 2).

Applicants believe that the enclosed payment meets the requirements of the
invitation and that no further action is required.

Respectfully submitted,

Morgan, Lewis & Bockius LLP


Erich E. Veitenheimer, U.S. Reg. No. 40,420

Dated: 29 November 2001
Morgan, Lewis & Bockius LLP
1800 M Street, NW
Washington, D.C. 20036
Telephone: 202.467.7747
Facsimile: 202.467.7258

PATENT COOPERATION TREATY

01
FF
X

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:
MORGAN LEWIS & BOCKIUS LLP
Attn. Veitenheimer, Erich E.
1800 M Street, N.W.
Washington, D.C. 20036
UNITED STATES OF AMERICA

INVITATION TO PAY ADDITIONAL FEES

(PCT Article 17(3)(a) and Rule 40.1)

RECEIVED

OCT 2 2001

REGISTERED

Date of mailing (day/month/year) 17/10/2001	
Applicant's or agent's file reference 44574-5078WO	PAYMENT DUE within 45 days from the above date of mailing
International application No. PCT/US 01/06249	International filing date (day/month/year) 28/02/2001
Applicant YALE UNIVERSITY et al.	

1. This International Searching Authority

- (i) considers that there are 2 (number of) inventions claimed in the international application covered by the claims indicated 18006 on the extra sheet:

and it considers that the international application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated 18006 on the extra sheet:

Doc. No. 0131101 12/11/01
Case 44574-5078 WO
Due Date 12/11/01
Action Additional Fees
By KJF Chk. PSG

- (ii) ☒ has carried out a partial international search (see Annex) will establish the international search report on those parts of the international application which relate to the invention first mentioned in claims Nos.:

See additional Sheet, Invention 1.

- (iii) will establish the international search report on the other parts of the international application only if, and to the extent to which, additional fees are paid

2. The applicant is hereby invited, within the time limit indicated above, to pay the amount indicated below:

EUR 945.00 x 1 = EUR 945.00
Fee per additional invention number of additional inventions total amount of additional fees

Or, _____ x _____ = _____

The applicant is informed that, according to Rule 40.2(c), the payment of any additional fee may be made under protest, i.e., a reasoned statement to the effect that the international application complies with the requirement of unity of invention or that the amount of the required additional fee is excessive.

3. ☐ Claim(s) No. _____ have been found to be unsearchable under Article 17(2)(b) because of defects under Article 17(2)(a) and therefore have not been included with any invention.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2260 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andria Overbeeke-Siepkens

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-17

A nucleic acid construct comprising a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene, wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a gene of interest. A vector, a host cell, a recombinant plant cell, a transgenic plant, methods for reducing or eliminating male or female transmission of a transgene locus in a plant comprising said construct.

2. Claims: 18-56

A nucleic acid construct comprising a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene wherein said promoter and suicide gene combination is linked to a transposable element. A vector, a host cell, a recombinant plant cell, a transgenic plant and a method for enriching dispersed transposition events comprising said nucleic acid construct.

---- **** ----

Methods for reducing or eliminating male or female transmission of a transgene locus in a plant have been well documented in the prior art. See for example W093/25695, W096/26283, W097/13401 and W091/02068.

In view of the prior art documents, a first problem underlying the application can be defined as the provision of further methods for reducing or eliminating male or female transmission of a transgene locus in a plant.

The solution proposed in underlying application can be defined as the provision of nucleic acid constructs comprising a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene which are linked to a gene of interest.

In view of the prior art documents, a second problem underlying the application can be defined as the provision of methods for enriching dispersed transposition events in a plant cell population.

The solution proposed in underlying application can be defined as the provision of nucleic acid constructs comprising a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene which are linked to a transposable element.

---- **** ----

Due to the fact that methods for reducing or eliminating male or female transmission of a transgene locus in a plant have been described in the prior art, due to the essential difference between the problems and the different solutions, and due to the fact that no other technical

INVITATION TO PAY ADDITIONAL FEES

International application No.

PCT/US 01/06249

features can be distinguished which, in the light of the prior art could be regarded as special technical features, the ISA is of the opinion that there is no single inventive concept underlying the plurality of claimed inventions of the present application in the sense of rule 13.1 PCT. Consequently there is lack of unity and the different inventions, not belonging to a common inventive concept, are formulated as the different subjects on the communication pursuant to Art. 17(3)(a) PCT.

Patent Family Annex

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/06249

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9325695	A	23-12-1993	CA 2137559 A1
			23-12-1993
			WO 9325695 A1
			23-12-1993
			EP 0644943 A1
			29-03-1995
			US 5977433 A
			02-11-1999
			US 5750867 A
			12-05-1998
			AU 5457494 A
WO 9626283	A	29-08-1996	24-05-1994
			CA 2148483 A1
			11-05-1994
			EP 0668786 A1
			30-08-1995
			WO 9409836 A2
			11-05-1994
			US 5550060 A
			27-08-1996
WO 9713401	A	17-04-1997	AU 715758 B2
			10-02-2000
			AU 4940596 A
			11-09-1996
			CA 2213394 A1
			29-08-1996
			WO 9626283 A1
			29-08-1996
			EP 0811070 A1
			10-12-1997
			JP 11500617 T
WO 9102068	A	21-02-1991	19-01-1999
			US 6025546 A
			15-02-2000
WO 9102068	A	21-02-1991	AU 716781 B2
			09-03-2000
			AU 7662896 A
			30-04-1997
			CA 2234557 A1
			17-04-1997
			EP 0876094 A1
			11-11-1998
			JP 11514233 T
			07-12-1999
			NZ 322673 A
WO 9102068	A	21-02-1991	29-09-1999
			WO 9713401 A1
			17-04-1997
			US 5677175 A
			14-10-1997
			US 5929307 A
			27-07-1999
WO 9102068	A	21-02-1991	AT 197816 T
			15-12-2000
			AU 6273390 A
			11-03-1991
			CA 2038933 A1
			05-02-1991
			DE 69033667 D1
			04-01-2001
			DE 69033667 T2
			29-03-2001
			DK 412006 T3
WO 9102068	A	21-02-1991	05-03-2001
			WO 9102068 A1
			21-02-1991
			EP 0412006 A1
			06-02-1991
			ES 2152208 T3
			01-02-2001
			IE 902830 A1
			27-02-1991
			IL 95267 A
			15-06-1998
WO 9102068	A	21-02-1991	JP 3143120 B2
			07-03-2001
			PT 94905 A
			22-05-1991
			US 5633441 A
			27-05-1997
			US 5767374 A
			16-06-1998
			ZA 9006179 A
			29-05-1991

PATENT COOPERATION TREATY

PZ 40
1/1

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:
MORGAN LEWIS & BOCKIUS LLP
Attn: Veitenheimer, Erich E.
1800 M Street, N.W.
Washington, D.C. 20036
UNITED STATES OF AMERICA

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
OR THE DECLARATION

RECEIVED

(PCT Rule 44.1)

FEB 20 2002

MORGAN LEWIS & BOCKIUS LLP

Applicant's or agent's file reference
44574-5078W0

Date of mailing
(day/month/year) 14. 02. 2002

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US 01/06249

International filing date
(day/month/year) 28/02/2001

Applicant

YALE UNIVERSITY et al.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Docketed 228100 Attorney RGA-EDV-EDL
Case 44574-5078 W0
Due Date 4-14-02
Action ARTICLE 19 Amendment
By [Signature] Ck [Signature]

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International Search Report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Further action(s):** The applicant is reminded of the following:

Shortly after 18 months from the priority date, the International application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the International application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for International publication.

Within 19 months from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).

Within 20 months from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

Name and mailing address of the International Searching Authority

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Henriëtte Huysing-Solles

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 44574-5078W0	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 01/06249	International filing date (day/month/year) 28/02/2001	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 28/02/2000
Applicant YALE UNIVERSITY et al.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 5 sheets.
☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☒ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of making of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☒ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

2

☐ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/06249

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-17

A nucleic acid construct comprising a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene, wherein said promoter and said suicide gene combination is linked to a gene of interest. A vector, a host cell, a recombinant plant cell, a transgenic plant, methods for reducing or eliminating male or female transmission of a transgene locus in a plant comprising said construct.

2. Claims: 18-56

A nucleic acid construct comprising a male gamete- or female gamete-specific promoter operably linked to a suicide gene wherein said promoter and suicide gene combination is linked to a transposable element. A vector, a host cell, a recombinant plant cell, a transgenic plant and a method for enriching dispersed transposition events comprising said nucleic acid construct.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/06249

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 25695 A (LEEMANS JAN ; WILLIAMS MARK (BE); PLANT GENETIC SYSTEMS NV (BE)) 23 December 1993 (1993-12-23) the whole document	1-14, 17
X	WO 96 26283 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV ; MICHIELS FRANK (BE); BOTTERMAN JOHAN (BE)) 29 August 1996 (1996-08-29) the whole document	1, 2, 4-14, 17
X	WO 97 13401 A (LEE JANG YONG ; HODGES THOMAS K (US); HUQ ENAMUL (US); LYZNIK LESZE) 17 April 1997 (1997-04-17) the whole document	1, 2, 4-14, 17
X	WO 91 02068 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 21 February 1991 (1991-02-21) the whole document	1-12, 15-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conformity with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 2002

Date of making of the international search report

14. 02. 2002

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/06249

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 04393 A (US AGRICULTURE ; DELTA & PINE LAND CO (US)) 15 February 1996 (1996-02-15) the whole document	1, 4, 6, 8, 10, 11, 18-21, 25, 27, 29, 31, 33-38, 44, 46, 49, 51, 53-56
A	--- SUNDARESAN V ET AL: "PATTERNS OF GENE ACTION IN PLANT DEVELOPMENT REVEALED BY ENHANCER TRAP AND GENE TRAP TRANSPOSABLE ELEMENTS" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR, NY, US, vol. 9, no. 14, 15 July 1995 (1995-07-15), pages 1797-1810, XP000674520 ISSN: 0890-9369 cited in the application the whole document	
A	--- TISSIER ALAIN F ET AL: "Multiple independent defective Suppressor-mutator transposon insertions in Arabidopsis: A tool for functional genomics." PLANT CELL, vol. 11, no. 10, October 1999 (1999-10), pages 1841-1852, XP002188474 ISSN: 1040-4651 cited in the application the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(Information on patent family members)

International Application No.

PCT/US 01/06249

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9325695	A	23-12-1993	CA 2137559 A1	23-12-1993
			WO 9325695 A1	23-12-1993
			EP 0644943 A1	29-03-1995
			US 5977433 A	02-11-1999
			US 5750867 A	12-05-1998
			AU 5457494 A	24-05-1994
			CA 2148483 A1	11-05-1994
			EP 0668786 A1	30-08-1995
			WO 9409836 A2	11-05-1994
			US 5550060 A	27-08-1996
WO 9626283	A	29-08-1996	AU 715758 B2	10-02-2000
			AU 4940596 A	11-09-1996
			CA 2213394 A1	29-08-1996
			WO 9626283 A1	29-08-1996
			EP 0811070 A1	10-12-1997
			JP 11500617 T	19-01-1999
			US 6025546 A	15-02-2000
WO 9713401	A	17-04-1997	AU 716781 B2	09-03-2000
			AU 7662896 A	30-04-1997
			CA 2234557 A1	17-04-1997
			EP 0876094 A1	11-11-1998
			JP 11514233 T	07-12-1999
			NZ 322673 A	29-09-1999
			WO 9713401 A1	17-04-1997
			US 5677175 A	14-10-1997
			US 5929307 A	27-07-1999
WO 9102068	A	21-02-1991	AT 197816 T	15-12-2000
			AU 6273390 A	11-03-1991
			CA 2038933 A1	05-02-1991
			DE 69033667 D1	04-01-2001
			DE 69033667 T2	29-03-2001
			DK 412006 T3	05-03-2001
			WO 9102068 A1	21-02-1991
			EP 0412006 A1	06-02-1991
			ES 2152208 T3	01-02-2001
			IE 902830 A1	27-02-1991
			IL 95267 A	15-06-1998
			JP 3504806 T	24-10-1991
			JP 3143120 B2	07-03-2001
			PT 94905 A ,8	22-05-1991
			US 5633441 A	27-05-1997
			US 5767374 A	16-06-1998
			ZA 9006179 A	29-05-1991
WO 9604393	A	15-02-1996	US 5723765 A	03-03-1998
			AU 696668 B2	17-09-1998
			AU 3205095 A	04-03-1996
			BR 9508471 A	28-10-1997
			CA 2196410 A1	15-02-1996
			EP 0775212 A2	28-05-1997
			JP 10503377 T	31-03-1998
			TR 960448 A2	21-07-1996
			US 5977441 A	02-11-1999
			WO 9604393 A2	15-02-1996
			US 5925808 A	20-07-1999

RECEIVED

PATENT COOPERATION TREATY

WO 01/64926
PCT/US01/06249

SEP 27 2001

MORGAN, LEWIS & BOCKIUS LLP PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

VEITENHEIMER, Erich, E.
Morgan, Lewis & Bockius LLP
1800 M Street, NW
Washington, DC 20036

ETATS-UNIS D'AMERIQUE Attorney

Case 44574-5079 WO

Due Date 9-29-01

Action Demand Due

By Cnk

Date of mailing (day/month/year)

06 September 2001 (06.09.01)

Applicant's or agent's file reference

44574-5079 WO

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US01/06249

International filing date (day/month/year)

28 February 2001 (28.02.01)

Priority date (day/month/year)

28 February 2000 (28.02.00)

Applicant

YALE UNIVERSITY et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

KP, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EA, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN.

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 07 September 2001 (07.09.01) under No. WO 01/64926

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/308 (July 1996)

4248996

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 44574-5078WO

Box No. I TITLE OF INVENTION	
METHODS AND COMPOSITIONS TO REDUCE OR ELIMINATE TRANSMISSION OF A TRANSGENE	
Box No. II APPLICANT	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	
YALE UNIVERSITY 451 College Street New Haven, Connecticut 06511 United States of America	☐ This person is also inventor. Telephone No. 203-438-4675 Facsimile No. 203-438-8088 Teleprinter No.
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	
DELLAPORTA, Stephen, L. 451 College Street New Haven, Connecticut 06511 United States of America	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)	
VEITENHEIMER, Erich, E. MORGAN, LEWIS & BOCKIUS LLP 1800 M Street, NW Washington, DC 20036 United States of America	Telephone No. 202-467-7000 Facsimile No. 202-467-7658 Teleprinter No.
☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MORENO, Maria, A.
451 College Street
New Haven, Connecticut 06511
United States of America

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
US

State (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

108
127

Box No. V DESIGNATION OF STATES	
The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):	
Regional Patent	
☒ AP	ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
☒ EA	Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
☒ EP	European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
☒ OA	OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)
National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):	
☒ AE	United Arab Emirates
☒ AG	Antigua and Barbuda
☒ AL	Albania
☒ AM	Armenia
☒ AT	Austria
☒ AU	Australia
☒ AZ	Azerbaijan
☒ BA	Bosnia and Herzegovina
☒ BB	Barbados
☒ BG	Bulgaria
☒ BR	Brazil
☒ BY	Belarus
☒ BZ	Belize
☒ CA	Canada
☒ CH and LI	Switzerland and Liechtenstein
☒ CN	China
☒ CR	Costa Rica
☒ CU	Cuba
☒ CZ	Czech Republic
☒ DE	Germany
☒ DK	Denmark
☒ DM	Dominica
☒ DZ	Algeria
☒ EE	Estonia
☒ ES	Spain
☒ FI	Finland
☒ GB	United Kingdom
☒ GD	Grenada
☒ GE	Georgia
☒ GH	Ghana
☒ GM	Gambia
☒ HR	Croatia
☒ HU	Hungary
☒ ID	Indonesia
☒ IL	Israel
☒ IN	India
☒ IS	Iceland
☒ JP	Japan
☒ KE	Kenya
☒ KG	Kyrgyzstan
☒ KP	Democratic People's Republic of Korea
☒ KR	Republic of Korea
☒ KZ	Kazakhstan
☒ LC	Saint Lucia
☒ LK	Sri Lanka
☒ LR	Liberia
☒ LS	Lesotho
☒ LT	Lithuania
☒ LU	Luxembourg
☒ LV	Latvia
☒ MA	Morocco
☒ MD	Republic of Moldova
☒ MG	Madagascar
☒ MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia
☒ MN	Mongolia
☒ MW	Malawi
☒ MX	Mexico
☒ MZ	Mozambique
☒ NO	Norway
☒ NZ	New Zealand
☒ PL	Poland
☒ PT	Portugal
☒ RO	Romania
☒ RU	Russian Federation
☒ SD	Sudan
☒ SE	Sweden
☒ SG	Singapore
☒ SI	Slovenia
☒ SK	Slovakia
☒ SL	Sierra Leone
☒ TJ	Tajikistan
☒ TM	Turkmenistan
☒ TR	Turkey
☒ TT	Trinidad and Tobago
☒ TZ	United Republic of Tanzania
☒ UA	Ukraine
☒ UG	Uganda
☒ US	United States of America
☒ UZ	Uzbekistan
☒ VN	Viet Nam
☒ YU	Yugoslavia
☒ ZA	South Africa
☒ ZW	Zimbabwe
Check-box reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:	
☐	
Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)	

109
127

Box No. VI PRIORITY CLAIM		☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: * regional Office	international application: receiving Office
item (1) 28 February 2000 (28.02.00)	60/185,524	US		
item (2)				
item (3)				

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA/ EP

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request : 4
description (excluding
sequence listing part) : 58
claims : 7
abstract : 1
drawings : 5
sequence listing part
of description : 10
Total number of sheets : 85

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. ☒ fee calculation sheet
2. ☐ separate signed power of attorney
3. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
4. ☐ statement explaining lack of signature
5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
6. ☐ translation of international application into (language):
7. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8. ☒ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
9. ☒ other (specify): Transmittal Letter

Figure of the drawings which
should accompany the abstract:

1A

Language of filing of the
international application:

ENGLISH

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Erich E. Veitenheimer

Erich E. VEITENHEIMER
Agent/Attorney for Applicant

For receiving Office use only		2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
1. Date of actual receipt of the purported international application:		
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau:

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

USUARIO RADICADOR

PATENTE DE INVENCION ☒	MODELO DE UTILIDAD ☐	☐	☐
• Indicación de que se solicita la concesión de una patente		☐	☐
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		☐	☐
• Descripción de la invención		☐	☐
• Dibujos de ser estos pertinentes		☐	☐
• Comprobante de Pago de las tasas establecidas		☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA	☐	☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐			
• Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.		☐	☐
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.		☐	☐
• Representación gráfica y foto gráfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño.		☐	☐
• Comprobante de pago de las tasas establecidas.		☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA	☐	☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐			
• Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado.		☐	☐
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.		☐	☐
• Representación gráfica del esquema de trazado		☐	☐
• Comprobante de pago de las tasas establecidas.		☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA	☐	☐

Firma Responsable

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha:

Radicación: 82875735 86888888

Folios: 110

Fecha (AMT): 2002-06-27 16:53:51

Tramite: 011 PC3-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27-00 Piso 2 mezzanina

Commutador: 382 08 40

Fax: 350 52 20 e-mail: info@sic.gov.co

Bogotá D.C., Colombia

Brigard & Castro
Abogados

Apartado 3692

Cra. 7 16-56
Bogotá Colombia S.A.

Tel. Corri. 3802200
Tel./Fax: (57 1) 2827976
(57 1) 3802700

E. Mail: bncas@brigardycastro.com.co

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 02075735 00000001 Folios: 112
Fecha (AMD): 2002-09-09 16:36:21
Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 329 COMPLEMEN
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

AS: 88.855

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

REF: Expediente No.02 075.735

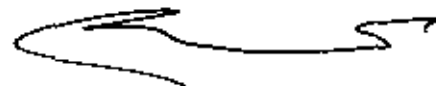
Solicitud de Patente FASE NACIONAL
a favor de YALE UNIVERSITY

Titulada: **MÉTODO Y COMPOSICIÓN PARA REDUCIR O
ELIMINAR LA TRANSMISIÓN DE UN TRANSGENE**

RAMIRO CASTRO DUQUE, vecino de Bogotá, portador de la tarjeta profesional No. 1003, obrando como apoderado de la sociedad YALE UNIVERSITY, me permito anexar al presente escrito los siguientes documentos:

1. Traducción de la solicitud internacional al castellano (resumen, descripción y reivindicaciones).

De la señora jefe atentamente,



RAMIRO CASTRO DUQUE
C.C. No. 170.322 de Bogotá
Código 340
Cra 7 No. 16-56 Piso 9

Bogotá, Septiembre 09, 2002
CPB/hsr.

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA REDUCIR O ELIMINAR LA TRANSMISIÓN DE UN TRANSGENE

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional 60/185,524, presentada en Febrero 28, 2000, la cual se incorpora aquí a modo de referencia en su totalidad.

DECLARACIÓN DE DERECHOS A INVENCIONES REALIZADAS BAJO INVESTIGACIÓN BAJO AUSPICIO FEDERAL

Esta invención se realiza parcialmente con el soporte del gobierno bajo Concesión Nos. NIH GM R01 GM38148 y NSF 61-2558.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se relaciona generalmente con la producción, mantenimiento y control de transgenes en organismos eucarióticos transgénicos que sufren meiosis donde polen o espermia puede cruzarse; esto incluye animales transgénicos, células de plantas, tejidos de plantas y plantas completas. Más específicamente, esta invención se relaciona con el control de la transmisión de transgenes mediante gametos o gametocitos machos y/o hembras. Los constructores y metodologías genéticas de la presente invención proporcionan la habilidad de controlar el indeseado esparcimiento de transgenes. Adicionalmente, esta invención también proporciona las herramientas y metodologías para enriquecer un genoma de planta, o cualquier otro genoma eucariótico, para eventos de transposición dispersa y/o estable.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan a modo de referencia en la misma extensión como si cada publicación individual o solicitud de patente fuera indicada específica e individualmente como incorporada a modo de referencia.

Las cosechas transgénicas y la aplicación de biotecnología están alterando dramáticamente los negocios de semillas y agroquímicos a través del mundo. Las semillas de cosechas comercialmente importantes se han producido genéticamente por ingeniería para ser resistentes a herbicidas y pestes, especialmente pestes de insectos. De acuerdo con encuestas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Junio, 2000), el maíz, la soya y el algodón genéticamente modificados crecieron en aproximadamente 25%, 54% y 61%, respectivamente, del total de acres U.S para cada cosecha en el 2000.

La transmisión no controlada de rasgos heterólogos en plantas de cosecha comercialmente importantes es corrientemente un factor importante a través del mundo y especialmente dentro de la comunidad agrícola. La indeseada diseminación de polen transgénico puede no intencionalmente afectar a los insectos benéficos y puede dar como resultado el esparcimiento de transgenes a especies de plantas relacionadas que lleva a la contaminación de productos alimenticios y la producción de especies de malezas resistentes a herbicidas y pesticidas.

La industria de la biotecnología y está interesada en transferir rasgos tales como tolerancias a sequía, insectos, enfermedades, salinidad, helada y herbicidas en plantas cultivadas que puede conferir una ventaja de adaptación sobre las plantas silvestres. Varias especies de cosecha son conocidas por ser compatibles con especies silvestres y es posible que estos rasgos puedan ser transferidos inadvertidamente a relacionados

de malezas silvestres a través de la hibridización sexual llevando a posible perjuicio económico y ecológico. Debido a que la mayoría de los pastos de forraje y césped ha tenido relativamente poca domesticación y pueden aún ser considerados malezas en algunas instancias (por ejemplo, pasto de bermuda), hay una alta probabilidad de mayores problemas en la última liberación y uso de dichas plantas transformadas genéticamente. Debido a que los pastos de forraje, en general, no están altamente domesticados, poseen características de malezas, y se cruzan altamente, pueden encontrarse especiales dificultades en la última liberación de pastos de forraje transgénicos.

Puede ser altamente deseable tener un método para prevenir la indeseada transmisión de rasgos heterólogos en plantas de cosecha comercialmente importantes. Si esto se puede lograr, la pérdida genética de rasgos heterólogos puede tenerse bajo control y el esparcimiento de estos rasgos a recipientes no deseados puede cortarse. Consecuentemente, existe la necesidad de un sistema genético que seleccione contra gametocitos machos o hembras que contienen transgenes, previniendo, eliminando o reduciendo así la indeseada transmisión de rasgos heterólogos. En particular, existe una necesidad de un sistema genético que permita la transmisión de gametocitos no transgénicos (es decir, del tipo silvestre) mientras que previene la transmisión de los gametocitos transgénicos (es decir, heterólogos) de la misma planta.

Consecuentemente, un objetivo de esta invención es proporcionar constructores de ácido nucleico recombinante y métodos para controlar, reducir o eliminar la indeseada transmisión de rasgos heterólogos en plantas de cosecha comercialmente importantes.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a constructores genéticos y métodos para controlar el esparcimiento o diseminación de rasgos heterólogos en plantas. El control se logra proporcionando un promotor de sexo específico enlazado operativamente a un gen suicida que selecciona contra gametos machos o hembras que contienen el gen suicida. El foco de gen suicida se denomina el "rasgo suicida gametofítico" (GST) (Figura 1A). Enlazando un transgene de interés a un gen suicida bajo el control de un promotor de sexo específico, la transmisión del transgene a la progenie se elimina, reduce o previene efectivamente, debido a que no se producirán gametos que llevan el GST.

En un aspecto, se puede decir que la invención consiste ampliamente de un gen suicida bajo el control de un promotor específico a polen enlazado a un transgene de interés. El complejo de transgene puede introducirse dentro de un genoma de planta virgen y pueden seleccionarse plantas que son hemizigotas para el complejo de transgene. El único polen producido por la planta hemizigota no tendrá el complejo de transgene debido a su enlace físico al gen suicida. La diseminación no controlada del rasgo heterólogos codificado por el complejo de transgene se previene consecuentemente puesto que no se produce polen que contiene el complejo de transgene.

Un segundo aspecto de la invención está basado en la colocación del GST en cercana proximidad a un transposon para producir en enriquecimiento selectivo de eventos de transposición dispersa en células de progenie puesto que únicamente aquellos gametos que no tienen el foco GST serán viables. Puesto que una fracción de las células de progenie producidas a partir de gametos viables sufrirán eventos de transposición, el enriquecimiento selectivo de eventos de transposición dispersos se logra debido a que el transposon no está más necesariamente

117

enlazado al GST (el GST destruye aquellos gametos que ingieren el foco del gen GST) (Figura 1B).

Consecuentemente, la presente invención proporciona sistemas genéticos que pueden usarse para la eliminación de un complejo de transgene GST y para la selección de transposiciones no enlazadas. Usando el GST conjuntamente con cualquier transgene, se puede eliminar completamente la transmisión de machos (o hembras en el caso de un constructor suicida promotor específico gametofítico de hembras) de tanto el GST como el transgene asociado (Figura 2).

Esta invención proporciona constructores de ácido nucleico que comprenden un promotor específico a gameto macho o gameto hembra enlazado operativamente a un gen suicida, donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un gene de interés.

Esta invención proporciona constructores de ácido nucleico que comprende un promotor específico a gameto macho o gameto hembra enlazado operativamente a un gen suicida, donde la combinación de promotor y el gen suicida está enlazado a un gene de interés. Esta invención proporciona adicionalmente dichos constructores de ácido nucleico dondel promotor se selecciona a partir del grupo que consiste de un promotor específico a polen y un promotor específico a óvulos. Esta invención aún adicionalmente proporciona dichos constructores de ácido nucleico dondel gen suicida se selecciona a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria. Esta invención también proporciona dichos constructores de ácido nucleico dondel gene de interés se selecciona a partir del grupo que consiste de un ácido nucleico que codifica resistencia a herbicida, resistencia a

antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada y contenido de celulosa.

Esta invención proporciona constructores de ácido nucleico que comprenden promotor específico a polen o promotor específico a óvulos enlazado operativamente a un gen suicida seleccionado a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria; donde la combinación del promotor y el gen suicida está enlazada a un gen de interés seleccionado a partir del grupo que consiste de un gen que codifica resistencia a herbicida, resistencia a antibiótico, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, mejorada nutrición y contenido de celulosa u otros rasgos agronómicos de interés.

Esta invención proporciona métodos para reducir o eliminar la transmisión macho de un foco de transgenes en una planta que comprende:

- a) transformar una célula de planta con un constructor de ácido nucleico dondel promotor específico a gameto macho está enlazado operativamente a un gen suicida, donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un poli nucleótido heterólogo;
- b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir gametos machos que no tienen dicho foco de transgene.

Esta invención también proporciona métodos para reducir o eliminar la transmisión de machos de un foco de transgene en una planta que comprende:

a) transformar una célula de planta con un constructor de ácido nucleico dondel promotor específico a polen está enlazado operativamente a un gen suicida;

i) donde dicho gen suicida se selecciona a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria;

ii) donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un poli nucleótido heterólogo;

iii) donde dicho poli nucleótido heterólogo se selecciona a partir del grupo que consiste de DNA que codifica resistencia a herbicidas, resistencia a antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, mejorada nutrición y contenido de celulosa;

b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir gametos machos que no tienen dicho foco de transgene.

Esta invención también proporciona métodos para reducir o eliminar transmisión hembra a un foco de transgene en una planta que comprende:

a) transformar una célula de planta con un constructor de ácido nucleico dondel promotor específico a gameto hembra está enlazado operativamente a un gen suicida, donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un poli nucleótido heterólogo;

b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir gametos hembra que no tienen dicho foco de transgene.

Esta invención adicionalmente proporciona métodos para reducir o eliminar transmisión de hembras de un foco de transgene en una planta que comprende:

a) transformar una célula de planta con un constructor de ácido nucleico donde un promotor específico a óvulos está enlazado operativamente a un gen suicida;

i) donde dicho gen suicida se selecciona a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria;

ii) donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un poli nucleótido heterólogo;

iii) donde dicho poli nucleótido heterólogo se selecciona a partir del grupo que consiste de DNA que codifica resistencia herbicidas, resistencia a antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, mejorada nutrición y contenido de celulosa.

b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir gametos hembras que no tienen dicho foco de transgene.

Esta invención también proporciona células de plantas transformadas producidas mediante los métodos de la presente invención donde las células de plantas transformadas son hemizigosas para el constructor de ácido nucleico.

Esta invención proporciona construcciones de ácido nucleico que comprenden un promotor específico a gameto macho o gameto hembra operativamente enlazados a un gen suicida donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un elemento transponible. Esta invención también proporciona dichas construcciones

de ácido nucleico que adicionalmente comprenden uno o más genes de transposasa. Esta invención adicionalmente proporciona dichas construcciones de ácido nucleico que comprenden adicionalmente uno o más genes de interés. Esta invención aún adicionalmente proporciona dichas construcciones de ácido nucleico dondel gen de interés está asociado con el elemento transponible.

Esta invención proporciona construcciones de ácido nucleico donde un promotor específico a polen o un promotor específico a óvulos está enlazado operativamente a un gen suicida seleccionado a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria; donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un transposon, donde dicho transposon comprende un marcados de selección seleccionado a partir del grupo que consiste de un gen que codifica para resistencia a herbicidas, resistencia a antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada y contenido de celulosa. Esta invención también proporciona dichas construcciones de ácido nucleico dondel promotor se selecciona a partir del grupo que consiste de un promotor específico a polen y un promotor específico a óvulos. Esta invención también proporciona dichas construcciones de ácido nucleico dondel gen suicida se selecciona a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria.

La presente invención proporciona métodos para enriquecer eventos de transposición dispersos en una población de progenie de células de planta que comprende:

- a) transformar una célula de planta con el constructor de ácido nucleico de una cualquiera de las anteriormente mencionadas

construcciones de ácido nucleico para producir una célula de planta transformada;

b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir progenie de célula de planta donde los eventos de transposición dispersa son enriquecidos.

La presente invención también proporciona dichos métodos que incluyen el paso adicional de aislar la progenie de célula de planta donde los eventos de transposición dispersa son enriquecidos. La presente invención también proporciona células de plantas y plantas que contienen eventos de transposición dispersa y, particularmente, las células de plantas y plantas son hemizigotas para el ácido nucleico.

La presente invención proporciona construcciones de ácido nucleico que comprenden un primer promotor donde el primer promotor es un promotor específico a gameto macho o gameto hembra enlazado operativamente a un gen suicida y adicionalmente que comprende un ácido nucleico que codifica una transposasa y un ácido nucleico que codifica un transposon. La presente invención también proporciona dichas construcciones de ácido nucleico donde el transposon comprende un segundo promotor enlazado operativamente a un marcador seleccionado, donde el marcador seleccionado no es un gen suicida.

La presente invención proporciona constructores de ácido nucleico donde un promotor específico a polen o un promotor específico a óvulos está enlazado operativamente a un gen suicida seleccionado a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria, donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un ácido nucleico que codifica transposasa; donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida enlazada a dicho

ácido nucleico que codifica transposasa comprende un foco de transgene el cual adicionalmente comprende un transposon; donde dicho transposon comprende una secuencia de poli nucleótidos que codifica un miembro seleccionado a partir del grupo que consiste de resistencia a herbicidas, resistencia a antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada y contenido de celulosa. La presente invención proporciona dichas constructores de ácido nucleico dondel promotor se selecciona a partir del grupo que consiste de un promotor específico a polen y un promotor específico a óvulos. La presente invención adicionalmente proporciona dichos constructores de ácido nucleico dondel gen suicida se selecciona a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria. La presente invención también proporciona dichas construcciones de ácido nucleico dondel transposon comprende una secuencia de poli nucleótidos que codifica un miembro seleccionado a partir del grupo que consiste de resistencia a herbicidas, resistencia a antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada y contenido de celulosa.

La presente invención también proporciona métodos para enriquecer establemente eventos de transposición dispersa en una población de progenie de células de planta que comprende:

- a) transformar una célula de planta con un constructor de ácido nucleico de la presente invención para producir una célula de planta transformada;
- b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir progenie de células de planta donde se enriquecen establemente eventos de transposición dispersa.

La presente invención también proporciona dichos métodos que comprenden adicionalmente el paso de aislar la progenie de células de planta donde son enriquecidos establemente eventos de transposición dispersa. La invención adicionalmente proporciona células de plantas aisladas mediante dichos métodos y plantas producidas a partir de las células de plantas.

Esta invención proporciona vectores que comprenden las construcciones de ácido nucleico de la presente invención así como células huéspedes, células de plantas recombinantes y plantas transgénicas que comprenden los vectores de la presente invención. Más particularmente, esta invención proporciona dichas células y plantas transgénicas que son hemizigotas para las construcciones de ácido nucleico.

Otros objetivos, ventajas y características de la presente invención serán evidentes para expertos en el arte ante la revisión de la especificación y los dibujos aquí proporcionados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El anterior resumen, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se entenderá en mejor forma cuando se lea en conjunción con los dibujos del apéndice. Con el propósito de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos modalidad(es) que son actualmente preferidas. Deberá entenderse, sin embargo, que la invención no está limitada a los arreglos precisos e capacidades de instrumentación mostradas.

En los dibujos:

La Figura 1A muestra un constructor ilustrativo GST (Rasgo de Esterilidad Gametofítica) donde un promotor específico a polen está

enlazado operativamente a un gen suicida. El constructor GST puede enlazarse físicamente a un gen de interés para formar un complejo de transgenes. El constructor GST se usa para prevenir o eliminar la transmisión del gen de interés.

La Figura 1B muestra un constructor ilustrativo de GST enlazada a un elemento transponible y una fuente de transposasa. Este constructor puede usarse para enriquecer una población de progenie de células de planta para transposones establemente dispersos.

La Figura 2 muestra una estrategia generalizada para eliminar un complejo de transgenes de productos meióticos y para seleccionar transposiciones dispersas.

Las Figuras 3A y 3B muestran esquemas de constructores GST.

Las Figuras 4A y 4B muestran esquemas de constructores pYU904 y pYU905, respectivamente.

La Figura 5 muestra un esquema de constructor de transposasa pYU846.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado entendido comúnmente por una persona experta en el arte al cual pertenece esta invención. Aunque pueden usarse cualesquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos aquí descritos en la

126
126

práctica o prueba de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

A partir de lo anterior se apreciará que las herramientas y métodos de la presente invención tienen aplicación en todas las plantas que producen gametos. Dichas plantas incluyen, pero no están limitadas a, pastos de forraje, pastos de grama, legumbres de forraje, vegetales, cosechas de campo, árboles y flores ornamentales.

Definiciones

Tal como se usa aquí, el término "allele" se refiere a cualquiera de las varias formas alternativas de un gen.

Tal como se usa aquí, el término "planta de cosecha" se refiere a cualquier planta que crece con cualquier propósito comercial, incluyendo, pero no limitada a los siguientes propósitos: producción de semillas, producción de heno, uso ornamental, producción de frutas, producción de bayas, producción de vegetales, producción de aceite, producción de proteínas, producción de forrajes, pastos para animales, campos de golf, gramas, producción de flores, prados, control de erosión, abono verde, mejora de suelo de torneo/salud, producción de productos/drogas farmacéuticas, producción de aditivos para alimentos, productos para fumar, producción de pulpa y producción de madera.

Tal como se usa aquí, el término "polinización transversal" o "crecimiento transversal" se refiere al proceso mediante el cual el polen de una flor en una planta se aplica (artificial o naturalmente) al óvulo (estigma) de una flor en otra planta.

Tal como se usa aquí, el término "cultivar" se refiere a una variedad, cadena o raza de planta que ha sido producida mediante técnicas hortícolas o agronómicas y no se encuentra normalmente en poblaciones silvestres.

El término "evento de transposición dispersa" se refiere al movimiento de un transposon tal que ya no está enlazado (es decir, en cercana proximidad) al lugar de entrada del transposon (lugar donante).

El término "hembra" se refiere a una planta que produce óvulos. Las plantas hembras generalmente producen semillas después de la fertilización. Una planta designada como una "planta hembra" puede contener órganos sexuales tanto macho como hembra. Alternativamente, la "planta hembra" puede contener únicamente órganos sexuales hembra ya sea naturalmente (por ejemplo, en especies dioeciosas) o debido a emasculación (por ejemplo, mediante sellado deta).

Tal como se usa aquí, el término "generación filial" se refiere a cualquiera de las generaciones de células, tejidos u organismos que siguen una generación de padres particular. La generación resultante de un emparejamiento de los padres es la primera generación filial (designada como "F1" o "F₁"), mientras que la resultante de cruce de individuos F1 es la segunda generación filial (designada como "F2" o "F₂").

El término "gameto" se refiere a una célula reproductiva cuyo núcleo (y a menudo citoplasma) se fusiona con el de otro gameto de origen similar pero de sexo opuesto para formar un cigoto, que tiene el potencial de desarrollarse en un nuevo individuo. Los gametos son haploides y se diferencian en macho y hembra.

El término "gen o gene" se refiere a cualquier segmento de ADN asociado con una función biológica. Consecuentemente, los genes incluyen, pero no están limitados a, secuencias de codificación y/o las secuencias regulatorias requeridas para su expresión. Los genes pueden incluir también segmentos no expresados de ADN que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Los genes pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes, incluyendo clonación a partir de una fuente de interés o sintetizando a partir de información de secuencia conocida o predicha, y puede incluir secuencias designadas para tener parámetros deseados.

Tal como se usa aquí, el término "genotipo" se refiere a la formación genética de una célula individual, cultura de célula, tejido, planta, o grupo de plantas.

Tal como se usa aquí, el término "hemizigosa" se refiere a una célula, tejido u organismo donde un gen está presente únicamente una vez en un genotipo, como un gen en una célula haploide u organismo, un gen enlazado sexual en el sexo heterogamético, o un gen en un segmento de cromosoma en una célula diploide u organismo donde su segmento compañero se ha eliminado.

Un "poli nucleótido heterólogo" o un "ácido nucleico heterólogo" o un "segmento exógeno de ADN" se refiere a un poli nucleótido, ácido nucleico o segmento de ADN que se origina a partir de una fuente foránea a la célula huésped particular, o, si a partir de la misma fuente, se modifica de su forma original. Consecuentemente, un gen heterólogo en una célula huésped incluye un gen que es endógeno a la célula huésped particular, pero ha sido modificado. Consecuentemente, el término se refiere a un segmento de ADN que es foráneo o heterólogo a la célula, u

homólogo a la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped donde el elemento no se encuentra ordinariamente. Los segmentos exógenos de ADN se expresan para lograr polipéptidos exógenos.

Un "rasgo heterólogo" se refiere a un fenotipo impartido a la célula huésped transformada u organismo transgénico mediante un segmento exógeno de ADN, poli nucleótido heterólogo o ácido nucleico heterólogo.

Tal como se usa aquí, el término "heterocigoto" se refiere a una célula individual diploide o poliploide o una planta que tiene diferentes aleles (formas de un gen dado) presentes por lo menos en un foco.

Tal como se usa aquí, el término "heterocigoto" se refiere a la presencia de diferentes aleles (formas de un gen dado) en un foco de gen particular.

Tal como se usa aquí, el término "homocigoto" se refiere a una célula individual o planta que tiene las mismas aleles en uno o más focos.

Tal como se usa aquí, el término "homocigoto" se refiere a la presencia de aleles idénticas en uno o más focos en segmentos de cromosomas homólogos.

Tal como se usa aquí, el término "híbrido" se refiere a cualquier célula individual, tejido o planta que resulta de un cruce entre padres que difiere en uno o más genes.

Tal como se usa aquí, el término "criada sin mezcla" o "línea criada sin mezcla" se refiere a una cadena de cría relativamente real.

Tal como se usa aquí, el término "línea" se usa ampliamente para incluir, pero no limitada a, un grupo de plantas propagadas vegetalmente a partir de una única planta padre, vía técnicas de cultivo de tejido o un grupo de plantas criadas sin mezcla que son genéticamente muy similares debido a que descienden de padre(s) común(es). Una planta se dice que "pertenece" a una línea particular si (a) es una planta transformante *primaria (T0) regenerada a partir de material de esa línea*; (b) *tiene un pedigrí compuesto de una planta T0 de esa línea*; o (c) es genéticamente muy similar debido a un ancestro común (por ejemplo, vía crianza o auto cría). En este contexto, el término "pedigrí" denota el linaje de una planta, por ejemplo en términos de los cruces sexuales efectuados en forma tal que un gen o una combinación de genes, en condición heterocigota (hemizigosa) u homocigota, imparte un rasgo deseado a la planta.

Tal como se usa aquí, el término "foco" (plural: "focos") se refiere a cualquier lugar que ha sido definido genéticamente. Un foco puede ser *un gen, o parte de un gen, o una secuencia de ADN que tiene algún rol regulatorio*, y puede ser ocupado por diferentes secuencias.

El término "macho" se refiere a una planta que produce granos de polen. La "planta macho" generalmente se refiere al sexo que produce gametos para fertilizar huevos. Una planta designada como una "planta macho" puede contener órganos sexuales tanto machos como hembras. Alternativamente, la "planta macho" puede únicamente contener órganos sexuales machos ya sea naturalmente (por ejemplo, en especies

dioeciosas) o debido a emasculación (por ejemplo, removiendo los ovarios).

Tal como se usa aquí, el término "selección de masa" se refiere a una forma de selección donde plantas individuales se seleccionan y la siguiente generación propagada a partir del agregado de sus semillas.

Tal como se usa aquí, los términos "ácido nucleico" o "poli nucleótido" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros en forma ya sea de simple o doble cadena. A menos que se limite específicamente, los términos comprenden ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen similares propiedades de enlace como el referenciado ácido nucleico y son metabolizados en una forma similar a los nucleótidos que ocurren naturalmente. A menos que se indique de otra forma, una secuencia particular de ácido nucleico también comprende implícitamente sus variantes modificadas conservativamente (por ejemplo, sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codon degenerado pueden lograrse generando secuencias donde la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituyen con residuos de base mezclados y/o residuos de deoxinosina (Batzer y otros, (1991) Ácido nucleico Res. 19:5081; Ohtsuka y otros, (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; Cassol y otros, (1992); Rossolini y otros, (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98). El término ácido nucleico se usa intercambiabilmente con gen, cADN, y mRNA codificado mediante un gen.

Tal como se usa aquí, un segmento de ADN se refiere como "operativamente enlazado" cuando está colocado en una relación

funcional con otro segmento de ADN. Por ejemplo, el ADN para una secuencia de señal está enlazado operativamente a ADN que codifica un polipéptido si está expresado como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o elevador está enlazado operativamente a una secuencia de codificación si estimula la transcripción de la secuencia. Generalmente, las secuencias de ADN que están enlazadas operativamente son contiguas, y en el caso de una secuencia de señal tanto contiguas como en fase de lectura. Sin embargo, los elevadores no tienen que ser contiguos con las secuencias de codificación cuya transcripción controlan. El enlace se cumple mediante ligación a lugares convenientes de restricción o a adaptadores o enlazadores insertados en su lugar.

Tal como se usa aquí, el término “*polinización abierta*” se refiere a una población de plantas población que está expuesta libremente a algún flujo de genes, en oposición a una cerrada donde hay una barrera efectiva al flujo de genes.

Tal como se usa aquí, los términos “*población de polinización abierta*” o “*variedad de polinización abierta*” se refieren a plantas normalmente capaces de por lo menos alguna fertilización cruzada, seleccionada a un estándar, que puede mostrar variación pero que también tiene una o más características genotípicas o fenotípicas *mediante las cuales* la población o la variedad puede diferenciarse de otras. Un híbrido, el cual no tiene barreras a la polinización cruzada, es una población de polinización abierta o una variedad de polinización abierta.

Tal como se usa aquí, el término “*óvulo*” se refiere al gametofito hembra, mientras que el término “*polen*” significa el gametofito macho.

Tal como se usa aquí, el término "promotor específico a óvulos" se refiere ampliamente a una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de secuencias de ácido nucleico selectivamente en las células o tejidos de una planta esencial para la formación de óvulos y/o función y/o limita la expresión de una secuencia de ácido nucleico al periodo de formación de óvulos en una planta.

Tal como se usa aquí, el término "promotor específico a polen" se refiere ampliamente a una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de secuencias de ácido nucleico selectivamente en las células o tejidos de una planta esencial para la formación de polen y/o función y/o limita la expresión de una secuencia de ácido nucleico al periodo de formación de polen en la planta.

Tal como se usa aquí, el término "fenotipo" se refiere a los caracteres observables de una célula individual, cultivo de células, planta, o grupo de plantas que resulta de la interacción entre ese desarrollo genético individual (es decir, genotipo) y el ambiente.

Tal como se usa aquí, el término "planta" se refiere a plantas completas, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, vástagos, raíces, etc.), semillas y células de plantas y su progenie. La clase de plantas que pueden usarse en los métodos de la invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas mayores disponibles por técnicas de transformación, incluyendo plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas.

Tal como se usa aquí, el término "promotor" se refiere a una región de ADN involucrada en enlazar RNA polimeraza para iniciar transcripción.

134
13A

Tal como se usa aquí, el término "recombinante" se refiere a una célula, tejido o organismo que ha sufrido transformación con ADN recombinante. El recombinante original se designa como "R0" o "R₀." La auto regulación del R0 produce una primera generación transformada designada como "R1" o "R₁."

Tal como se usa aquí, el término "auto-incompatible" significa la falta, después del emparejado polinización, de un gameto macho y un gameto hembra para lograr la fertilización, donde cada uno dellos es capaz de unirse con otros gametos del grupo de cultivo después de similar emparejado polinización (Mather, J. Genet. 25:215-235 (1943)).

Tal como se usa aquí, el término "auto polinizado" o "auto-polinización" significa que el polen de una flor en una planta es aplicado (artificial o naturalmente) al óvulo (estigma) de la misma o una flor diferente en la misma planta.

Tal como se usa aquí, el término "evento de transposición disperso establemente" se refiere a una transposición dispersa que sufre adicionalmente transposiciones tales como eventos secundarios de transposición.

Tal como se usa aquí, el término "gen suicida" se refiere a cualquier gen que expresa un producto que es fatal para la célula que expresa el gen suicida.

Tal como se usa aquí, el término "sintético" se refiere a una serie de progenies derivadas mediante el entrecruce de una serie específica de clones o líneas de semillas propagadas. Un sintético puede contener mezclas de semillas resultantes de fertilización cruzada, auto, y sub.

Tal como se usa aquí, el término "transformación" se refiere a la transferencia de ácido nucleico (es decir, un polímero nucleótido) en una célula.

Tal como se usa aquí, el término "transformación genética" se refiere a la transferencia e incorporación de ADN, especialmente ADN recombinante, dentro de una célula.

Tal como se usa aquí, el término "transformante" se refiere a una célula, tejido o organismo que ha sufrido transformación. El transformante original se designa como "T0" o "T₀." La auto regulación del T0 produce una primera generación transformada designada como "T1" o "T₁."

Tal como se usa aquí, el término "transgene" se refiere a ácido nucleico que es insertado dentro de un organismo, célula huésped o vector en una manera que asegura su función.

Tal como se usa aquí, el término "transgénico" se refiere a células, cultivos de células, organismos, plantas, y progenie de plantas que han recibido un gen foráneo o modificado mediante uno de los varios métodos de transformación, dondel gen foráneo o modificado es de la misma o diferente especie de la especie de la planta, u organismo que recibe el gen foráneo o modificado.

Tal como se usa aquí, el término "transposasa" se refiere a una enzima, enzimas, o más generalmente, una molécula o moléculas que catalizan un evento de transposición.

Tal como se usa aquí, el término "evento de transposición" se refiere al movimiento de un transposon desde un lugar donante hasta un lugar objetivo.

Tal como se usa aquí, el término "transposon" se refiere a un elemento genético, que incluye pero no está limitado a segmentos de ADN o RNA que pueden moverse desde un lugar cromosómico a otro.

Tal como se usa aquí, el término "variedad" se refiere a una subdivisión de una especie, que consiste de un grupo de individuos dentro de la especie que son distintos en forma o función de otros arreglos similares de individuos.

Tal como se usa aquí, el término "vector" se refiere ampliamente a cualquier plásmido o virus que codifica un ácido nucleico exógeno. El término puede también construirse para incluir compuestos no plásmido y no viral que facilitan la transferencia del ácido nucleico en virus o células, tales como, por ejemplo, compuestos de poli lisina y similares. El vector puede ser un vector viral que es adecuado como un vehículo de suministro para el suministro del ácido nucleico, o su mutante, a una célula, o el vector puede ser un vector no viral que es adecuado para el mismo propósito. Ejemplos de vectores virales y no virales para suministro de ADN a células y tejidos son bien conocidos en el arte y se describen, por ejemplo, en Ma y otros, (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:12744-12746). Ejemplos de vectores virales incluyen, pero no están limitados a, un virus recombinante de vacuna, un adenovirus recombinante, un retrovirus recombinante, un virus recombinante adeno asociado, un virus recombinante de aves, y similares (Cranage y otros, 1986, EMBO J. 5:3057-3063; Solicitud de Patente Internacional No. WO94/17810, publicada en Agosto 18, 1994; Solicitud de Patente

Internacional No. WO94/23744, publicada en Octubre 27, 1994). Ejemplos de vectores no virales incluyen, pero no están limitados a, liposomas, derivados de poliamina de ADN, y similares.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen construcciones y métodos para la destrucción de los gametofitos machos o hembras (micro esporas o mega esporas) para los propósitos *deliminar la transmisión de un foco de transgene (gen de interés)*. En una modalidad, la destrucción de micro esporas se efectúa por ingeniería genética usando un promotor específico a polen fusionado a un apropiado gen suicida o a través del uso de mutaciones genéticas que no pueden ser transmitidas a través de uno de los sexos.

Cuando es hemizigosa, la transmisión que elimina un foco de transgene se logra enlazando un gen de interés a un gen suicida bajo el control de un promotor específico a machos o hembras. Este constructor, denominado el "rasgo suicida gametofítico" (GST) induce la muerte de la célula que se restringe a micro esporas o mega esporas, reduciendo o eliminando así efectivamente la transmisión del gen de interés que está enlazado al GST. Puesto que el constructor de GST/transgene es hemizigoso, 50% de los granos del polen será viable y no transgénico. Consecuentemente, la transmisión de un transgene puede controlarse mientras que permite que ocurra la polinización en forma tal de lograr la fertilización y obtener últimamente un suministro de semillas para plantar o uso en alimentos. Puesto que muchas plantas producen una super abundancia de polen, la pérdida de 50% del polen producido no afectará adversamente el establecimiento de semillas para la mayoría de las especies de plantas. Como un ejemplo, el maíz (*Zea mays*) produce tanto como 10^7 granos de polen por día para una planta en el pico de un

periodo de floración de 7 días (Coe y otros, La Genética del Maíz, En: Maíz y Mejora del Maíz, Tercera Edición. Editores: Sprague y otros, (1988) páginas 81 a 258).

La eliminación de la transmisión de machos de un foco de transgene puede usarse también como una novedosa estrategia para enriquecer eventos de transposición dispersos y/o estables. Esto se logra por ingeniería de un "complejo de transgene" que contiene un elemento transponible y/o gen de transposasa conjuntamente con un "rasgo suicida gametofítico" (GST). El GST induce la muerte de las células que están restringidas a micro esporas, reduciendo severamente la transmisión macho de las regiones cercanas de cromosomas y otros transgenes, incluyendo el transposon (elemento donante) y/o gen de transposasa dentro del complejo de transgene.

Cuando el complejo de transgene es heterocigoto en el padre, aproximadamente 50% de micro esporas sufrirán destrucción, previniendo así la transmisión macho del complejo de transgene y reduciendo en gran medida la transmisión macho de los elementos enlazados transpuestos. Esta eliminación del lugar donante del transposon y transposiciones cercanas tiene el efecto neto de enriquecer al polen que contiene transposiciones no enlazadas y elementos transpuestos que se han recombinado con el complejo de transgene donante.

Los eventos sobrevivientes de transposición pueden seleccionarse rápidamente incluyendo un gen marcador que se selecciona de herbicida dentro del elemento transponible. El GST puede también enlazarse físicamente a la fuente de transposasa para eliminar gametos que contienen una fuente de transposasa. Este arreglo previene la transmisión

de la fuente de transposasa a gametos, estabilizando así las inserciones en subsecuentes generaciones.

Todos los tres componentes – el gen suicida o mutación, la fuente de transposasa y el transposon – pueden desarrollarse por ingeniería como una unidad para proporcionar un método robusto de generar transposiciones dispersas, estables. Una estrategia alternativa para la destrucción de micro esporas es desarrollar por ingeniería la semi esterilidad de los óvulos usando un rasgo suicida de mega espora para eliminar la transmisión de hembras del complejo de transgene.

I. Ácidos nucleicos

A. Promotores

Existen muchos ejemplos excelentes de adecuados promotores para accionar la expresión específica a polen en plantas. Promotores específicos a polen se han identificado en muchas especies de plantas tales como maíz, arroz, tomate, tabaco, *Arabidopsis*, *Brassica*, y otras (Odell, T. O., y otros (1985) *Naturaleza* 313:810-812; Marrs, K. A., y otros, (1993) *Dev Genet*, Vol. 14/1:27-41; Kim, (1992) *Transgenic Res*, Vol. 1/4:188-94; Carpenter, J. L., y otros (1992) *Célula de planta* Vol. 4/5:557-71; Albani, D., y otros, (1992) *Plant J*. 2/3:331-42; Rommens, C. M., y otros (1992), *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 231/3:433-41; Kloeckener-Gruissem, y otros, (1992) *Embo J*, Vol. 11/1:157-66; Hamilton, D. A., y otros, (1992), *Plant Mol Biol*, Vol. 18/2:211-18; Kyoizuka, J., y otros, (1991), *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 228/1-2:40-8; Albani, D., y otros (1991) *Plant Mol Biol* Vol. 16/4:501-13; Twell, D., y otros (1991) *Genes Dev*. 5/3:496-507; Thorsness, M. K., y otros, (1991) *Dev. Biol* Vol. 143/1:173-84; McCormick, S., y otros (1991) *Symp Soc Exp Biol* Vol. 45:229-44;

140

Guerrero, F. D., y otros (1990) *Mol Gen Genet* Vol 224/2:161-8; Twell, D., y otros, (1990) *Desarrollo* Vol. 109/3:705-13; Bichler, J., y otros (1990) , *Eur J Biochem* Vol. 190/2:415-26; van Tunen, y otros (1990), *Célula de planta* Vol 2/5:393-401; Siebertz, B., y otros, (1989) *Célula de planta* Vol 1/10:961-8; Sullivan, T. D., y otros, (1989) *Dev Genet* Vol 10/6:412-24; Chen, J., y otros (1987), *Genetics* Vol 116/3:469-77). Varios otros ejemplos de promotores específicos a polen pueden encontrarse en el GenBank. Adicionales promotores se proporcionan también en las Patentes US Nos. 5,086,169; 5,756,324; 5,633,438; 5,412,085; 5,545,546 y 6,172,279.

Hay también varios otros promotores eucarióticos específicos al sexo adecuados para uso en la presente invención. Ejemplos incluyen: el promotor P_{gk}-2 específico a espermatofoito de ratón (Ando y otros (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 272/1:125-8); el promotor PACAP específico a testículos (Daniel y otros (2000) *Endocrinología*, 141/3:1218-27); el promotor mSP-10 de ratón específico a espermato (Reddi y otros (1999) *Biología de la Reproducción*, 61/5:1256-66); el promotor específico a espermato de ratón (Ramara y otros (1998) *J. Clin. Invest.* 102/2:371-8); los promotores de ratón y ratas H1t (vanWert y otros (1996) *J. Cell. Biochem.* 60/3:348-62); los promotores humanos PRM1, PRM2 y TNP2 específicos a espermato (Nelson y otros (1995) *Secuencia de ADN* 5/6:329-37); el promotor específico al sexo *Drosophila exu* (Crowley y otros (1995) *Molec. Gen. Genet.* 248/3:370-4); el promotor ACE de testículos de ratón (Zhou y otros (1995) *Dev. Genet.* 16/2:201-9); el promotor de rata GHRH específico espermatogénico (Srivastava y otros (1995) *Endocrinología* 136/4:1502-8); el promotor específico a testículo *Drosophila* (Lankenau y otros (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14/3:1764-75); el promotor de gen hst70 específico a espermatofoito (Widlak y otros (1994) *Acta Biochim.*

Polonica 41/2:103-5); y el promotor específico a espermatozoos de ratón Prm-1 (Zambrowicz y otros (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90/11:5071-5).

Para la presente invención, cualquier promotor será adecuado si el promotor es específico a un sexo (machos o hembras) y específicamente acciona la expresión de gen después de meiosis I cuando los cromosomas homólogos se han separado en dos células diferentes. Por ejemplo, la expresión del gen en la tercera etapa de meiosis II, la división post-mitótica de la microespora que lleva a la maduración del polen, el grano maduro de polen, o en el grano de polen germinado, serán adecuados para la corriente invención.

B. Genes suicidas

Un aspecto del rasgo suicida gametofítico (GST) en la expresión dirigida de un gen suicida para matar productos meióticos no deseados. Ejemplos de genes cuya expresión resulta en la muerte de las células incluye, pero no están limitados a, aquellos que se han descrito en la literatura incluyendo la barnasa (Custers, J. B., y otros, (1997) Plant Mol Biol Vol. 35/6:689-99; Yazynin, S., y otros, (1999) FEBS Lett Vol. 452/3:351-4; Goldman, M. H., y otros, (1994) Embo J Vol. 13/13:2976-84, 1994), semilla de borla 2 (DeLong, A., y otros, (1993) Cell Vol. 74/4:757-768), y el gen A de la toxina de difteria (Day, C. D., y otros, (1995) Desarrollo Vol. 121/9:2887-95). Debido a que la expresión del gen suicida está confinada a post-meiosis I, únicamente el 50% de los gametos serán eliminados cuando el transgene es hemizigoso y se segrega normalmente en meiosis. Los gametos viables no esconderán el gen suicida.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la semi esterilidad puede lograrse también usando tecnología RNA contra sentido para inhibir la expresión de un gen, o genes, esencial para la viabilidad del polen o huevo. Esta tecnología se discute en más detalle abajo.

Alternativamente, las mutaciones que son incapaces de transmisión a través de uno de los sexos, tales como retiros que no son transmitidas por polen pueden también usarse para lograr la semi esterilidad.

Ejemplos específicos de genes suicidas incluyen, pero no están limitados a, lo siguiente:

Semilla de borla 2 (ts2). La evidencia genética y molecular muestra que el ts2 se requiere para la eliminación de pistilo tanto en borla como en espiguitas. La expresión de ts2 en células de pistilo es coincidente con la pérdida de integridad nuclear y la muerte de las células. No está claro cómo el producto del gen ts2 funciona en una trayectoria de muerte de células. Sobre la base de su similitud con las deshidrogenasas de alcohol de cadena corta, especialmente a las deshidrogenasas hidroxí-esteroides, se teorizan dos posibilidades. El producto ts2 puede metabolizar un sustrato, tal vez un esteroide, requerido para la viabilidad de las células. Alternativamente, la acción del TS2 puede dar como resultado la formación de una molécula de señalización que activa una respuesta de muerte de células. (Calderon-Urrea y otros, (1999) Desarrollo, 126:435).

Cadena de Toxina A de difteria (DTA). La cadena de Toxina A de difteria (DTA) inhibe la síntesis de proteínas, Greenfield y otros, Proc. Natl. Acad., Sci.:USA, 80:6853 (1983); Palmiter y otros, Célula, 50:435 (1987).

Pectato liase pelE. El pectate liase pelE de crisantemos *Erwinia* EC16 degrada la pectina, causando lisis de células. Keen y otros, J. Bacteriología, 168:595 (1986).

T-urf13 (TURF-13). T-urf13 (TURF-13) de cms-T genomas mitocondrias de maíz; este gen codifica un polipéptido designado URF13 que interrumpe las membranas de mitocondrias o membranas de plasma. Braun y otros, Célula de Plantas, 2:153 (1990); Dewey y otros, Proc. Natl. Acad. Sci.:USA, 84:5374 (1987); Dewey y otros, Célula, 44:439 (1986).

Recombinasa Gin. Recombinasa Gin del gen fago Mu codifica una recombinasa de AND de lugar específico que causará arreglos de genomas y pérdida de la viabilidad de las células cuando se expresa en células de plantas. Maeser y otros, Mol. Gen. Genet., 230:170-176 (1991).

Sintetasa de indolo ácido acético-lisina (iaaL). La sintetasa de indolo ácido acético-lisina (iaaL) de *Pseudomonas syringae* codifica una enzima que conjuga lisina al ácido indolacético (IAA). Cuando se expresa en las células de plantas, causa desarrollos alterados debido al retiro de IAA de la célula vía la conjugación. Romano y otros, Genes y Desarrollo, 5:438-446 (1991); Spena y otros, Mol. Gen. Genet., 227:205-212 (1991); Roberto y otros, Proc. Natl. Acad. Sci.:USA, 87:5795-5801.

Barnasa. Ribonucleasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, también conocida como barnasa, digiere mRNA en aquellas células donde se expresa, llevando a la muerte de las células. Mariani y otros, Naturaleza 347:737-741 (1990); Mariani y otros, Naturaleza 357:384-387 (1992).

Gen de toxina CytA. El gen de toxina CytA del *Bacillus thuringiensis israeliensis* codifica una proteína que mata mosquitos y es hemolítica. Cuando se expresa en células de plantas, causa la muerte de la célula debido a la interrupción de la membrana de la célula. McLean y otros., J. Bacteriología, 169:1017-1023 (1987); Ellar y otros, U.S. Patente No. 4,918,006 (1990).

Adecuados genes de muerte de células para uso como genes suicidas en otros organismos eucarióticos incluyen: *PDCD9* humana (muerte de células programada 9) y el *Gallus gallus* pro-apoptotico proteína p52 (Carim y otros (1999) Citogenética y Genética de Células (Suiza) 87/1-2:85-8); los genes de muerte de células programada *C. elegans* CED-3 y EGL-1 (Hengartner y otros (1999) 54:213-22); el gen que codifica el homólogo mamífero de *C. elegans* CED-3: ICE (enzima interleukina-1beta-conversión) (Kondo y otros (1998) Oftalmología Investigativa & Ciencia Visual 39/13:2769-74); los genes que codifican ICE-como proteasas Ich-1L, CPP32beta, Mch2alpha y Mch3alpha (Kondo y otros (1998) 58/5:962-7); o el gen de muerte de células de mamíferos Nedd2 (Kumar y otros (1997) Leukemia 11 Suppl 3:385-6).

C. Transgenes y Ácidos Nucleicos Heterólogos

Los genes introducidos exitosamente en plantas usando metodologías de AND recombinante incluyen, pero no están limitados a, aquellos que codifican para las siguientes proteínas de almacenamiento de rasgos : semillas, incluyendo proteínas de almacenamiento de semillas de legumbres modificadas 7S (Patentes U.S. Nos. 5,508,468, 5,559,223 y 5,576,203); tolerancia o resistencia herbicida (Patentes U.S. Nos. 5,498,544 y 5,554,798; Powell y otros, Ciencia 232:738-743 (1986); Kaniewski y otros, Bio/Tech. 8:750-754 (1990); Day y otros, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 88:6721-6725 (1991)); fitasa (Patente U.S. No. 5,593,963); resistencia a bacterias, hongos, nemátodos y pestes de insectos, incluyendo resistencia a lo insectos lepidópteros conferida por el gen Bt (Patentes U.S. Nos. 5,597,945 y 5,597,946; Lider y otros, Naturaleza 330:160-163; Johnson y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9871-9875 (1989); Perlak y otros, Bio/Tech. 8:939-943 (1990)); lectinas (Patente U.S. No. 5,276,269); y color de flores (Meyer y otros, Naturaleza 330:677-678 (1987); Napoli y otros., Célula de planta 2:279-289 (1990); van der Krol y otros, Célula de planta 2:291-299 (1990)).

De particular interés son los genes que confieren resistencia a un herbicida. Ejemplos incluyen, pero no están limitados a, los siguientes:

(i) un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristema, tal como una imidazalinona o una sulfonil urea. Genes de ejemplo en esta categoría codifican para enzimas mutantes ALS y AHAS como se describe, por ejemplo, por Lee y otros, EMBO J. 7: 1241 (1988), y Miki y otros, Theor. Appl. Genet. 80: 449 (1990), respectivamente.

(ii) Glifosato (resistencia impartida por sintasa mutante 5-enolpyruvyl-3-fosfikimata (EPSP) y aroA genes, respectivamente) y otros compuestos de fosfono tales como glufosinato (fosfinotricina acetil transferasa (PAT) y *Streptomyces hygroscopicus* fosfinotricina acetil transferasa (bar) genes), y piridinoxi o fenoxi ácidos propiónicos y ciclohexonas (ACCase genes inhibidores-codificadores). Ver, por ejemplo, la Patente U.S. No. 4,940,835 a Shah y otros, la cual divulga la secuencia de nucleótidos de una forma de EPSP que puede conferir resistencia al glifosato. Una molécula de AND que codifica un gen mutante aroA puede obtenerse bajo el número de acceso ATCC No. 39256, y la secuencia de nucleótidos del gen mutante se divulga en la Patente U.S. No. 4,769,061 de Comai. La solicitud de patente Europea No. 0 333 033 de Kumada y otros y la Patente U.S. No. 4,975,374 de

Goodman y otros divulga secuencias de nucleótidos de genes de sintetasa que confieren resistencia a herbicidas tales como L-fosfinotricina. La secuencia de nucleótidos de un gen de fosfinotricina-acetil-transferasa se proporciona en la solicitud Europea No. 0 242 246 de Leemans y otros. De Greef y otros, *Bio/Tecnología* 7: 61 (1989), describe la producción de plantas transgénicas que expresan genes quiméricos barrera que codifican para actividad de fosfinotricina acetil transferasa. Ejemplos de genes que confieren resistencia a fenoxi ácidos propiónicos y ciclohexonas, tales como setoxidima y haloxifop, son los genes Acc1-S1, Acc1-S2 y Acc1-S3 descritos por Marshall y otros, *Theor. Appl. Genet.* 83: 435 (1992). La expresión de un gen de *Streptomyces* barrera que codifica una fosfinotricina acetil transferasa en plantas de maíz resulta en tolerancia al herbicida fosfinotricina o glufosinato (Patente U.S. No. 5,489,520, incorporada aquí a modo de referencia).

Para algunas especies objetivo, se pueden preferir los marcadores de selección de antibióticos o herbicidas. Marcadores de selección usados rutinariamente en la transformación incluyen el gen nptII el cual confiere resistencia a canamicina y antibióticos relacionados (Messing & Vierra, *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan y otros, *Naturaleza* 304:184-187 (1983)), el gen de barrera que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (White y otros, *Nucl Acids Res* 18: 1062 (1990), Spencer y otros. *Theor Appl Genet* 79: 625-631(1990)), el gen hph que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Blochinger & Diggelmann, *Mol Cell Biol* 4: 2929-2931), y el gen dhfr, el cual confiere resistencia al metotrexato (Bourouis y otros, *EMBO J.* 2(7): 1099-1104 (1983)).

Las plantas transgénicas de alfalfa se han producido usando un número de diferentes genes aislados de especies tanto de alfalfa como no de alfalfa incluyendo, pero no limitadas a, las siguientes: el promotor de

un gen de nodulin fundido al gen de reporte gusA (Bauer y otros, El diario de Plantas 10(1):91-105 (1996); el gen de nodulin (Charon y otros, Proc. Natl. Acad. de Sci. USA 94(16):8901-8906 (1997); Bauer y otros, Interacciones moleculares de Planta-Microbio 10(1):39-49 (1997)); NADH-dependiente glutamato sintasa (Gantt, El Diario de Plantas 8(3):345-358 (1995)); fusiones de promotor-gusA para cada uno de los tres genes de lectina (Bauchrowitz y otros, El Diario de Plantas 9(1):31-43 (1996)); la enzima luciferasa del coral marino blando *Renilla reniformis* fundido al promotor CaMV (Mayerhofer y otros, El Diario de Plantas 7(6):1031-1038 (1995)); Mn-superóxido dismutasa cADN (McKersie y otros, Fisiología de las Plantas 111(4):1177-1181 (1996)); genes sintéticos cryIC que codifican un *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxina (Strizhov y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(26):15012-15017 (1996)); glucanase (Dixon y otros., Gene 179(1):61-71 (1996); Masoud y otros, Investigación transgénica 5(5):313-323); y gen de hoja de senescencia (Patente U.S. No. 5,689,042).

Genes transferidos exitosamente en trébol usando tecnologías de ADN recombinante incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: genes Bt (Voisey y otros, supra); neomicina fosfotransferasa II (Quesbenberry y otros, supra); el gen de lectina de arveja (Diaz y otros, Fisiología de las Plantas 109(4):1167-1177 (1995); Eijdsen y otros, Biología Molecular de las Plantas 29(3):431-439 (1995)); el promotor de respuesta auxin GH3 (Larkin y otros, Investigación transgénica 5(5):325-335 (1996); gen de semilla de albúmina de girasoles (Khan y otros, Investigación transgénica 5(3):179-185 (1996)); y genes que codifican las enzimas de fosfinotricina acetil transferasa, beta-glucuronidasa (GUS) que codifica para resistencia al herbicida Basta®, neomicina fosfotransferasa, y un inhibidor de alfa-amilasa (Khan y otros, supra).

Otros transgenes de interés incluyen, pero no están limitados a, aquellos que codifican para o relacionados con contenido de lignina, contenido de celulosa, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada, color, contenido de vitaminas y vacunas producidas en forma recombinante.

D. Sistemas de Recombinación Específicos a Lugares

Los métodos y construcciones para el objetivo de secuencias de ADN para inserción dentro de un foco particular de ADN, mientras que permite el retiro de secuencias de ADN insertadas al azar que ocurren como un producto colateral de procedimientos de transformación, se describen en las patentes U.S. Nos. 5,527,695 y 6,114,600. *una manera de retirar estas inserciones al azar es utilizar un sistema de recombinasa específico a lugar. En general, un sistema de recombinasa específico a lugar consiste de tres elementos: dos pares de secuencia de ADN (las secuencias de recombinación específicas a lugar) y una enzima específica (la recombinasa específica a lugar). La recombinasa específica a lugar catalizará una reacción de recombinación reacción únicamente entre dos secuencias de recombinación específicas a lugar.*

Un número de diferentes sistemas de recombinasa específicos a lugar pueden usarse, incluyendo pero no limitado al sistema Cre/lox de bacteria fago P1, el sistema FLP/FRT de yeso, la recombinasa Gin de fago Mu, la recombinasa Pin de E. coli, y el sistema R/RS del plásmido pSR1. los dos sistemas preferidos de recombinasa específica a lugares son los sistemas bacteriofagos P1 Cre/lox y yeso FLP/FRT. En estos sistemas una recombinasa (Cre o FLP) interactuará específicamente con su respectiva secuencia de recombinación específica a lugares (lox o FRT respectivamente) para invertir o ejercer las secuencias que intervienen. La secuencia para cada uno de estos dos sistemas es relativamente corta

(34 bp para lox y 47 bp para FRT). Corrientemente el sistema FLP/FRT de yeso es el sistema preferido de recombinasa específico a lugar puesto que funciona normalmente en un organismo eucariótico (yeso), y está bien caracterizado. Se considera que el origen eucariótico del sistema FLP/FRT permite al sistema FLP/FRT funcionar más eficientemente en células eucarióticas que los sistemas procarióticos de recombinasa específicos a lugares.

El sistema de recombinasa FLP/FRT se ha demostrado que funciona eficientemente en células de plantas. Experimentos sobre el desempeño del sistema FLP/FRT en protoplastos tanto de maíz como de arroz indica que la estructura de lugar de FRT, y la cantidad de la proteína FLP presente, afecta la actividad de escisión. En general, los lugares de FRT incompleta llevan a mayor acumulación de productos de escisión que los lugares FRT de total longitud completa. Los sistemas de recombinación específicos a lugares pueden catalizar las reacciones tanto entre como intermoleculares en protoplastos de maíz, indicando que el sistema puede usarse para reacciones de escisión de ADN así como integración. La reacción de recombinación es reversible y esta capacidad de reversión puede comprometer la eficiencia de la reacción en cada dirección. Alterando la estructura de las secuencias de recombinación específicas a lugares es una aproximación al remedio de esta situación. La secuencia de recombinación específica a lugares puede ser mutada en una manera que el producto de la reacción de recombinación no es más reconocida como un sustrato para la reacción reversa, estabilizando así el evento de integración o escisión.

E. Vectores

Unidades de Expresión para Expresar ADN Exógeno en una Planta

Como se mencionó arriba, varias modalidades de la presente invención emplean unidades de expresión (o vectores o sistemas de expresión) para expresar una secuencia de ácido nucleico suministrada en forma exógena en una planta. Los métodos para generar unidades/sistemas/vectores de expresión para uso en plantas son bien conocidos en el arte y pueden adaptarse fácilmente para uso en la presente invención. Un artesano experto puede fácilmente usar cualquier apropiado sistema de planta/vector/expresión en los actuales métodos siguiendo los lineamientos aquí provistos.

Los elementos de control de expresión usados para regular la expresión de la proteína puede ser ya sea el elemento de control de expresión que se encuentra normalmente asociado con la secuencia de codificación (elemento homólogo de expresión) o puede ser un elemento heterólogo de control de expresión. Una variedad de elementos de control de expresión homólogos y heterólogos se conocen en el arte y pueden usarse fácilmente para hacer las unidades de expresión para uso en la presente invención. Las regiones de iniciación de transcripción, por ejemplo, pueden incluir cualquiera de las varias regiones de iniciación opinas, tales como octopina, manopina, nopalina y similares que se encuentran en los plásmidos Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Alternativamente, los promotores virales de plantas pueden usarse también, tales como los promotores de virus mosaicos de coliflor 35S para controlar la expresión de genes en una planta. Por último, los promotores de plantas tales como el promotor prolífero, específicos a frutas, promotor Ap3, promotores de choque de calor, promotores específicos a semillas, etc. Pueden también usarse. Los promotores más preferidos serán más activos en gametos machos o hembras.

Ya sea un promotor específico a gametos, un promotor constitutivo (tal como el promotor CaMV o Nos), un promotor específico a órganos (tal como el promotor del tomate E8) o un promotor inducible está típicamente ligado a la proteína o región de codificación contra sentido usando técnicas estándares conocidas en el arte. La unidad de expresión puede optimizarse adicionalmente empleando elementos suplementarios tales como terminadores de transcripción y/o elementos mejoradores.

Consecuentemente, para expresión en plantas, las unidades de expresión contendrán típicamente, en adición a la secuencia de proteínas, una región promotora de plantas, un lugar de iniciación de transcripción y una secuencia de terminación de transcripción. Los únicos lugares de restricción de enzimas en los extremos 5' y 3' de la unidad de expresión se incluyen típicamente para permitir la fácil inserción dentro de un vector preexistente.

En el constructor de promotor heterólogo/gen estructural o combinaciones contra sentido, el promotor está colocado preferiblemente alrededor de la misma distancia del lugar de inicio de transcripción heteróloga como lo es desde el lugar de inicio de la transcripción en su asentamiento natural. Como se conoce en el arte, sin embargo, alguna variación en esta distancia puede acomodarse sin pérdida de la función promotora.

En adición a una secuencia promotora, el casete de expresión puede contener también una región de terminación de transcripción corrientes abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficiente. La región de terminación puede obtenerse a partir del mismo gen como la secuencia promotora o puede obtenerse a partir de genes diferentes. Si la mRNA codificada por el gen estructural va a ser

procesada eficientemente, las secuencias de DNA que dirigen la poli adenilación del RNA se agregan también comúnmente a el constructor del vector. Las secuencias de poli adenilación incluyen, pero no están limitadas a la señal de sintasa octopina *Agrobacterium* (Gielen y otros, EMBO J 3:835-846 (1984)) o la señal de sintasa nopalina (Depicker y otros, Mol. y Appl. Genet. 1:561-573 (1982)).

La unidad de expresión resultante está ligada dentro o construida de otra forma para ser incluida en un vector que es apropiado para mayor transformación de plantas. El vector contendrá también típicamente un gen marcador de selección mediante el cual las células de plantas transformadas pueden identificarse en el cultivo. Usualmente, el gen marcador codificará la resistencia a antibióticos. Estos marcadores incluyen resistencia a G418, higromicina, bleomicina, canamicina, y gentamicina. Después de transformar las células de plantas, aquellas células que tiene el vector serán identificadas por su habilidad para crecer en un medio que contiene el antibiótico particular. Las secuencias de replicación, de origen bacterial o viral, también se incluyen generalmente para permitir que el vector a ser clonado en un huésped bacterial o fago, preferiblemente un amplio rango huésped de origen procariótico de replicación se incluye. Un marcador de selección para bacterias puede incluirse también para permitir la selección de células bacteriales que llevan el constructor deseada. Adecuados marcadores de selección procarióticos también incluyen resistencia a antibióticos tales como ampicilina, canamicina o tetraciclina.

Otras secuencias de ADN que codifican adicionales funciones pueden también estar presentes en el vector, como se conoce en el arte. Por ejemplo, en el caso de transformaciones de *Agrobacterium*, las

secuencias de T-ADN también estarán incluidas para subsiguiente transferencia a cromosomas de plantas.

Las secuencias de la presente invención pueden también fusionarse a varias otras moléculas de ácido nucleico tales como los Tags de Secuencia Expresada (ESTs), epítopes o marcadores fluorescentes de proteína.

Los ESTs son fragmentos de genes, típicamente 300 a 400 nucleótidos en longitud, secuenciados desde el extremo 3' o 5' de los clones complementarios de ADN (cADN). Casi 30 000 *Arabidopsis thaliana* ESTs se han producido por un consorcio Francés y Americano (Delseny y otros, FEBS Lett. 405(2):129-132 (1997); Base de Datos de *Arabidopsis thaliana*, <http://genoma.www.stanford.edu/Arabidopsis>). Para una discusión del análisis de los patrones de expresión de genes derivados de grandes bases de datos EST, ver, por ejemplo, M. R. Fannon, TIBTECH 14:294-298 (1996).

Las sondas de proteína fluorescentes biológicamente compatibles, particularmente, la proteína fluorescente verde de auto-ensamble (GFP) de la *Aequorea victoria* del pez dorado, han revolucionado la investigación en células, biología molecular y de desarrollo debido a que permiten la visualización de eventos bioquímicos en las células vivas (Murphy y otros, Curr. Biol. 7(11):870-876 (1997); Grebenok y otros, Plant J. 11(3):573-586 (1997); Pang y otros, Plant Physiol. 112(3) (1996); Chiu y otros, Curr. Biol. 6(3):325-330 (1996); Plautz y otros, Gen 173(1):83-87 (1996); Sheen y otros, Plant J. 8(5):777-784 (1995)).

La muta-génesis dirigida a lugar se ha usado para desarrollar una versión más soluble del GFP de codón modificado GFP (smGFP).

Cuando se introduce en *Arabidopsis*, mayor fluorescencia se observó cuando se comparó al GFP de codon modificado, implicando que el smGFP es 'más brillante' debido a que más de él está presente en una forma soluble y funcional (Davis y otros, *Plant Mol. Biol.* 36(4):521-528 (1998)). Fusionando genes que codifican GFP y beta-glucuronidasa (GUS), los investigadores pudieron crear una serie de construcciones de reporte de dos funciones que son optimizados para uso en sistemas de transiente y expresión estable en plantas, incluyendo *Arabidopsis* (Quaedvlieg y otros *Plant Mol. Biol.* 37(4):715-727 (1998)).

Berger y otros, (*Dev. Biol.* 194(2):226-234 (1998)) reporte de aislamiento de una línea de marcador GFP para células epidérmicas hipocotilo de *Arabidopsis*. Las proteínas de fusión de GFP se han usado para localizar y caracterizar un número de genes de *Arabidopsis*, incluyendo pirofosfato de geranilgeranil (GGPP) (Zhu y otros, *Plant Mol. Biol.* 35(3):331-341 (1997)).

Genes No habilitadores

Un ejemplo de una efectiva modificación no habilitadora puede ser un único retiro de nucleótidos que ocurre al comienzo de un gen que puede producir una estructura de lectura de traslación. Dicha estructura puede inhabilitar el gen, dado como resultado un producto de gen no expresable e interrumpiendo consecuentemente la producción de proteína funcional mediante ese gen. Si el gen no modificado codifica una proteasa, por ejemplo, la producción de proteasa por el gen puede interrumpirse si las regiones regulatorias o las regiones de codificación del gen de proteasa son interrumpidas.

Adicionalmente a inhabilitar genes retirando nucleótidos, causando una estructura de lectura de transición, la inhabilitación de las modificaciones puede también ser posible mediante otras técnicas que incluyen inserciones, sustituciones, inversiones o transversiones de nucleótidos dentro del gen de ANA que puede prevenir efectivamente la formación de la proteína codificada por el ADN.

Está también dentro de las capacidades de una persona experta en el arte inhabilitar genes mediante el uso de métodos menos específicos. Ejemplos de métodos menos específicos pueden ser el uso de mutágenos químicos tales como hidroxilamina o nitrosoguanidina o el uso de radiación de mutágenos tales como radiación gamma o radiación ultravioleta a genes mutados al azar. Dichas cadenas mutadas pueden, por suerte, contener genes inhabilitados en forma tal que los genes no fueron más capaces de producir proteínas funcionales para uno o más de los dominios. La presencia de los deseados genes inhabilitados puede detectarse mediante técnicas de tamiz de rutina. Para guía adicional, ver la Patente U.S. No. 5,759,538.

Vectores de Codificación Contra Sentido

Los métodos para inhibir la expresión en plantas usando construcciones de contra sentido, incluyendo la generación de secuencias contra sentido en el sitio se describen, por ejemplo, en las Patentes U.S. 5,107,065; 5,254,800; 5,356,799; 5,728,926; y 6,184,439. las últimas dos patentes que se titulan: "Sistemas de genes contra sentido de control de polinización para la producción de semillas híbridas".

Otros métodos que pueden usarse para inhibir la expresión de un gen endógeno en una planta puede usarse también en los presentes

métodos. Por ejemplo, la formación de una hélice triple en una región esencial de un gen dúplex sirve a este propósito. El código triple, que permite el diseño del participante de cadena única apropiada también se conoce en el arte. (Ver H. E. Moser, y otros, Ciencia 238:645-650 (1987) y M. Cooney, y otros, Ciencia 241:456-459 (1988)). Regiones en las secuencias de control que contienen alargamientos de bases de purina son objetivos particularmente atractivos. La formación de hélice triple conjuntamente con foto reticulación se describe, por ejemplo, en D. Praseuth, y otros, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:1,349-1,353 (1988).

II. Transformación

A. Transformación de Plantas

Para introducir un gen deseado o serie de genes mediante métodos convencionales se requiere un cruce sexual entre dos líneas, y entonces repetir el cruce en retroceso entre desarrollo híbrido y uno de los padres hasta que se obtiene una planta con las deseadas características. Este proceso, sin embargo, está restringido a plantas que pueden hibridizar sexualmente, y genes en adición al gen deseado se transformará.

Las técnicas de ADN recombinante permiten a los investigadores de plantas sobrepasar estas limitaciones permitiendo a los genetistas de plantas identificar y clonar genes específicos para rasgos deseados, tales como resistencia a una peste de insectos, e introducir estos genes en variedades de plantas ya útiles. Una vez que los genes foráneos se han introducido dentro de una planta, esa planta puede entonces usarse en esquemas convencionales de cultivo de plantas (por ejemplo, cultivo de pedigrí, esquemas de cultivo descendente de semilla única, selección

recíproca recurrente) para producir progenie que también contiene el gen de interés.

Los genes pueden introducirse en una forma dirigida a lugar usando recombinación homóloga. La recombinación homóloga permite modificaciones específicas a lugar en genes endógenos y consecuentemente mutaciones inherentes o adquiridas pueden corregirse, y/o novedosas alteraciones pueden hacerse por ingeniería en el genoma.

La recombinación homóloga y la integración dirigida a lugares en plantas se discuten en las Patentes U.S. Nos. 5,451,513; 5,501,967 y 5,527,695.

B. Métodos de Transformación

Los métodos de producir plantas transgénicas son bien conocidas para aquellos expertos en el arte. Las plantas transgénicas pueden ahora producirse mediante una variedad de diferentes métodos de transformación que incluyen, pero no están limitados a, electroporación; micro inyección; micro bombardeo de proyectiles, también conocido como aceleración de partículas o bombardeo balístico; transformación mediada por virus; y transformación mediada por agro bacterias (ver, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5,405,765; 5,472,869; 5,538,877; 5,538,880; 5,550,318; 5,641,664; 5,736,369 y 5,736,369; Watson y otros, ADN recombinante, Libros Científicos Americanos (1992); Hinchey y otros, Bio/Tech. 6:915-922 (1988); McCabe y otros, Bio/Tech. 6:923-926 (1988); Toriyama y otros, Bio/Tech. 6:1072-1074 (1988); Fromm y otros, Bio/Tech. 8:833-839 (1990); Mullins y otros, Bio/Tech. 8:833-839 (1990); y, Raineri y otros, Bio/Tech. 8:33-38 (1990)).

Las plantas de alfalfa transgénicas se han producido mediante muchos de estos métodos que incluyen, pero no están limitados a, transformación mediada de agro bacterias (Wang y otros, *Diario Australiano de Fisiología de Plantas* 23(3):265-270 (1996); Hoffman y otros, *Interacciones Moleculares de Plantas-Microbios* 10(3):307-315 (1997); Trieu y otros, *Reportes de Células de planta* 16:6-11 (1996)) y aceleración de partículas (Patente U.S. No. 5,324,646).

La transformación también se ha llevado a cabo exitosamente en trébol usando transformación mediada por agro bacterias (Voisey y otros, *Ciencia y Tecnología de Control Biológico* 4(4):475-481 (1994); Quesbenberry y otros, *Ciencia de las cosechas* 36(4):1045-1048(1996); Khan y otros, *Fisiología de Plantas* 105(1):81-88 (1994); Voisey y otros, *Reportes de Células de planta* 13(6):309-314 (1994)).

La transformación genética se ha reportado también en numerosas especies de forraje y pastos (Conger B.V. *Genetic Transformación de Pastos de Forraje en Tecnologías Molecular y Celular para la Mejora de Forraje*, CSSA Especial Publicación No. 26, Sociedad de América de la Ciencia de las Cosechas, Inc. E.C. Brummer y otros Eds. 1998, páginas 49-58). Estas incluyen pasto de orquídea (*Dactylis glomerata* L.), cañuela alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) cañuela roja (*Festuca rubra* L.), cañuela de pradera (*Festuca pratensis* Huds.) ballico perenne (*Lolium perenne* L.) agróstide crepado (*Agrostis palustris* Huds.) y agróstide (*Agrostis alba* L.).

Exitosa transferencia de genes en dichos forrajes y céspedes se ha llevado a cabo mediante toma directa de ADN por protoplastos y mediante bombardeo de células o tejidos con micro proyectiles revestidos de ADN. En ambos casos, la transferencia está regida por la total

regeneración de la planta. Mucho del trabajo se ha centrado en protocolos de desarrollo y mejoras para la transformación y han usado el gen de reporte uidA codificando para -glucouronidasa (GUS) y la barrera de marcador de selección que confiere tolerancia a herbicidas basados en fosfinotricina. La prueba de la transformación se ha provisto mediante técnicas de la reacción de cadena de polimeraza (PCR), análisis de hibridización norteña de RNA transcrita, análisis de mancha del este de proteína soluble (producto de gen), e hibridización sureña de mancha de total ADN genómico.

III. Hemizigosidad

Una planta transgénica formada usando métodos de transformación de *Agrobacterium* contiene típicamente un único gen en un cromosoma, aunque múltiples copias son posibles. Dichas plantas transgénicas pueden referirse como hemizigosas para el gen agregado. Un nombre más preciso para dicha planta es un segregante independiente, debido a que cada planta transformada representa un único evento de integración T-ADN (Patente U.S. No. 6,156,953). Un foco de transgene se caracteriza generalmente por la presencia y/o ausencia del transgene. Un genotipo heterozigoso donde una allele corresponde a la ausencia del transgene se designa también hemizigoso (Patente U.S. No. 6,008,437).

Asumiendo hemizigosidad normal, la auto-reproducción resultará en máxima segregación genotípica en la primera generación recombinante auto-reproducida, también conocida como la generación R1 o R₁. La generación R1 se produce auto-reproducción de la línea recombinante original, también conocida como la generación R0 o R₀. Debido a que cada inserto actúa como una allele dominante, en ausencia de enlace y asumiendo que únicamente un inserto hemizigoso se requiere

para expresión de tolerancia, un inserto puede segregar 3:1, dos insertos, 15:1, tres insertos, 63:1, etc. Consecuentemente, relativamente pocas plantas R1 necesitan crecer para encontrar por lo menos un fenotipo de resistencia (Patentes U.S. Nos. 5,436,175 y 5,776,760).

Como se mencionó arriba, la auto-polinización de la planta regenerada transgénica hemizigosa puede producir progenie equivalente a un F2 donde aproximadamente 25% pueden ser plantas homocigotas transgénicas. La auto-polinización y cruce de prueba de la progenie F2 a plantas de control no transformadas pueden usarse para identificar las plantas homocigotas transgénicas y mantener la línea. Si la progenie inicialmente obtenida para una planta regenerada fuera de polinización cruzada, entonces la identificación de las plantas homocigotas transgénicas requerirá una generación adicional de auto-polinización (Patente U.S. 5,545,545).

IV. Semi-Esterilidad y Filtro de Esterilidad Genética

A. El Rasgo de Esterilidad Gametofítica (GST)

El GST puede estar compuesto de dos o tres elementos: un promotor específico a sexo, un gen suicida y, opcionalmente, una región que codifica un transposon y/o transposasa. Normalmente, el constructor GST termina en un elemento terminador de transcripción. La inclusión de un transposon o una fuente de transposasa es específica a la aplicación de selección para transposiciones dispersas y no se usa necesariamente para el propósito de eliminación de la transmisión de transgenes.

Los promotores específicos a sexo pueden incluir pero no están limitados a: promotores específicos a polen del maíz, arroz, tomate,

tabaco, *Arabidopsis* y *Brassica*. Varios otros ejemplos pueden encontrarse en el GenBank. El promotor debe ser específico a un sexo (machos o hembras) y específicamente dirigir la expresión del gen después de meiosis I cuando los cromosomas homólogos se ha separado en células diferentes.

El gen suicida se usa para matar productos indeseados de meiosis. Los genes suicidas incluyen pero no están limitados a: barnasa, semilla de borla 2 y el gen A de toxina de differia. Dos alternativas para usar un gen suicida incluyen 1) usar tecnología contra-sentido de RNA para inhibir la expresión de genes esenciales para la viabilidad del polen o el huevo; o 2) mutaciones que son incapaces de transmisión a través de uno de los sexos, tales como retiros que no son transmitidos por polen. Ambas alternativas pueden usarse para lograr semi-esterilidad.

B. Semi-Esterilidad y Filtro de Esterilidad Genética

El términos "semi-esterilidad" y "filtro de esterilidad genética" se usan por los inventores para traspasar la idea de que puesto que la expresión gen suicida está confinada a post-meiosis I, únicamente el 50% de gametos se eliminará cuando el lugar GST es hemizigoso y se segrega normalmente en meiosis. Esto es debido al hecho de que cuando el lugar GST está presente en el genoma en una única copia (condición hemizigosa), el gen suicida se transmitirá aproximadamente a una mitad de los productos de meiosis, dando como resultado un 50% de velocidad de esterilidad. El polen inherente al GST no sobrevivirá si un promotor específico a polen está enlazado operativamente al gen suicida.

La producción de 50% de polen viable es necesaria para la recuperación de las transposiciones dispersan y/o para prevenir la

162
162

transmisión de transgene sin un importante efecto en la fertilidad del macho.

C. Semi-esterilidad gametofítica

La presente invención describe el uso de una tecnología que utiliza "semi-esterilidad" gametofítica, tal como semi-esterilidad del polen, para generar un "filtro de esterilidad genética" que elimina gametos inherentes a un específico complejo de transgene. La incorporación de un promotor específico a polen dentro del GST previene la transmisión de transgenes enlazados al GST en polen inherente a este complejo de transgene.

Este complejo de transgene puede también contener un lugar de lanzamiento para un elemento transposable y/o gen de transposasa. En este caso, la eliminación del complejo de transgene, conjuntamente con el lugar de donante de transposon y/o transposasa, tiene el efecto neto delimitar las transposiciones cercanas mientras enriquece los eventos de transposición que han recombinado con el complejo de transgene o que están dispersos (ya no enlazados al GST) a través de un genoma. Esta metodología supera varias limitaciones corrientes de las estrategias de mutagénesis del transposon que favorece en gran medida las localizadas con respecto a las transposiciones dispersas. La invención mejora en gran medida el uso corriente de marcadores negativos de selección para lograr la dispersión del transposon (Sundaresan, V., y otros, (1995) Genes Dev. 9/14:1797-810; Tissier, A.F. y otros, (1999) La Célula de planta Vol. 11:1841-1852). Más aún, el uso del filtro de esterilidad genética para eliminar la transmisión de la fuente de transposasa estabiliza los elementos recién transposados en progenie, eliminando así los eventos de transposición somática o secundaria que obstruyen la identificación de la mutación.

La naturaleza del rasgo de semi-esterilidad y su transposon asociado y/o transposasa, puede diferir en los detalles dependiendo de la escogencia de los genes suicidas, promotores, sistemas de transposon, y especies. Se enfatiza, sin embargo, que la misma tecnología básica de la semi-esterilidad puede usarse para recuperar las transposiciones en muchas plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, en dichas especies tales como maíz, arroz, soya, trigo, avenas, barley, y en sistemas no de plantas, tales como animales y hongos, que pueden propagarse sexualmente. Adicionalmente, una estrategia alternativa para la eliminación de micro-esporas es eliminar la transmisión de hembras del complejo de transgene por ingeniería de un rasgo suicida de mega espora.

El rasgo de semi-esterilidad se usa para eliminar los productos de meiosis (gametos) que llevan una región cromosómica particular, tal como un lugar de lanzamiento de transposon y/o den de transposasa. Este "filtro de esterilidad genética" se usa para eliminar transmisión de machos y hembras de un complejo de transgene. Este proceso de eliminación tiene el efecto neto de enriquecer los elementos transpuestos no enlazados (dispersos) o elementos que recombinan a partir del sitio de lanzamiento; esto también se usa para eliminar simultáneamente la transmisión de otros genes, tales como un gen de transposasa, estabilizando así las transposiciones en progenie. Para lograr la semi-esterilidad, un número de métodos preferidos se contempla para la presente invención. Un método se relaciona con la dirección de la expresión específica a micro espora de un gen suicida para matar micro esporas indeseadas. Este método se logra empleando un promotor específico, tal como un promotor específico a polen, fusionado a un apropiado gen suicida, matando así únicamente los productos de meiosis que son inherentes a la fusión de genes. Para un transgene de única copia en condición hemizigosa, esto representa el 50% de los gametos. Debido

a que el polen se produce en gran exceso, la reducción de la fertilidad del polen en 50% no tiene importante consecuencia en la subsiguiente producción de semillas.

El aspecto de la presente invención que se relaciona a la generación de semi-esterilidad difiere de los métodos previos demandados para lograr completa esterilidad de machos en la producción de semillas híbridas que son conocidos en el arte. En estos métodos, la demanda ha sido lograr la completa esterilidad de machos para facilitar la producción comercial de la semilla híbrida. Esto usualmente involucra la expresión del gen suicida en el esporofito o en todas las micro esporas. Por ejemplo, la expresión de barnasa en células tapetal da como resultado la completa esterilidad de machos (Beals, T.P. y otros (1997) La Célula de Planta Vol. 9:1527-45). En la producción de semillas híbridas, la semi-esterilidad del polen puede ser insuficiente para lograr el resultado deseado, es decir, el cruce del padre (hembra) estéril (macho). En casos donde un gen suicida específico a micro espora y sus elementos asociados están presentes en el genoma en una única copia (en condición hemizigosa), el gen suicida se transmitirá aproximadamente a la mitad de los productos de meiosis, dando como resultado un promedio de 50% de semi-esterilidad, una rata de producción viable de polen que no es aceptable comercialmente para la producción de semillas híbridas. Para la presente invención, la producción de 50% e polen viable es necesaria e importante para recuperar las transposiciones dispersas y/o para prevenir la transmisión de transposasa. Consecuentemente, el rasgo de esterilidad gametofítico se usa como un filtro para eliminar genomas indeseables permitiendo al mismo tiempo que otros genomas (no transgénicos y genomas que contienen elementos transpuestos sin el elemento donante y/o gen de transposasa presente) a ser transmitido. En una modalidad, la presente invención hace uso de este "filtro genético de esterilidad" para

eliminar un complejo de transgene que contiene un lugar de lanzamiento de transposon y/o fuente de transposasa.

V. Métodos de Regeneración

Poblaciones Polinizadas Abiertas. La mejora de las poblaciones polinizadas abiertas de dichas cosechas como centeno, muchos maíces y cañas de azúcar, pastos de hierba, legumbres tales como alfalfa y trébol, y cosechas de árboles tropicales tales como cacao, maní, palma de aceite y algún caucho, depende esencialmente del cambio de frecuencias de genes hacia la fijación de allele favorables mientras se mantiene un alto grado (pero lejos del máximo) de heterozigosidad. La uniformidad en dichas poblaciones es imposible y difícil de tipo en una variedad polinizada abierta es una característica estadística de la población como un todo, no una característica de plantas individuales. Consecuentemente, la heterogeneidad de las poblaciones polinizadas abiertas con la homogeneidad (o virtualmente) de líneas no regeneradas, clones e híbridos.

Los métodos de mejoramiento de la población caen naturalmente en dos grupos, aquellos basados en la selección puramente fenotípica, normalmente llamada selección de masa, y aquellas basadas en la selección con prueba de progenie. El mejoramiento de inter-población utiliza el concepto de las poblaciones de regeneración abierta; permitiendo que los genes fluyan de una población a otra. Las plantas en una población (cultivos, cadena, ecotipo, o cualquier fuente de germoplasma) se cruzan ya sea naturalmente (por ejemplo, por el viento) o manualmente o por las abejas (comúnmente *Apis mellifera* L. o *Megachile rotundata* F.) con plantas de otras poblaciones. La selección

se aplica para mejorar una (o algunas veces ambas) población(es) aislando plantas con deseables rasgos de ambas fuentes.

Hay básicamente dos métodos principales de mejora en población polinizada abierta. Primero, hay una situación donde una población se cambia en masa mediante un procedimiento de selección escogido. El resultado es una mejorada población que es propagable indefinidamente mediante emparejamiento al azar dentro de si misma en aislamiento. Segundo, la variedad sintética logra el mismo resultado final que la mejora de la población pero no es ella misma propagable como tal; tiene que reconstruirse a partir de líneas o clones padres. Estos procedimientos de regeneración de plantas para mejorar las poblaciones polinizadas abiertas son bien conocidos para aquellos expertos en el arte y revisiones comprehensivas de procedimientos de regeneración usados rutinariamente para mejorar plantas de polinización cruzada se proporcionan en numerosos textos y artículos, incluyendo: Allard, Principios de Regeneración de Plantas, John Wiley & Sons, Inc. (1960); Simmonds, Principios de Mejoramiento de Cosechas, Longman Group Limited (1979); Hallauer y Miranda, Genética Cuantitativa en la Regeneración del Maíz, Iowa State University Press (1981); y, Jensen, Metodología de la Regeneración de Plantas, John Wiley & Sons, Inc. (1988).

Selección de Masa. En la selección de masa, se escogen deseables plantas individuales, se cosechan, y las semillas se componen sin prueba de progenie para producir la siguiente generación. Puesto que la selección se basa únicamente en la madre o pariente materno, y no hay control sobre la polinización, la selección de masa aumenta con respecto a una forma de emparejamiento al azar con selección. Como se estableció

arriba, el propósito de la selección de masa es incrementar la proporción de genotipos superiores en la población.

Sintéticos. Una variedad sintética se produce cruzando entre ellos un número de genotipos seleccionados por su buena habilidad de combinación en todas las posibles combinaciones híbridas, con subsecuente mantenimiento de la variedad para polinización abierta. Donde los padres son (más o menos reconstruidos) líneas de propagación de semillas, como en algunas cañas de azúcar y granos (Vicia) o clones, como en pastos de hierba, tréboles y alfalfa, no hace diferencia en principio. Los padres son seleccionados en habilidad de combinación, algunas veces mediante cruces de prueba o cruces superiores, más generalmente mediante múltiples cruces. Las líneas de semillas de parientes pueden cruzarse deliberadamente (por ejemplo, mediante auto-reproducción o cruce inferior). Sin embargo, aún si los padres no son cruzados deliberadamente, la selección dentro de líneas durante el mantenimiento de la línea asegurará que ocurre algo de regeneración. Los padres clonados permanecerán, por supuesto, sin cambios, y altamente heterocigotos.

Si un sintético puede ir directamente del punto de producción de semillas padre al granjero o debe primero sufrir uno o dos ciclos de multiplicación depende de la producción de semillas y la escala de demanda de la semilla. En la práctica, pastos y tréboles se multiplican generalmente una o dos veces y son así retirados considerablemente del sintético original.

Aunque a veces se usa la selección de masa, la prueba de progeme se prefiere generalmente para múltiples cruces debido a su simplicidad

168
168

operacional y obvia relevancia para el objetivo, nominalmente la explotación de la habilidad de combinación general en un sintético.

El número de líneas padres o clones que entran a un sintético varia ampliamente. En la práctica, los números de líneas parientes varían dentro del rango de desde 10 hasta varios cientos, siendo el promedio 100 a 200. Sintéticos de base amplia formados a partir de 100 o más clones pueden esperarse como más estables durante la multiplicación de semillas que los sintéticos de base estrecha.

Híbridos. Un híbrido es una planta individual que resulta de un cruce padres de diferentes genotipos. Los híbridos comerciales se usan ahora extensivamente en muchas cosechas, incluyendo maíz, sorgo, caña de azúcar, girasol y brócoli. Los híbridos pueden formarse en un número de formas diferentes, incluyendo mediante el cruce de dos padres directamente (híbridos de cruce único), mediante el cruce de un híbrido de único cruce con otro padre (híbridos de tres vías o de triple cruce) o mediante el cruce de dos diferentes híbridos (híbridos de cuatro vías o de doble cruce).

Estrictamente hablando, la mayoría de individuos en una regeneración exterior de población (es decir, de polinización abierta) son híbridos, pero el término se reserva usualmente para los casos donde los padres son individuos cuyos genomas son suficientemente distintivos para ser reconocidos como diferentes especies o sub-especies. Los híbridos pueden ser fértiles o estériles dependiendo de las diferencias cualitativas y/o cuantitativas en los genomas de los dos padres. Heterosis, o híbrido vigor, se asocia usualmente con incrementada heterozigosidad que resulta en incrementado vigor de crecimiento, supervivencia, y fertilidad de los híbridos en comparación con las líneas de padres que se

usaron para formar el híbrido. La heterosis máxima se logra usualmente cruzando dos líneas altamente desarrolladas, genéticamente diferentes.

La producción de híbridos es una industria bien desarrollada, que involucra la producción aislada de tanto las líneas de padres como los híbridos que resulta del cruce de esas líneas. Para una discusión detallada del proceso de producción de híbridos, ver, por ejemplo, Wright, *Producción Comercial de Semillas de Híbridos* 8:161-176, en Hibridización de Plantas, supra.

VI. Transposones y Elementos Transposables

Los transposones son elementos genéticos capaces de transposición (movimiento) desde un lugar cromosómico donante hacia un lugar objetivo en el mismo cromosoma o diferente cromosoma. Los transposones causan mutaciones mediante la inserción dentro de secuencias de codificación, intrones, y promotores, a menudo eliminando completamente la actividad del gen objetivo. Las mutaciones causadas por los transposones pueden a menudo desestabilizarse mediante subsecuente escisión del transposon del gen. Una o más proteínas, a las cuales se hace referencia colectivamente como "transposasa", se requieren para la escisión e integración del transposon. Los transposones que codifican su propia fuente de transposasa son referidos como elementos autónomos. El suministro de transposasa en trans puede transponer los transposones que no codifican transposasa pero contienen las secuencias terminales, usualmente repeticiones invertidas, requeridas para la transposición (elementos no autónomos).

A. Elementos Ds

En una de las modalidades preferidas, un elemento Ds se contempla tal que contiene las secuencias terminales requeridas para la transposición (Coupland, G., y otros, (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9385-8; Chatterjee, S. y otros, (1995) Mol Gen Genet. 249:281-8), un promotor mínimo (promotor -47 CaMV 35S) fusionado al gen de reporte GUS para detección de mejora; en la orientación opuesta, un lugar aceptor de lonja fusionado a un gen mejorado fluorescente, GFP de doble espectro (Haseloff, J., y otros, (1997) Proc Natl Acad Sci USA. 94:2122-7; Haseloff, J., y otros, (1999) Métodos Mol Biol. 122:241-59; Haseloff, J. (1999) Métodos Cell Biol. 58:139-51) para propósitos de atrapar genes. Este elemento Ds puede usarse para tamizar las trampas mejoradas en una orientación de inserción o trampas de genes en la otra orientación, con respecto a la transcripción del gen objetivo. Una segunda modalidad que usa Ds sustituye un activador de transcripción en un extremo del elemento Ds con el fin de generar ganancia de mutaciones de función. Ambos elementos contienen un lugar lox P para recombinación específica a lugar (Osborne, B.L., y otros, (1995) 7:687-701; Medberry, S.L., y otros, (1995) Ácido nucleicos Res. 23:485-90; Qin, M., y otros, (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:1706-10) y the barrera gene Thompson, C.J., y otros, (1986) EMBO J. 6:2519-23) para herbicida (Finale®) para cultivo de tejido y selección de suelo. El Finale® es la marca registrada de un herbicida de glufosinato.

B. Utilidad del Transposon e Inserción de Mutaciones en Plantas

Los transposones tienen gran utilidad en análisis genético y análisis genómico funcional de genomas de bacterias, hongos, plantas y animales. En plantas, transposones elaborados por ingeniería genética se han introducido exitosamente en varias especies (para revisión ver Sundaresan, V, (1996) Trends Plant Sci. Vol. 1:184-190) que incluyen

124
171

arroz (Izawa, T. y otros, (1997) *Plant Mol Biol* Vol. 35/1-2:219-29), tabaco, *Arabidopsis*, lechuga y varias otras. Varios investigadores han advertido ingeniosos métodos para mejorar la eficiencia de eventos de recuperación de transposición, incluyendo métodos para selecciones positivas para transposición (Fedoroff, N.V. y otros, (1993) *Plant J.* Vol.:3:273-289; Honma, M. A. y otros, (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 90/13:6242-6), selección para elementos no enlazados, (Tissier y otros, (1999) *La Célula de planta* Vol. 11:1841-1852; W. R.; Sundaresan, y otros, (1995) *Genes Dev.* 9/14:1797-810), lugares dispersos de lanzamiento a través de un genoma (Cooley, M. B. y otros, (1996) *Mol Gen Genet* Vol. 252/1-2:184-94, Knapp, S. y otros, (1994) *Mol Gen Genet* Vol. 243/6:666-73; Osborne, B. I. y otros, (1991) *Genetics* Vol. 129/3:833-44; Takken, F. L. y otros, (1998) *Plant J* Vol. 14/4:401-11, Thomas, C. M, y otros, (1994) *Mol Gen Genet* Vol. 242/5:573-85; van der Biezen, E. A. y otros, 1996 *Mol Gen Genet* Vol. 251/3:267-80) y adición de características en elementos tales como trampas de genes y mejoradores (para revisión ver Sharknes, W.C., (1990) *Biotechnología* 8:827-831; W. R.; Sundaresan, y otros, (1995) *Genes Dev* 9/14:1797-810) y activación de transcripción (Fritze, K. y otros (1995) *Métodos Mol Biol* Vol. 44:281-94; Kakimoto, T., (1996) *Science* Vol. 274/5289:982-5; Kardailsky, I.; y otros, (1999) *Science* Vol. 286/5446:1962-5).

Aún dado el enorme progreso en la utilidad de transposones, tienen aún limitaciones para análisis genómico funcional. Las transposiciones son a menudo entre-cromosómicas, a menudo dentro de una corta distancia física entre lugares de donante objetivo (Moreno, M.A y otros, (1992) *Genetics* Vol. 131:939-956; Athma, P. y otros, (1992) *Genetics* Vol. 131:199-209). Esta limitación significa que la mayoría de las nuevas inserciones ocurren en regiones que rodean el lugar donante (lugar de

lanzamiento) con varios pocos elementos encontrados dispersos al azar a través del genoma. En segundo lugar, el proceso de transposición no se controla usualmente llevando en gran medida a inserciones somáticas, las cuales no son transmitidas a la progenie, y transposiciones cercanas desarrolladamente que pueden llevar a no concordancia en eventos transmitidos germinalmente. Esta inhabilidad para controlar las transposiciones somática y temporalmente puede resultar en un alto antecedente de las inserciones positivas falsas en genes de interés debido a la no correspondencia entre eventos de mutación somática y germinal.

C. Métodos Corrientes del Estado del Arte para Recuperar las Transposiciones Dispersas

Dos métodos se encuentran corrientemente disponibles para superar parcialmente la limitación de transposiciones no dispersas. Un método usa los primeros lugares de lanzamiento del transposon de dispersión a través de un genoma. Este método, sin embargo, requiere de un gran número de líneas transgénicas de inicio para lograr cubrimiento de genoma de amplio espectro. Un segundo método para dispersar eventos de transposición es emplear un(os) marcador(es) negativo(s) de selección, tales como *iaaH*, *pehA*, *R404*, o un gen de citosina deaminasa, para seleccionar contra el lugar donante que contiene el transposon y/o transposasa. La selección contra el elemento donante también selecciona contra transposiciones cercanas (enlazadas) que resulta en enriquecimiento para transposiciones no enlazadas. Las selecciones negativas se han usado en *Arabidopsis* para recuperar transposiciones no enlazadas *Ds* y *Spm* (W. R.; Sundaresan, y otros, (1995) *Genes Dev.* 9/14:1797-810; Tissier, A.F., y otros, (1999) *La Célula de planta Vol.* 11:1841-1852) y dos marcadores negativos de selección se basan en la conversión pro-herbicida (O'keefe, D.P. y otros, (1994) *Fisiología de*

Plantas Vol. 105:473-482; Dotson, S.B. y otros, (1996) The Plant Journal Vol. 10/2:383-392), un proceso que es teóricamente disponible para selecciones de suelo.

No obstante, el uso de marcadores de selección negativos impone serias limitaciones en la recuperación de grandes números de transposiciones independientes. Primero, varias de estos marcadores requieren del uso de basados en tejido-cultivo (W. R.; Sundaresan, y otros, (1995) Genes Dev. 9/14:1797-810; transposición (Fedoroff, N.V. y otros, (1993) Plant J. Vol.:3:273-289), un procedimiento de labor intensiva que agrega grandes costos y tiempo al proceso de recuperación de grandes números de transposiciones dispersas. Segundo, las selecciones negativas están basadas en la eliminación de progenie que lleva elementos o transposasa enlazados, o ambos, mediante químicos (Tissier, A.F., y otros, (1999) La Célula de planta Vol. 11:1841-1852; W. R.; Sundaresan, y otros, (1995) Genes Dev. 9/14:1797-810). La eliminación de progenie puede ser problemática cuando el número de semillas es limitado. Por ejemplo, en una planta tal como arroz (*Oryza sativa*), una especie predominantemente de auto-polinización, el cruce exterior es tedioso y consume tiempo, limita en gran medida el número de progenie que puede obtenerse fácilmente. Consecuentemente, si las velocidades de transposición son lentas y las transposiciones no enlazadas representan la minoría de los eventos de transposición, puede ser costoso e impráctico usar selecciones negativas para recuperar transposiciones dispersas. Por ejemplo, contando con una velocidad de 1 a 5% de transposición, 50% de segregación meiótica, y únicamente 30% de transposiciones no enlazadas, para recuperar 10 000 transposiciones mediante cruce exterior requerirá de un estimado de varios millones de plantas de progenie. Finalmente, el uso de agentes de selección negativos, tales como pro-herbicidas, puede tener un serio impacto

ambiental y ser costoso debido a las aplicaciones de químicos que pueden necesitarse para seleccionar grandes números de progenie que llevan transposiciones dispersas. Más aún, la mayoría de estos químicos no están aprobados para uso en campo.

VII. Transposasa

Transposasa Expresada Floralmente

Una adicional limitación asociada con el uso de transposones para muta-génesis, marcado de genes y análisis genómico funcional, es la falta de control de desarrollo y temporal sobre el proceso de transposición. En muchos casos la expresión del gen de transposasa, bajo el control de su propio promotor, o bajo el control de promotores constitutivos, ocurre durante el desarrollo vegetativo de la planta. La expresión vegetativa de una fuente de transposasa lleva a transposiciones somáticas. Estas transposiciones son transmitidas a la progenie (transposiciones germinales) únicamente cuando estos linajes de células somáticas producen más tarde mega-esporas o micro-esporas. Esto es problemático por dos razones. Una razón es que las transposiciones que ocurren durante el desarrollo vegetativo o reproductivo temprano puede propagarse por clonación y posteriormente transmitirse dentro de muchos gametos, dando como resultado en un gran número de elementos no independientes recuperados en la progenie. Esto es indeseable cuando grandes números de transposiciones independientes se necesitan para análisis genómico funcional o marcado de genes. Segundo, las transposiciones somáticas a menudo no incluyen linajes que dan lugar a gametos, tales como aquellos que ocurren en linajes epidérmicos o en estructuras vegetativas terminales. Estas transposiciones nunca se transmiten meióticamente y consecuentemente van no recuperadas en

progenie. Esto es problemático debido a que estos eventos somáticos pueden ser falsamente identificados en muestras de tejido de ADN como mutaciones, aún nunca se recuperan en progenie. Esto es especialmente problemático cuando los tamices de mutaciones son químicos de ejemplo basados en PCR (Tissier, A.F., y otros, (1999) *La Célula de Plantas* Vol. 11:1841-1852; McKinney, E.C., y otros, (1995) *Plant J.* Vol. 8:613-622; Krysan, P.J y otros, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93:8145-8150; Frey, M y otros, (1997) *Science* Vol. 277:696-699).

En una modalidad adicional de la presente invención, para minimizar el problema de transposiciones somáticas, un gen de transposasa se coloca bajo el control de un promotor específico floral que dirige expresión de genes en linajes sub-epidérmicos de la flor que lleva a la producción de micro-esporas y mega-esporas. Dichos promotores incluyen aquellos encontrados en genes tales como *agamosa*, *apetala1*, *apetala2*, *apetala3*, *pistilato*, y sus homólogos encontrados en otras especies de plantas tales como maíz, y arroz. Por ejemplo, el promotor de *apetala3* dirige la expresión de un gen de reporte en células primordiales de petal y sepal de los meristemas de desarrollo floral. La expresión de transposasa bajo el control del promotor *ap3* da como resultado transposiciones que están confinadas al desarrollo floral y, cuando ocurren en linajes que llevan a micro-esporas, estos eventos serán transmitidos a la siguiente generación. El control de transposición mediante este método tiene dos efectos: 1) cae transposiciones somáticas; y 2) lleva a un gran número de transposiciones independientes cuando el polen es derivado de varios diferentes meristemas florales. Consecuentemente, el tejido somático puede mostrarse sin tener en cuenta las transposiciones somáticas o secundarias, y cada meristema floral se vuelve una fuente independiente de eventos de transposición.

VIII. Arroz – Un Sistema de Planta Modelo

A. Agricultura de Arroz en US y en el mundo

Aproximadamente la mitad de la población mundial deriva su toma calórica principalmente del arroz. Los niveles anuales de producción en el mundo son de por encima de 400 millones de toneladas métricas, que crecen en más de 200 millones de hectáreas (Anónimo (2 000) USDA Suministro de Agricultura Mundial y Estimativos de Demanda. USDA Servicio Agrícola de Mercadeo. Publicación WASDE-362).

Actualmente, los Estados Unidos producen 7,5 millones de toneladas métricas de arroz por año, plantado en 1,4 millones de hectáreas, dando como resultado \$1,7 billones de dólares en comercio (Anónimo (2 000) USDA Suministro de Agricultura Mundial y Estimativos de Demanda. USDA Servicio Agrícola de Mercadeo. Publicación WASDE-362). Más de dos tercios del arroz producido en este país se exporta a mercados, principalmente en Asia y América Latina, lo cual hace a los Estados Unidos el tercer más grande exportador en el mundo.

Aproximadamente 99% de las variedades de arroz que crecen corrientemente son el resultado de programas de regeneración pública, muchos que se originan en programas de regeneración auspiciados por centros de búsqueda internacional (<http://www.cgiar.org/irri/crucial.htm>) CGIAR tales como Instituto Internacional de Investigación de Arroz (IRRI) y el Centro Internacional para la Agricultura Tropical (CIAT). La mayoría de las variedades de arroz U.S. se desarrollan en los estados de Arkansas, Louisiana, Mississippi, Texas y California. La biotecnología agrícola se ha vuelto incrementadamente importante para desarrollar

modernas líneas de variedades de arroz; se espera que el desarrollo de la biotecnología ayude en gran medida a los granjeros de arroz U.S. para competir en este lugar de mercado global

B. Arroz como un Sistema Modelo para el Desarrollo de Monocotiledóneas

Los cereales incluyen las más importantes cosechas de alimentos en el mundo, y son considerados un taxón relativamente reciente, que ha evolucionado a partir de un ancestro común hace únicamente 65 millones de años (Martin, W., y otros, (1989) *Naturaleza* 339:46-48; Moore, G., y otros, (1995) *Trends Genet.* 11:81-82). Esta joven historia se refleja en un apreciable grado de conservación en la estructura del gen y orden aún cuando ha habido diferencias en el tamaño del genoma, número de cromosomas haploides, y variaciones en la composición de secuencia repetitiva (Moore, G., y otros, (1993) *Bio/tecnología*. 11:584-589). Por ejemplo, el genoma del maíz es 8 pliegues más grande que el del arroz (Ahn, S. y otros, (1993) *Genética* 90:7980-7984) y organizado en un número diferente de cromosomas, ya el análisis molecular comparativo ha mostrado que la sintenia extensiva puede identificarse entre muchos de sus genomas (Ahn, S. y otros, (1993) *Genética*. 90:7980-7984; Bennetzen, J.L. y otros, (1993) *Trends Genet.* 9:259-261).

El arroz es una planta modelo sobresaliente para las pastos de cereales. El arroz puede usarse para investigar los básicos resultados biológicos y aprender acerca de los rasgos agronómicos tales como obtenido, vigor híbrido, y resistencia a enfermedades de único y múltiples genes. Diferentes razas de arroz están adaptadas a una amplia variedad de situaciones ambientales, desde flujo tropical hasta tierra seca temperada, tal que es un modelo para respuestas adaptables a vida real.

178
178

El arroz tiene un tiempo de generación relativamente corto (90 a 120 días), que hace posible obtener tres o más generaciones por año. Una gran colección de mutaciones se ha descubierto y caracterizado en arroz.

El arroz transgénico se genera eficientemente por ya sea mediación de *Agrobacterium* (Hiei, Y., y otros, (1994) *Plant J.* 6:271-82; Hiei, Y., y otros, (1997) *Plant Molec Bio.* 35:205-218; Zhang, J., y otros, (1997) *Mol Biotechnol.* 8:223-31) o biolistic methods (Christou, P., y otros, (1991) *Biotechnología.* 9:957-962; Buchholz, W.G., y otros, (1998) *Métodos Mol Biol.* 81:383-96). En forma más importante, el arroz tiene un tamaño de genoma de aproximadamente 500 mega-bases (Mb) (Arumanagathan, K. y otros, (1991) *Plant Mol. Biol. Report.* 9:208-218), únicamente alrededor de 3 pliegues mayor que el del genoma de *Arabidopsis*, y considerados como secuenciadas alrededor de 2 004. Como un miembro del *Graminae* y una importante planta de cosecha, una riqueza de información fundamental acerca de importantes aspectos de la biología de plantas puede aprenderse a partir de los genómicos del arroz (McCouch, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1983-5; Wilson, W.A., y otros, (1999) *Genetics.* 153:453-73).

C. Genómicos de Arroz

El arroz es uno de los genomas de plantas más densamente representados (McCouch, S.R., y otros, (1997) *Plant Mol Biol.* 35:89-99; Panaud, O., y otros, (1996) *Mol Gen Genet.* 252:597-607). Los dos mapas mejor desarrollados de recombinaciones son aquellos desarrollados en Cornell () y en el proyecto de Genoma de Arroz (RGP) en Japón (), donde más de 3 000 marcadores RFLP y SSR se han incluido. El mapa físico a base de YAC de arroz cubre más

129
RR

de 64% del genoma y contiene 4 000 representaciones de ESTs (Ashikawa, I., y otros, (1999) Genoma. 42:330-7). Una librería PAC de 71 000 clones se ha representado con STSs y ESTs y los clones representados cubren aproximadamente 30% del genoma. Dos librerías BAC con 37 000 y 55 000 miembros se han secuenciado en extremo BAC e impreso y un mapa físico basado en BAC se ha construido (projects/rice/).

El genoma de arroz se estima que contiene 500 Mb (Arumanagathan, K. y otros, (1991) Plant Mol. Biol. Report. 9:208-218) y 340 000 genes. El proyecto Internacional de la Secuencia del Genoma de Arroz se formó en 1998 para obtener la secuencia completa del genoma de *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare. Diez países están colaborando en este esfuerzo. Corrientemente alrededor de 10 Mb se han sometido al GenBank.

D. Utilidad de un Programa de Genómicos Basado en Transposon

La principal justificación para el uso de transposones es su ventaja distintiva respecto a otros tipos de mutágenos para estudios genómicos funcionales en arroz. T-DNA y muta-génesis de retro-transposon tiene serias limitaciones. Corrientemente, ambos métodos requieren continua selección de cultivo de tejido y regeneración somática para recuperar inserciones, procesos que son ineficientes, consumen tiempo y provocan inducción de variación soma-clónica (Bao, P.H., y otros (1996) Transgenic Res. 5:97-103; Evans, D.A. (1989) Trends Genet. 5:46-50). Ambos agentes generan únicamente inserciones estables, las cuales limitan subsecuentemente la utilidad de cualquier allele mutante. Para complicar adicionalmente las materias, las inserciones T-DNA son a menudo grandes, arreglos complejos en tandem, que causan dificultades

con el análisis molecular de alelos mutantes (McKinney, E.C., y otros, (1995) *Plant J.* 8:613-622; Krysan, P.J., y otros, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8145-8150; Krysan, P.J., y otros, (1999) *Plant Cell* 11:2283-2290; Galbiati, y otros, (2000) *Genómicos Funcionales e Integrantes*, en prensa).

En varias instancias, simples mutaciones de pérdida de función, tal como alelos de T-ADN- o inducidas por retro-transposon, no proporcionarán suficiente información para derivar la función del gen. Por ejemplo, basado en estudios limitados a la fecha, muchas interrupciones de genes no producen un fenotipo fácilmente discernible (McKinney, E.C., y otros, (1995) *Plant J.* 8:613-622; Krysan, P.J., y otros, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8145-8150). Esto no implica falta de importancia de genes, sin embargo, puesto que varios de estos genes tendrán funciones parcialmente redundantes, sobrelapantes o específicas no detectables basadas en tamizado morfológico o de desarrollo de líneas mutantes. Información más detallada, tal como análisis de expresión y alelos adicionales, será necesaria.

Por otro lado, la mutagenesis de transposon de dos elementos, tal como el sistema Ac/Ds, puede generar interrupciones de genes estables mediante simple inserción. Elementos Ds producidos por ingeniería genética se han introducido exitosamente en varias especies de plantas (para revisión ver Martienssen, R.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2021-6; Sundaresan, V. (1996) *Trends Plant Sci.* 1:184-190) que incluye arroz (Izawa, T., y otros (1997) *Plant Mol Biol.* 35:219-29).

La utilidad de transposones para genómicos funcionales se ha mejorado en gran medida construyendo características en transposones sintéticos tales como agentes de mejora y trampas de genes (para revisión

ver Martienssen, R.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2021-6; Sharknes, W.C. (1990) *Biotechnologia* 8:827-831; Sundaresan, V., Springer, y otros, (1995) *Genes Dev.* 9:1797-810) y activación de transcripción (Fritze, K. y otros, (1995) *Métodos Mol Biol.* 44:281-94; Kakimoto, T. (1996) *Science.* 274:982-5; Kardailsky, L. y otros, (1999) *Science.* 286:1962-5). Incorporando dichas características, aún genes que son genéticamente redundantes pueden analizarse funcionalmente. Más importantemente, la habilidad de volver a movilizar un transposon crea la única oportunidad de generar eficientemente alleles derivadas y mutar eficientemente genes cercanos mediante propiedades de transposición localizada de estos elementos (Long, D., y otros, (1997) *Plant J.* 11:145-8; Jones, J.D.G., y otros, (1990) *Plant Cell.* 2:701-707; Osborne, B.I., y otros, (1991) *Genética.* 129:833-44). Iniciando con una a pocas líneas transgénicas bien caracterizadas y las apropiadas estrategias genéticas, una extensiva colección de transposiciones dispersas pueden generarse eficientemente sin la necesidad de subsecuente selección o regeneración de cultivo de tejido.

E. Ds de Dispersión al Azar a través del Genoma de Arroz

La presente invención incluye métodos que pueden aplicarse a genomas específicos, que incluyen pero no están limitados a, el genoma de arroz. El arroz es una planta modelo sobresaliente de planta para los pastos de cereal. Mediante la aplicación de los métodos de la presente invención al genoma de arroz, un objetivo es producir una colección extensiva de inserciones estables de Ds que son distribuidas a través del genoma de arroz. Para cumplir esta tarea, se han contemplado varias estrategias genéticas, con los objetivos principales de minimizar las transposiciones no independientes, las transposiciones dispersas Ds a través del genoma de arroz, y los elementos estabilizados transpuestos en

progenie. Una cadena específica contemplada para uso en los métodos de la presente invención es *Oryza sativa ssp. japonica* cv. *Nipponbare*, la cadena secuenciada por el IRGSP.

En una modalidad de la presente invención, el Ds dispersado al azar a través del genoma de arroz se contempla. Debido a que el Ds tiende a transposición localmente a menudo sobre cortas distancias genéticas, deben usarse estrategias genéticas para contar esta inclinación. En el pasado, esto se ha cumplido usando varios métodos que involucran básicamente seleccionar contra el lugar de lanzamiento de Ds en progenie (Sundaresan, V., y otros, (1995) *Genes Dev.* 9:1797-810; Tissier, A.F. y otros, (1999) *La Célula de planta* 11:1841-1852), o dispersando inicialmente varios lugares de lanzamiento a través de un genoma (Osborne, B.I., y otros, (1991) *Genetics.* 129:833-44; Cooley, M.B., y otros, (1996) *Mol Gen Genet.* 252:184-94; Knapp, S., y otros, (1994) *Mol Gen Genet.* 243:666-73; Takken, F.L., y otros, (1998) *Plant J.* 14:401-11; Thomas, C.M., y otros, (1994) *Mol Gen Genet.* 242:573-85; van der Biezen, E.A., y otros, (1996) *Mol Gen Genet.* 251:267-80).

Dos estrategias para dispersar transposiciones Ds se contemplan. El primer método está ampliamente dirigido a incluir un gen de rasgo suicida específico a polen en el lugar de lanzamiento de Ds para eliminar la transmisión del lugar de lanzamiento conjuntamente con cualesquiera elementos transpuestos enlazados. El rasgo suicida se trata por ingeniería mediante la incorporación de un promotor específico a polen accionando la expresión de un gen de muerte de células apropiado. Puesto que el constructor del lugar de lanzamiento es única copia y hemizigoso en plantas de lote, 50% de los productos de meiosis esconden T-ADN y sufren el suicidio genético; los productos remanentes producen polen viable. Aquellos Ds transpuestos que se han recombinado, ya sea entre- o

inter-cromosómicamente con el lugar de lanzamiento, son transmitidos por el polen. Estos elementos se detectan fácilmente en progenie incorporando un marcador herbicida (gene barrera) en el elemento Ds. El marcador herbicida sirve a un propósito dual – como un marcador de selección de tejido inicial-cultivo para transformación de arroz, y posteriormente como una selección de base de suelo para elementos Ds no enlazados que producen progenie.

El método suicida de polen tiene distintas ventajas respecto a previas estrategias para seleccionar transposiciones no enlazadas. Su principal ventaja es que el polen se produce en vasto exceso y la semi-esterilidad del polen es ambientalmente sonora y tendrá muy poco, si algún, impacto en la producción de semilla. En la progenie, 50% del cruce de prueba (o 75% cuando hay auto-reproducción) son desperdiciados por la selección negativa simplemente debido a que no separan el lugar de lanzamiento (y/o gen de transposasa, como se explica abajo). En arroz, cuando se requiere del cruce exterior para recuperar transposiciones, la producción de semillas puede ser un factor limitante. Más aún, los químicos, tales como los pro-herbicidas usados para selección negativa (Tissier, A.F., y otros, (1999) *La Célula de Plantas*. 11:1841-1852; Dotson, S.B., y otros, (1996) *El Diario de las Plantas*. 10:383-392) son ya sea comercialmente disponibles no aprobados para uso en el campo. Cultivo de tejidos basado en selecciones negativas (Sundaresan, V., y otros, (1995) *Genes Dev.* 9:1797-810; Kobayashi, T., y otros, (1995) *Jpn J. Genet.* 70:409-22) no son prácticas en arroz.

En una modalidad de la presente invención, el rasgo suicida específico a polen se trata por ingeniería usando un apropiado promotor que acciona la expresión de un gen suicida. Varios genes suicidas están disponibles, incluyendo el gen de barnasa (Goldman, M.H., y otros,

18A

(1994) EMBO J. 13:2976-84), RNases relacionados (Fedorova, N.D., y otros, (1994) Mol Biol (Mosk). 28:468-71), gen de cadena de toxina A de difteria (Tsugeki, R. y otros, (1999) Proc Natl Acad Sci USA. 96:12941-6; Nilsson, O., y otros, (1998) Plant J. 15:799-804; Uk Kim, y otros, (1998) Mol Cells. 8:310-7; Day, C.D., y otros, (1995) Desarrollo 121:2887-95) y otros (DeLong, A., y otros, (1993) Cell. 74:757-768). El uso del gen de barnasa se ha mostrado como ser una vía efectiva para generar la muerte de células de micro-esporas autónomas cuando se fusionan a un promotor específico a polen (Custers, J.B., y otros, (1997) Plant Mol Biol. 35:689-99). En contraste con previos métodos, los métodos de la presente invención dependen de la generación de semi-esterilidad, en oposición a la completa esterilidad del macho, la cual puede lograrse en un aspecto de la presente invención mediante el tratamiento por ingeniería de la expresión de barnasa específicamente en micro-esporas. Varios promotores están disponibles para este propósito, incluyendo ambos arroz (Zou, J.T., y otros, (1994) Amer. J. Botany. 81:552-561) y maíz promotores específicos a polen (Hamilton, D.A., y otros, (1992) Plant Mol Biol. 18:211-8), y promotores específicos a polen para varias especies dicotiledóneas (Twell, D., y otros, (1991) Genes Dev. 5:496-507; Kulikauskas, R. y otros, (1997) Plant Mol Biol. 34:809-14; Custers, J.B., y otros, (1997) Plant Mol Biol. 35:689-99; Albani, D., y otros, (1991) Plant Mol Biol. 16:501-13; Kim, Y. y otros, (1992) Transgenic Res. 1:188-94; Twell, D., y otros; (1990) Desarrollo. 109:705-13; van Tunen, A.J., y otros, (1990) Célula de Plantas. 2:393-401). En una modalidad preferida, un heterólogo promotor específico a polen, tal como el promotor de maíz (Hamilton, D.A., y otros, (1992) Plant Mol Biol. 18:211-8), se contempla para minimizar la posibilidad de silenciamiento de genes.

La evaluación de la efectividad del mecanismo del polen suicida en la eliminación de T-ADN (lugares de lanzamiento), puede lograrse por ejemplo, empleando un constructor que contiene el gen suicida y el gen de barrera transformado en un organismo tal como arroz vía transformación de T-ADN mediada por *Agrobacterium* (Hiei, Y., y otros, (1994) *Plant J.* 6:271-82; Hiei, Y., y otros, (1997) *Plant Molec Bio.* 35:205-218; Zhang, J., y otros; (1997) *Mol Biotechnol.* 8:223-31). Varias leas de T-ADN de única copia (SCTLs) pueden entonces identificarse por Análisis del Sur (Ausebel, F.M., y otros, (1987) In: *Protocolos corrientes en biología molecular*, ed. Chanda, V.B. Boston: John Wiley & Sons, Inc.). Para probar la eficiencia de la eliminación de T-ADN, puede entonces llevarse a cabo un experimento PCR en progenie cruzada exterior no seleccionada para detectar la transmisión del T-ADN. Este análisis puede llevarse a cabo en estanques de ADN a partir de progenie no seleccionada (por ejemplo, un mínimo de estanques 384 de ADN, cada estanque que contiene 12 plantas). Usando este procedimiento de evaluación, se contempla que otras construcciones pueden probarse, tales como aquellos que incluyen una fuente de transposasa (explicado abajo), el gen suicida de polen, y el elemento de barrera de Ds.

F. Expresión de Transposasa

Una adicional modalidad de la presente invención está dirigida hacia el enriquecimiento de transposiciones independientes mientras se minimiza la recuperación de unos no independientes. Una vía de llevar a cabo esto es retrasando la transposición en el desarrollo para prevenir la temprana propagación de clones y la transmisión meiótica de los eventos no independientes. El control sobre la temporización de desarrollo de la transposición se logra usando promotores heterólogos promotores que

accionan el gen de Ac transposasa (Rommens, C.M., y otros, (1992) Mol Gen Genet. 231:433-41; Balcells, L. y otros, (1994) Plant Mol Biol. 24:789-98; Scofield, S.R., y otros, (1992) Plant Cell. 4:573-82; Swinburne, J., y otros, (1992) Plant Cell. 4:583-95; Greveling, C., y otros, (1992) Proc Natl Acad Sci U S A. 89:6085-9). Varios promotores heterólogos se visualizan en la presente modalidad.

En una modalidad preferida la estrategia para enriquecer las transposiciones independientes es limitar la expresión de transposasa exclusivamente a desarrollo floral, preferiblemente excluyendo la expresión de pistilo (por las razones explicadas abajo), para prevenir las transposiciones vegetativas. Un promotor específico floral puede usarse para accionar la expresión de transposasa durante la formación de estambre primordial y varios están disponibles que precluyen la expresión de pistilo tal como arroz (Moon, Y.H., y otros, (1999) Plant Mol Biol. 40:167-77; Kang, H.G., y otros, (1998) Plant Mol Biol. 38:1021-9; Greco, R., y otros, (1997) Mol Gen Genet. 253:615-23) o promotores de gen de maíz de caja MADS (Mena, M., y otros, (1996) Ciencia 274:1537-40; Mena, M., y otros, (1995) Plant J. 8:845-54). Para mejorar la frecuencia de transposición, tanto la versión de total longitud de cADN como una versión truncada de transposasa Ac pueden usarse en arroz. La versión truncada (ORF103-807) se ha mostrado que mejora la frecuencia de transposición en especies de plantas heterólogas (Houbart-Herlin, y otros, (1990) Mol Gen Genet. 224:17-23; Li, M.G. y otros, (1990) Proc Natl Acad Sci U S A. 87:6044-8).

Limitar la expresión de transposasa al desarrollo floral significa que cada flor representa una fuente independiente de transposiciones. Estadísticamente, la recuperación de transposición no independiente es baja — si el polen de cada una es considerada una fuente de

87
187

transposiciones independientes entonces la frecuencia de la semilla de progenie derivada del polen del mismo anter será desventajosa - por lo menos seis veces más anters (seis por espiguita) se producirán que en la semilla (una por espiguita). Las modalidades de la presente invención incluyen el uso de 35S-accionadas de transposasa (completa longitud y truncada) y construcciones de transposasa expresadas floralmente transformadas en arroz conjuntamente con elemento simple de Ds insertado dentro de 5' UTR de un gen de barrera. Únicas líneas de inserción de copia se identifican entonces mediante análisis del Sur y estas plantas se cruzan exteriormente a hembras IR36 macho estéril, de tipo salvaje. Las sementeras de progenie so sometidas entonces a dos aplicaciones foliares de Finale® (ver abajo) para seleccionar progenie donde Ds se ha cortado. Basado en el mecanismo de transposición Ac/Ds (Chen, J., y otros, (1987) *Genética*. 117:109-116; Chen, J., y otros, (1992) *Genética* 130:665-676; Greenblatt, I.M. y otros, (1962) *Genética* (47:489-501) más del 50% de esta progenie contiene elementos Ds transpuestos enlazados o no enlazados. La progenie resistente a Finale® de cada lote se analiza mediante análisis del Sur para determinar la efectividad de recuperación de transposiciones independientes.

Una vez transpuestos, los elementos Ds necesitan ser estabilizados, aunque tuene aún la habilidad de ser removilizados. Para estabilizar los elementos Ds transpuestos, el apropiado gen de transposasa se incluye dentro del constructor final de T-ADN que contiene el lugar de lanzamiento DS. El proceso del polen suicida o estrategia contrasentido de barrera elimina la fuente de transposasa conjuntamente con la T-ADN, estabilizando así cualquier elemento Ds transpuesto en la progenie. Reintroduciendo la transposasa en subsecuentes generaciones se puede desestabilizar fácilmente el elemento Ds, permitiendo la muta-génesis localizada de genes vecinos (Long, D., y otros, (1997) *Plant J.* 11:145-8;

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Constructores Genéticos.

pYU904 – Elemento Sintético Ds

El elemento sintético Ds se construyó combinando los extremos 5' y 3' de Ac requerido para transposición. Los precursores P643 (aagctttggccatattgcagtcaccc) (SEC ID NO:1) y P644 (aagcttgctcgagcagggatgaaagtaggatggga) (SEC ID NO:2) se usan para amplificar el extremo 5' del elemento Activador (Ac) de las coordenadas 4312 a 4565 bp (Acceso a GenBank X01380) (SEC ID NO:3) mientras se agrega un lugar de clonación Hind III al extremo 3' y tanto un lugar Hind III como un lugar Xho I en el extremo 5' del fragmento. Los precursores P645 (gaattccctcgagtagggatgaaaacggtcggtaac) (SEC ID NO:4) y P646 (gaattcgaatatatgtttcatgtgtgat) (SEC ID NO:5) se usan para amplificar el extremo 3' del elemento Ac de las coordenadas 1 a 221 bp con lugares de restricción adicionales EcoRI y XhoI agregados al extremo 3' del fragmento y un lugar de restricción adicional EcoRI se agregó al extremo 5' del fragmento que se amplifica. Estos fragmentos se clonaron individualmente en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen).

El plásmido pYU890 contenía el fragmento de extremo 5' del elemento Ac, y el plásmido pYU892 contenía el fragmento del extremo 3' del elemento Ac.

pYU892 se digirió con EcoRI (New England Biolabs), y el par de base 230 (bp) Eco RI insertado se clonó en el lugar Eco RI de pUC19 (Acceso del GenBank M77789) para generar pYU899.

pYU890 se digirió con HindIII (New England Biolabs), y el inserto 250 bp se subclonó en el lugar HindIII del plásmido pYU899 llevando al plásmido pYU902. Este plásmido contiene los extremos 5' y 3' de Ac, requeridos para transposición, y un lugar poli-enlazante interno para subsecuentes propósitos de clonación.

Una eliminación derivada (pYU903) de pBLUESCRIPT II K/S (Stratagene) se construyó digiriendo primero con Sac I y Sal I, llenado con Klenow y religado. El plásmido se digirió entonces con Asp 718 y Apa I, se llenó con Klenow y relegó. El plásmido derivado representa una eliminación de los lugares de restricción del poli-enlazante KpnI-SacI pero con un lugar de clonación intacto XhoI.

pYU902 se digirió con XhoI (New England Biolabs), y el fragmento interno de 571 bp se clonó en el lugar XhoI de pYU903 llevando a pYU904 (Figura 4A). Este plásmido contiene los extremos 5' y 3' de Ac, y el lugar de clonado múltiple dentro del elemento Ds que es ahora único para el plásmido. Este elemento Ds se refiere como "Ds-poli-enlazante".

pYU905 – Elemento Ds que contiene Gen Marcador de Selección

Un fragmento Sma I de 1,1 kb que contiene el gen de barrera de *Streptomyces hygroscopicus* (Acceso de Genbank X17220) (SEC ID NO:6) se fusiona a un fragmento promotor de 0,6 kb CaMV 35S (Benfey y Chua, 1990) y el elemento 3' de señal de poli-adenilación (coordenadas 514-813) (Acceso de GenBank V00090) (SEC ID NO:7) para crear el plásmido pYU117.

El plásmido pYU 117 se digirió con HindIII y SnaBI (new England Biolabs) y el fragmento de 1,8 kb que contiene el gen terminal-

191

gen de barrera-promotor CaMV 35S se llenó con polimeraza de ADN de fragmento Klenow (New England Biolabs). El fragmento modificado se clonó en el lugar SmaI de pYU904 para generar pYU905 (Figura 4B).

pYU905 contiene el gen de barrera accionado CaMV 35S al interior del elemento Ds-poli-enlazante transposable. Este elemento Ds sintético se denomina "Ds-bar".

pYU846 – Fuente de transposasa

El plásmido pKU108A contiene una transposasa cADN con una estructura de lectura truncada (ORFa103-807) (Lee y Starlinger, PNAS 87:6044-6048. 1990) se digirió con NcoI y BamHI (New England Biolabs). El fragmento interno de 2,1 kb se purificó y subclonó dentro de pRTL2 (Restrepo-Hartwig y Carrington. J. Virology 66:5662) previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante pYU846 (Figura 5), contenía la fusión de transcripción entre el promotor CaMV 35S, la Ac transposasa cADN truncada (aminoácidos 103-807) y la secuencia 35S poli-adenilación.

Constructores GST

Dos ejemplos de constructores GST basados en el gen de barnasa de *Bacillus amyloliquefaciens* se muestran en la Tabla 1 (SEC ID NO:15) y Tabla 2 (SEC ID NO:16). Estos constructores se derivan reemplazando el promotor de tabaco específico a tapetal TA29 (Acceso a Genbank A18052) (SEC ID NO:8) con una dicotiledónea promotora específica a polen de *Arabidopsis thaliana* (At59) o monocotiledónea promotora específica a polen de *Oryza sativa* (arroz) (Acceso a GenBank Z16402) (SEC ID NO:9).

El promotor At59 y 5' UTR se amplifica a partir de *A. thaliana* Col-O genómico ADN usando precursores P755 (acccatgtgagttttctttcttccat) (SEC ID NO:10) y P756 (ttataggaaaattccagcagctcagcat) (SEC ID NO:11). Estos precursores amplifican simultáneamente el promotor y la secuencia 5' UTR mientras introduce un lugar de clonación 5' Pst I y un lugar 3' Nco I situado al inicio de la translación. Este lugar Nco I se fusiona a un lugar de 0,74 kb Nco I – Eco RI del gen de barnasa que contiene el elemento de señal de poli-adenilación de sintasa nopalina en el extremo 3' para crear el transgene At59PSP:barnasa:nos (Tabla 1) (Figura 3A).

Similarmente, el arroz promotor específico a polen (Acceso a GenBank Z16402) (SEC ID NO:9) se amplifica a partir de *Oryza sativa* ssp. *indica* IR36 ADN genómico usando precursores P731 (gaattccggggccatggcatccttag) (SEC ID NO:12) y P732 (ccatggatgatgtggetgcaaatg) (SEC ID NO:13) que amplifican un promotor y un fragmento 5' UTR mientras introduce un lugar 5' EcoRI e incluye el lugar 3' Nco I al inicio de la translación. Este fragmento de 0,74 kb Eco RI–Nco I está ligado al lugar Nco I del gen de barnasa que contiene el elemento de señal de poli-adenilación de sintasa nopalina en el extremo 3' para crear el transgene OsPSP:barnasa:Nos (Tabla 2) (Figura 3B).

Constructor T-ADN

El vector T-ADN pPZP200 (Acceso a GenBank U10460) (SEC ID NO:14) se digirió con Pst I ligado al fragmento de 3,2 kb Pst I a partir de pYU846 para generar pYU1001. El pYU1001 se digirió con Asp 718, llenado con Klenow, y ligado al fragmento de gen T4 ADN polimerasa-tratada de 1,2 kb Pst I – Eco RI At59:barnase:nos (pYU1002) o al

Tabla 1. Secuencia y Características de AT59:Barnasa: Constructor Nos GST

CARACTERÍSTICAS Localización/Calificadores

misc_feature 840..1245

/nota ="3' secuencia regulatoria que contiene el
lugar de poli-adenilación derivado del gen de sintasa
nopalina
a partir de *Agrobacterium* T-ADN"

5'UTR 393..503

AA cambiado a CC en el extremo 3' para crear lugar NcoI

TATA_señal 364..368

primer_bind 1..30 cambio de CCAT a TGCA

primer_bind complemento(480..501)

precursor para amplificar At59 promotor e introduce lugar NcoI

CDS 504..839

/note=" codificar secuencia de gen de barnasa"

promotor 1..392 At59 promotor región

misc_feature 1241..1246 Eco RI lugar de clonación

misc_feature 1..6 Pst I lugar de clonación

BASE CONTEO 400 a 232 c 235 g 375 t

ORIGEN

```

1  ctgcagggga ttttttaat tacttgtatg ataattatt tcaatagacc tagagacttg
61  atatatacta cgtttaataa tcatatgtag tatgtatgat taattaagta aatacaaaaa
121 tagttacctc aagttttaa ggtgctattg ggtaattatc tcagtaaaaa taatattaga
181 tcaaggcaaa aataactgaa aatatccaga aaagaaggat taaacaaagg catccaaaat
241 ctataattgg gtttttggg gaaatgacca tagagattta aatcaatggt tgtctaattc
301 atgttaattc tcaatcctct attgactctt ctcactcctt ttctctctc cccagttcct
361 ggttattaaa gcaalcaggt gattcaaacc tttaattctt taatcccggc aggccatct
421 gaaacaacaa cctccgttg aggttttggc gggaaaatat aaagttcaca ggctttggtc
481 tctgcatttg caatatatt accatggtac cgtttatcaa cacgtttgac ggggttgccg
541 attatcttca gacatatcat aagetacctg ataattacat tacaaaatca gaagcacaaag
601 cctcgggctg ggtggcatca aaaggggaacc ttgcagacgt cgtccggggg aaaagcatcg
661 gcggagacatcttctcaaac aggggaaggca aactcccggg caaaagcgga cgaacatggc
721 gtgaagcgga tattaactat acatcaggct tcagaaattc agaccggatt cttactcaa
781 gcgactggct gatttacaaa acaacggacc attatcagac cttacaaaa atcagataac
841 gaaaaaaacg gcttctgcg gaggcggtt ttctcagctt tacataaagt gtgtaataaa
901 tttttcttca aactctgac ggtcaatttc actttccggn nnnctctaga ggaatccgaag
961 cagatcggtc aaacatttgg caataaagt tcttaagatt gaatcctgtt gccggtcttg
1021 cgatgattat cataaattt ctgttgaatt acgttaagca tgaataaatt aacatgtaat
1081 gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat
1141 acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgccg gcggtgtcat
1201 ctatgttact agatogggaa gatccccggg taccgagctc gaattc (SEC ID NO:15)

```

Tabla 2. Secuencia y Características de OsPSP:Barnasa: Constructor Nos GTS

CARACTERÍSTICAS	Localización/Calificadores
misc_feature	1208..1213 /note="Eco RI lugar clonación"
misc_feature	807..1212 /note="3' secuencia regulatoria que contiene el lugar de poli-adenilación derivado de sintasa nopalina gene de <i>Agrobacterium</i> T-ADN"
CDS	471..806 /nota ="secuencia de codificación del gen de barnasa"
misc_feature	1..6 /nota ="Eco RI lugar de clonación"
promotor	6..470 /nota ="OsPSP promotor región"

BASE CONTEO 374 a 279 c 239 g 317 t

ORIGEN

```

1  gaattccggg ccatggcatc cttagaatg gaggaattta agtgaaattg agctaaacta
61  tgtgaacatc ctatgaagt actgcattca aggcgcceaa catgaaatct attcagggtc
121 ccaagttgtg ggcttcgta acgtcaaaat tcgacagatt tetggctggc taaaacacce
181 acaacggcaa taatagctc gctcgtcaaa acattcacc attttagct tggtcacat
241 caaaagtagg atcaaatcaa caatctgcct tetcttcagc cactcgatcc caacggcate
301 tccaacgatt cctacttgaa ggacagccat ggaaatectc caggttcccc aggttaacta
361 taccacagct cgaatccgtt ccaaaccagg ccatttcagt accctcctct cacattttcc
421 ccaaataata atagaggaag gggaaaaaca catttcagc cacatcatcc atggtaccgg
481 ttatcaacac gtttgacggg gttgcggatt atcttcagac atatcataag ctacctgata
541 attacattac aaaatcagaa gcacaagccc tcggctgggt ggcacaaaa gggaaccttg
601 cagacgtcgc tccggggaaa agcatcggcg gagacatctt ctcaaacagg gaaggcaaac
661 tcccgggcaa aagcggacga acatggcgtg aagcggatat taactataca tcaggcttca
721 gaaattcaga ccgattctt tactcaagcg actggctgat ttacaaaaca accgaccatt
781 atcagacctt tacaaaaatc agataacgaa aaaaacggct tcttgcggag gccgttttt
841 tcagctttac ataaagtgtg taataaattt tcttcaaac tetgateggt caatttact
901 ttccggnnnn ctctagagga tccgaagcag atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct
961 taagattgaa tctgttgcc ggtcttgcca tgattatcat ataattctg ttgaattacg
1021 tlaagcatgt aataattaac atglaatgca tgacgttatt tatgagatgg gttttatga
1081 ttagagtcce gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaatatag cgcgcgaaact
1141 aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcgggaagat ccccggttac
1201 cgagctcgaa ttc (SEC ID NO:16)

```

hembras del tipo salvaje. En esta instancia, únicamente el polen no transgénico o polen que contiene transposiciones dispersas se puede propagar. Para propósito de eliminar transmisión no deseada de polen de un transgene (por ejemplo, resistencia a herbicidas en césped), las líneas transgénicas hemizigotas pueden plantarse y únicamente sobrevivirá el polen tipo salvaje.

Alfalfa

Un constructor de ácido nucleico (GST) donde el gene codifica barnasa, bajo el control de un promotor específico a polen a partir de arroz, se elabora en forma tal que un gen Bt se enlaza al GST. Un genoma de alfalfa virgen (es decir, tipo salvaje) se transforma con el complejo de transgene que contiene los tres elementos (arroz promotor específico a polen, gen de barnasa, gen Bt) tal que la planta transgénica resultante es hemizigota para el complejo de transgene.

La planta transgénica hemizigota se propaga vegetativamente para lograr plantas de progenie que son también hemizigotas para el complejo de transgene. Aunque la planta es resistente/tolerante a algunas plagas de insectos lepidópteros, la transmisión del gen Bt vía polinización cruzada se elimina debido a que no se produce polen transgénico viable.

Maíz Transformado

En el caso de maíz, el GST/complejo de transgene se inserta dentro del genoma del maíz y el padre "hembra" lleva el complejo de transgene. Ante la hibridación con el polen de tipo salvaje, únicamente 1/2 de la semilla híbrida de la progenie llevará el complejo de transgene (no es un problema para las aplicaciones de genómicos funcionales). Esta

limitación está circunscrita usando un sistema de recombinasa flp o lox— el rasgo GST se mantiene inactivo y homocigoto hasta que el híbrido se produce. En este punto, la recombinación mediada por frt- o cre- activa el rasgo GST (por ejemplo, retirando un bloque de ADN para transcripción o activando la transcripción), ahora presentes en toda la progenie híbrida en vez de 1/2. El complejo de transgene que contiene GSTs activado se elimina de cualquier que activa el complejo de transgene (por ejemplo, 50% de los productos meioticos).

Ejemplo 3. Eventos Enriquecedores de Transposición Dispersa

Enlazando físicamente el rasgo de esterilidad *rasgo* a un lugar de lanzamiento de transposon y/o fuente de transposasa, el “filtro de esterilidad genética” se usa para *enriquecer altamente los eventos* de transposición dispersos y/o estabilizados sin el uso de químicos y sin la necesidad de *seleccionar contra progenie* que contiene eventos enlazados de transposición y/o fuente de transposasa.

Por ejemplo, cuando se logra el 50% de esterilidad del polen, los *remanentes* genomas viables haploides no desarrollarán el gen suicida y sus elementos asociados tales como el lugar de lanzamiento del transposon y/o gen de transposasa debido a la normal segregación de cromosoma homologo, independiente escogencia y recombinación meiótica. Una fracción de estos genomas viables contendrá nuevos elementos transpuestos, especialmente aquellos elementos que se ha escogido independientemente o recombinado a partir del lugar de lanzamiento y su asociado gen suicida. Consecuentemente, el “filtro de esterilidad genética” elimina los gametos que contienen elementos transposados que permanecen enlazados al lugar de lanzamiento y/o gametos que contienen un gen de transposasa.

202
202

Si se usa polen remanente viable para fertilizar óvulos, ya sea mediante polinizaciones controladas o mediante polinización por el viento, una fracción de la progenie resultante contendrá elementos transposados. Esta progenie se identifica fácilmente mediante la inclusión de un marcador de selección o tamizado al interior del transposon, tal como el gen de la petunia, *Arabidopsis*, o *Agrobacterium* CP4 EPSPS (Padgett, S. R. y otros, (1987) Arch Biochem Biophys Vol. 258/2:564-73; Klee, H. J. y otros, 1987 Mol Gen Genet Vol. 210/3:437-42; Hoef, A., y otros, (1998) Food Addit Contam Vol. 15/7:767-74; Harrison, L. A., y otros, (1996) J Nutr Vol. 126/3:728-40), encoding glyphosate (Roundup®) resistencia (Malik, J., y otros, (1989) Biofactors Vol. 2/1:17-25); o una variedad de sintasa aceto-lactato (ALS), que codifican resistencia a herbicidas de sulfonil-urea (Whitcomb, C. E. (1999) Toxicol Ind Health Vol. 15/1-2:231-9), tal como el gen resistente a múltiples herbicidas de *Arabidopsis*, *csr1-4* (Mourad, G. y otros, (1994) Mol Gen Genet Vol.: 243/2:178-84), o el gen de barrera de *Streptomyces* (Thompson, C.J y otros, (1986) EMBO J. Vol. 6:2519-2523), que codifica la resistencia a fosfotricina (Finale®), para nombrar unos pocos.

En el caso de la transmisión de un elemento autónomo, tal como Ac, progenie que contiene elementos dispersos Ac transpuestos se identifican mediante medios genéticos clásicos tales como trans-activación de un gen de reporte Ds-inducido. En una modalidad de la presente invención, el transposon se construye con un gen de supervivencia de polen que permite únicamente polen viable que contiene elementos transposados, eliminando así completamente la necesidad de selección química o tamices.

203
203

Si el complejo de GST contiene adicionalmente un elemento transposable, entonces la frecuencia de transposición (tanto para los lugares enlazados como no enlazados) puede ser alta, dependiendo de la fuente de transposasa y otros factores. Asumiendo una frecuencia de transposición de 5%, 70% de la cual puede ser enlazada, entonces el 30% no son enlazadas y 15% de éstos (escogencia independiente al azar del transposon con el cromosoma GST) se recuperarán en progenie y se identificarán fácilmente mediante la resistencia a herbicidas contenidos en el elemento transposable. Si se desea recuperar 100 000 inserciones independientes, un estimado del número de semillas requeridas puede ser: $(100\ 000 \times 2/3)/0,05 = 13\ 333\ 333$ F1 de semillas necesitadas. Éstas pueden generarse y tamizarse (recuperadas como plantas individuales) en menos de 3 años.

Ejemplo 4. Eventos de Transposición Dispersa Establemente Enriquecidos

Una modalidad adicional de la presente invención se dirige hacia la inclusión, en el complejo de transgene, en adición al lugar de lanzamiento del transposon y el gen suicida, otros genes tales como una fuente de transposasa. En esta modalidad, el "filtro de esterilidad genética" enriquece elementos dispersos mientras que también elimina la transmisión de la fuente de transposasa a progenie.

La eliminación simultánea del lugar donante de transposon y gen de transposasa tiene el adicional beneficio de transmitir elementos transposados que son estabilizados (es decir, no más transposición debido a la pérdida del gen de transposasa) previniendo así que ocurran las adicionales transposiciones (transposiciones secundarias).

Otras modalidades de la presente invención incluyen el posicionamiento de la fuente de transposasa y lugares de lanzamiento del transposon en separados complejos de transgenes. Por ejemplo, el lugar de lanzamiento y la fuente de transposasa pueden llevarse conjuntamente en un genoma en elementos separados para lograr el mismo enriquecimiento para transposiciones dispersas. Más aún, en casos donde se desea la transposición localizada, es decir, para saturar una región cromosómica específica con inserciones o para recuperar inserciones en genes de interés cercanos, la fuente de transposasa se elimina mediante el método de filtro de esterilidad sin eliminar necesariamente las transposiciones enlazadas.

Ejemplo 5. Arroz – Un Sistema de Planta Modelo

A. Transformación de Arroz

Transgénicos de arroz se generan empleando un método basado en micro-titulación de 24 perforaciones que permite un alta producción transgénica a todo su través. El método es una adaptación de los protocolos publicados (Hiei, Y., y otros, (1994) Plant J. 6:271-82; Hiei, Y. y otros (1997) Plant Molec Bio. 35:205-218; Zhang, J., y otros, (1997) Mol Biotechnol. 8:223-31) e involucra un cultivo enteramente líquido y un sistema de transformación que permite la producción de transgénicos a partir de inducción de *scutellar callus*, co-cultivo con *Agrobacterium*, tratamiento con Timentin, y regeneración de tallo. Este sistema se usa para generar ca. 50-100 líneas transgénicas independientes cada mes.

Una muestra de tejido de cada línea transgénica se recolectó, se extrajo ADN y analizó mediante Southern para identificar líneas que contiene una sola copia de insertos de T-ADN (SCTLs). Los tallos de

SCTLs se micro-propagaron y transplantaron al suelo de acuerdo con los métodos bien conocidos para una persona experta en el arte.

B. Metodologías Genéticas

Un programa de alto cruce de alto volumen, basado ampliamente, está disponible en la CIAT para la generación de lotes, semillas y líneas de transposon. Típicamente, alrededor de 1 000 cruces controlados (manualmente) se elaboraron en cada ciclo, incluyendo cruces sencillos, dobles, superiores y posteriores. El número de semillas F1 obtenido depende del tipo de cruce y objetivos de regeneración.

Los cruces pueden hacerse a través del año bajo condiciones de invernadero aprobadas biológicamente seguras. Tres plantaciones de parientes a intervalos de desde 7 a 10 días se hicieron para asegurar la florescencia simultánea. Los parientes crecen en grandes pots o crecen en el campo en un bloque de hibridización cuando se emplea la línea hembra, macho estéril.

Para polinizaciones manuales, los métodos de cruce son: selección de plantas parientes, emasculación de panículos (retiro de anters para el pariente hembra), cubrimiento de flores emasculadas con una bolsa de papel satinado o cristal, polinización del pariente hembra con polen colectado del pariente macho, cubrimiento del panículo polinizado con la bolsa de papel satinado o cristal, e identificación de panículos usados para cruce con una bandera de cruce que contiene relevante información acerca de los parientes, fechas, y nombre de la persona que hizo el cruce. Para detallada información sobre la hibridización de arroz, ver por ejemplo, Coffman, W. R. y R. M. Herrera (1980) Arroz, En:

Hibridización de Plantas de Cosecha, W. R. Fehr y H. H. Hadley, Editores, Capítulo 36: 511-522, American Society de Agronomists.

Plantas seleccionadas F1 y T1 se cosecharon individualmente para produce semillas F2. Alrededor de 25 días después de la polinización la semilla híbrida se cosechó, trilló, limpió, colocó en sobres de monedas. Esta semilla se almacenó bajo baja humedad y temperatura. La semilla T1 crecen en placas y se seleccionan para resistencia a herbicidas mediante dos aplicaciones a foliares de 0,05% de Finale® a 25 y 35 días después de la germinación.

C. Rastreo de Muestras

Una base de datos de rastreo de muestra de código de barras puede usarse para rastrear plantas, semillas, y muestras de ADN a través del flujo de trabajo. A cada transgénico que se crea se asigna un único identificador (alfanumérico). Las plantas en lote de transgénicos llevan este identificador y un segundo único identificador de lote. Todos los lotes que entran a las guarderías de producción llevan los transgénicos/ identificadores de lote y cruces de prueba derivados de cada lote se les asigna un único identificador para cada cruce (lote de semilla T1).

Después de la selección de Finale®, a cada planta resistente se le asigna un único identificador de línea. Esta información se codifica en una etiqueta de la planta con dos etiquetas desprendibles; cada una contiene idénticos identificadores alfanuméricos y códigos de barras asociados. Una etiqueta desprendible está unida a la muestra de tejido y la otra permanece en la planta, en últimas cosida al empaque de semillas, un lector de código de barras de muestras de tejido entra en logaritmos en una base de datos que luego rastrea las muestras a través de la extracción

de cola de ADN y en últimas en una posición de una placa de 384-micro-titulaciones usada para amplificación de PCR y secuenciado de ADN.

D. Alto Aislamiento a todo el través de ADN y Normalización

Muestras de tejido se liofilizan antes de la extracción de ADN. El tejido liofilizado para embarque en bolsas plásticas se sella con secante, el tejido se muele con perlas de sílice de zirconio (ATGC, Inc.) agitando rápidamente 96-384 tubos en un agitador de pintado comercial de 10 galones (Fluid Dynamics, Inc.).

El ADN se extrae usando un método paralelo a todo el través, adaptado de los métodos previamente publicados (Galbati, M., y otros, (2000) *Functional & Integrative Genomics*, en prensa) y el ADN purificado es almacenado en 96 placas de formato de micro-titulación. La concentración del ADN se mide robóticamente mediante el método de Picogreen (Molecular Probes, Inc.) usando un lector de placa de Spectrofluory estación de trabajo Genesis robotics (Tecan, Inc.).

Para hacer una segunda placa de trabajo para análisis PCR, el ADN se normaliza robóticamente retirando una cantidad fija de ADN de cada orificio conjuntamente con la apropiada cantidad de amortiguador en una segunda placa de micro-titulación. Replicas madre-hija de estas placas de trabajo normalizadas se elaboraron robóticamente y las muestras se embarcaron para amplificación y secuenciado.

La confiabilidad de este completo procedimiento, incluyendo levantamientos, a partir de la extracción de tejido hasta la normalización, se ha permitido tanto para maíz como Arabidopsis.

transposición en esta dirección. Consecuentemente, esta semilla puede simplemente replantarse cada estación para generar lote adicional para nuevas selecciones de transposición.

El tiempo de floración para la variedad de arroz Nipponbare es de 60 días cuando crece a o cerca al ecuador. Usando un localización ecuatorial es posible lograr casi 4 generaciones de plantas cada año. El tiempo abreviado de generación y las condiciones de crecimiento durante un año constante en Cali, México hace a los genéticos de arroz casi tan eficientes como Arabidopsis.

G. Producción de Semilla de Fundación

En una modalidad de la presente invención, el objetivo es seleccionar transposiciones sencillas, dispersas y recuperar estas inserciones en condición hemizigosa. Esto permite la recuperación de mutaciones no letales, letales recesivas y haplo-insuficientes hembra.

Para producir la semilla T1, las plantas en lote se cruzan como machos para plantas hembra macho estéril en la guardería. Eficiente cruce exterior en arroz puede lograrse entre-plantando machos y hembras machos estériles. La esterilidad de machos en Nipponbare no está actualmente disponible en forma tal que una mutación de esterilidad de machos nuclear (ms) se introgrece a partir de una cadena *O. sativa ssp. indica* en Nipponbare en las guarderías. El proceso de introgresión se acelera en gran medida mediante una representación asistida por marcador y regeneración, seleccionando la progenie de cruce posterior para la mutación ms y marcadores de Nipponbare.

El foco ms se representa primero usando marcadores (SSR) de repetición de secuencia simple previamente caracterizados (McCouch, S.R., y otros, (1997) Plant Mol Biol. 35:89-99; Panaud, O., y otros, (1996) Mol Gen Genet. 252:597-607). 7 000 SSR secuencias están disponibles en el escrito en borrador de Monsanto (Monsanto 2000). Los SSRs enlazados se usan para seguir el alelo ms durante la introgresión, mientras que los SSRs no enlazados a través del genoma se usan para selección contra el germo-plasma donante.

Dos cruces posteriores y una auto polinización debe ser suficiente para transferir la alelo ms al antecedente del Nipponbare. Los cruces F1 se elaboran y la progenie F2 se genera. La línea ms introgresada se hace disponible para producción de semillas T1. Una línea 1:1 que segrega para el fenotipo ms se usa en la guardería, genotipeada mediante análisis SSR, y las plantas de machos fértiles se desechan. Los lotes de transposon se hibridizan a plantas hembra ms/ms para generar semilla T1 para selección de línea Ds.

H. Selección de Línea de Transposon

La semilla T1 se planta en placas y sementeras de 25 días de edad se seleccionan mediante una aplicación foliar de 0,05% de Finale® seguido por un segundo tratamiento de 10 a 15 días después. Las plantas resistentes a Finale® se codifican con barras y transplantan a la guardería y se dejan auto polinizar para generar semilla T2.

Una muestra de tejido (ca. 1-2 gm tejido de hoja) de cada planta se colecta, coloca en tubos de código de barras, liofilizan y preparan para extracción de ADN.

La semilla T2 de cada línea se colecta, trilla, coloca en cubiertas con código de barras y prepara para almacenamiento o distribución pública.

Aunque la invención se ha divulgado con referencia a modalidades específicas, es evidente que otras modalidades y variaciones de esta invención pueden visualizarse por otros expertos en el arte sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Las reivindicaciones del apéndice pretenden estar construidas en forma tal de incluir todas las modificaciones establecidas y variaciones equivalentes.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un constructor de ácido nucleico que comprende un promotor específico a gameto macho o gameto hembra operativamente enlazado a un gen suicida, donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un gene de interés.

2. Un constructor de ácido nucleico que comprende un promotor específico a polen o un promotor específico a óvulos operativamente enlazado a un gen suicida seleccionado a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria; donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un gen de interés seleccionado a partir del grupo que consiste de un gen que codifica para resistencia a herbicidas, resistencia a antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada y contenido de celulosa u otro rasgo de interés agronómico.

3. El constructor de ácido nucleico de la reivindicación 1 donde dicho promotor se selecciona a partir del grupo que consiste de un promotor específico a polen y un promotor específico a óvulos.

4. El constructor de ácido nucleico de la reivindicación 1 donde dicho gen suicida se selecciona a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria.

5. El constructor de ácido nucleico de la reivindicación 1 donde dicho gene de interés se selecciona a partir del grupo que consiste de un ácido nucleico que codifica resistencia a herbicidas, resistencia a

213
213

antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada y contenido de celulosa.

6. Un vector que comprende el constructor de ácido nucleico de la reivindicación 1.

7. Un vector que comprende el constructor de ácido nucleico de la reivindicación 2.

8. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 6.

9. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 7.

10. Una célula de planta recombinante que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7.

11. Una planta transgénica que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7.

12. La planta transgénica de la reivindicación 11, donde la planta transgénica es hemizigosa para el constructor de ácido nucleico.

13. Un método para reducir o eliminar la transmisión macho de un foco de transgene en una planta que comprende:

a) transformar una célula de planta con un constructor de ácido nucleico donde un promotor específico a gameto macho está operativamente enlazado a un gen suicida, donde la combinación de dicho

promotor y dicho gen suicida está enlazada a un poli nucleótido heterólogo;

b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir gametos machos que no tienen dicho foco de transgene.

14. Un método para reducir o eliminar la transmisión macho de un foco de transgene en una planta que comprende:

a) transformar una célula de planta con un constructor de ácido nucleico donde un promotor específico a polen está operativamente enlazado a un gen suicida;

i) donde dicho gen suicida se selecciona a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria;

ii) donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un poli nucleótido heterólogo;

iii) donde dicho poli nucleótido heterólogo se selecciona a partir del grupo que consiste de ADN que codifica resistencia a herbicidas, resistencia a antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada y contenido de celulosa;

b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir gametos machos que no tienen dicho foco de transgene.

15. Un método para reducir o eliminar transmisión de hembras de un foco de transgene en una planta que comprende:

215

a) transformar una célula de planta con un constructor de ácido nucleico donde un promotor específico a gameto hembra está operativamente enlazado a un gen suicida, donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un poli nucleótido heterólogo;

b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir gametos hembras que no tienen dicho foco de transgene.

16. Un método para reducir o eliminar transmisión de hembras de a foco de transgene en una planta que comprende:

a) transformar una célula de planta con un constructor de ácido nucleico donde un promotor específico a óvulos está operativamente enlazado a un gen suicida;

i) donde dicho gen suicida se selecciona a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria;

ii) donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un poli nucleótido heterólogo;

iii) donde dicho poli nucleótido heterólogo se selecciona a partir del grupo que consiste de ADN que codifica resistencia a herbicidas, resistencia a antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada y contenido de celulosa.

b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir gametos hembras que no tienen dicho foco de transgene.

17. La célula de planta transformada de la reivindicación 13, 14, 15 o 16, donde la célula de planta transformada es hemizigosa para el *constructor de ácido nucleico*.

18. Un constructor de ácido nucleico que comprende un promotor específico a gameto macho o gameto hembra operativamente enlazado a un gen suicida donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un elemento transponible.

19. El constructor de ácido nucleico de la reivindicación 18, que comprende adicionalmente un gen de transposasa.

20. El constructor de ácido nucleico de la reivindicación 18 o la reivindicación 19 que comprende adicionalmente un gen de interés.

21. El constructor de ácido nucleico de la reivindicación 20, donde el gen de interés está asociado con el elemento transponible.

22. Un constructor de ácido nucleico donde un promotor específico a polen o un promotor específico a óvulos está operativamente enlazado a un gen suicida seleccionado a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria; donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un transposon, donde dicho transposon comprende un marcador de selección seleccionado a partir del grupo que consiste de un gen que codifica para resistencia a herbicidas, resistencia a antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada y contenido de celulosa.

218

32. La planta transgénica de la reivindicación 31, donde la célula de planta recombinante es hemizigosa para el constructor de ácido nucleico.

33. Un método para enriquecer eventos de transposición dispersa en una población de progenie de células de planta que comprende:

a) transformar una célula de planta con el constructor de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24 para producir una célula de planta transformada;

b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir progenie de células de planta donde los eventos de transposición dispersa son enriquecidos.

34. El método de la reivindicación 33 que comprende adicionalmente:

c) aislar dicha progenie de células de planta donde los eventos de transposición dispersa son enriquecidos.

35. Una célula de planta aislada mediante el método de la reivindicación 34.

36. Una planta producida a partir de la célula de planta de la reivindicación 35.

37. La célula de planta de cualquiera de las reivindicaciones 33, 34 o 35, donde la célula de planta es hemizigosa para el ácido nucleico.

38. Un constructor de ácido nucleico que comprende un primer promotor donde el primer promotor es un promotor específico a gameto macho o gameto hembra operativamente enlazado a un gen suicida y que comprende adicionalmente un ácido nucleico que codifica una transposasa y un ácido nucleico que codifica un transposon.

39. El constructor de ácido nucleico de la reivindicación 38, donde el transposon comprende un segundo promotor operativamente enlazado a un marcador de selección, donde el marcador de selección no es un gen suicida.

40. Un constructor de ácido nucleico donde un promotor específico a polen o un promotor específico a óvulos está enlazado operativamente a un gen suicida seleccionado a partir del grupo que consiste de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria, donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida está enlazada a un ácido nucleico que codifica transposasa; donde la combinación de dicho promotor y dicho gen suicida enlazada a dicho ácido nucleico que codifica transposasa comprende un foco de transgene el cual comprende adicionalmente un transposon; donde dicho transposon comprende una secuencia de poli nucleótido que codifica un miembro seleccionado a partir del grupo que consiste de resistencia a herbicidas, resistencia a antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada y contenido de celulosa.

41. El constructor de ácido nucleico de la reivindicación 40 donde dicho promotor se selecciona a partir del grupo que consiste de de a promotor específico a polen y un promotor específico a óvulos.

220
239

42. El constructor de ácido nucleico de la reivindicación 40 donde dicho gen suicida se selecciona a partir del grupo que consiste de de barnasa, semilla de borla 2 y gen A de toxina de difteria.

43. El constructor de ácido nucleico de la reivindicación 40 donde dicho transposon comprende una secuencia de poli nucleótido que codifica un miembro seleccionado a partir del grupo que consiste de resistencia a herbicidas, resistencia a antibióticos, resistencia a insecticidas, fijación de nitrógeno, nutrición mejorada y contenido de celulosa.

44. Un vector que comprende el constructor de ácido nucleico de la reivindicación 38.

45. Un vector que comprende el constructor de ácido nucleico de la reivindicación 40.

46. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 44.

47. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 45.

48. La célula huésped de la reivindicación 46 o la reivindicación 47, donde el constructor de ácido nucleico es hemizigosa.

49. Una célula de planta recombinante que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 44 a 45.

221
221

50. La célula de planta recombinante de la reivindicación 49, donde el constructor de ácido nucleico es hemizigoso.

51. Una planta transgénica que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 44 y 45.

52. La planta transgénica de la reivindicación 51, donde el ácido nucleico es hemizigoso.

53. Un método para enriquecer establemente eventos de transposición dispersa en una población de la progenie de células de planta que comprende:

a) transformar una célula de planta con un constructor de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 43 para producir una célula de planta transformada;

b) propagar dicha célula de planta transformada a través de meiosis para producir una progenie de células de planta donde eventos de transposición dispersa estables son enriquecidos.

54. El método de la reivindicación 53 que comprende adicionalmente:

c) aislar dicha progenie de células de planta donde los eventos de transposición dispersa estable son enriquecidos.

55. Una célula de planta aislada mediante el método de la reivindicación 54.

EXTRACTO

Se divulgan construcciones genéticas y métodos para la producción, mantenimiento y control de transgenes en organismos eucarióticos transgénicos que sufren meiosis donde polen o esperma puede cruzarse; esto incluye: animales transgénicos, células de plantas, tejidos de plantas y toda la planta. Más específicamente, esta invención relates con el control de transmisión de transgenes mediante gametos o gametofitos macho y/o hembra que usan un rasgo de esterilidad gametofítica (GST). Las construcciones genéticas y metodologías de la presente invención proporcionan la habilidad de controlar el indeseado esparcimiento de transgenes. Adicionalmente, esta invención también proporciona las herramientas y metodologías para enriquecer una planta u otro genoma eucariótico para eventos de transposición dispersa y/o estable.