

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

METODOS Y COMPOSICIONES PARA LA REGULACION SELECTIVA DE LA EXPRESION DE PROTEINAS

2 Datos del Solicitante / Titular

Nombre:	MONSANTO TECHNOLOGY LLC	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:	800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD, ST. LOUIS, MISSOURI, 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA - MISSOURI - ST. LOUIS
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT			
Número:	2213537357-		

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1. MONSANTO TECHNOLOGY LLC	EE	2213537357

4 Datos del Inventor

Nombre:		JINTAI HUANG	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:		800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST. LOUIS, MO 63167 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA - MISSOURI - ST. LOUIS
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica				
Número:		-		
5	Inventor(es)			
Apellidos - Nombres		Domicilio		
1.	HUANG JINTAI	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA		
2.	IVASHUTA SERGEY	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA		
3.	QI YOULIN	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA		
4.	WIGGINS BARBARA E.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA		
5.	ZHANG YUANJI	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA		
6	Datos Inventor(es)			
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	ST. LOUIS	800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST. LOUIS, MO 63167 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

2.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	SAINT LOUIS	800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST. LOUIS, MO 63167 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	SAINT LOUIS	800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST. LOUIS, MO 63167 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	SAINT LOUIS	800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST. LOUIS, MO 63167 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
5.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MISSOURI	SAINT LOUIS	800 NORTH LINDBERGH BLVD., ST. LOUIS, MO 63167 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:		CALLE 94A No. 7A-09	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE				
Número:		39779654-		
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/US2012/045040	Fecha Solicitud:	29/06/2012
Número Publicacion:		WO2013/006472 A1	Fecha Publicacion:	10/01/2013
9	Declaraciones de prioridad			☒ SI ☐ NO

1.	(33) País de origen ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	Codigo del país US	(31) No. Solicitud 61/504,102	(32) Fecha 01/07/2011
10	Reivindicaciones			
	Número reivindicaciones:	31	Pago Reivindicaciones:	Si
11	Reducción de tasas.			
	<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
	☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
12	Documentos Anexos			
	☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☐ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☒ Listado de secuencias ☐ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos			

FIGURA 1

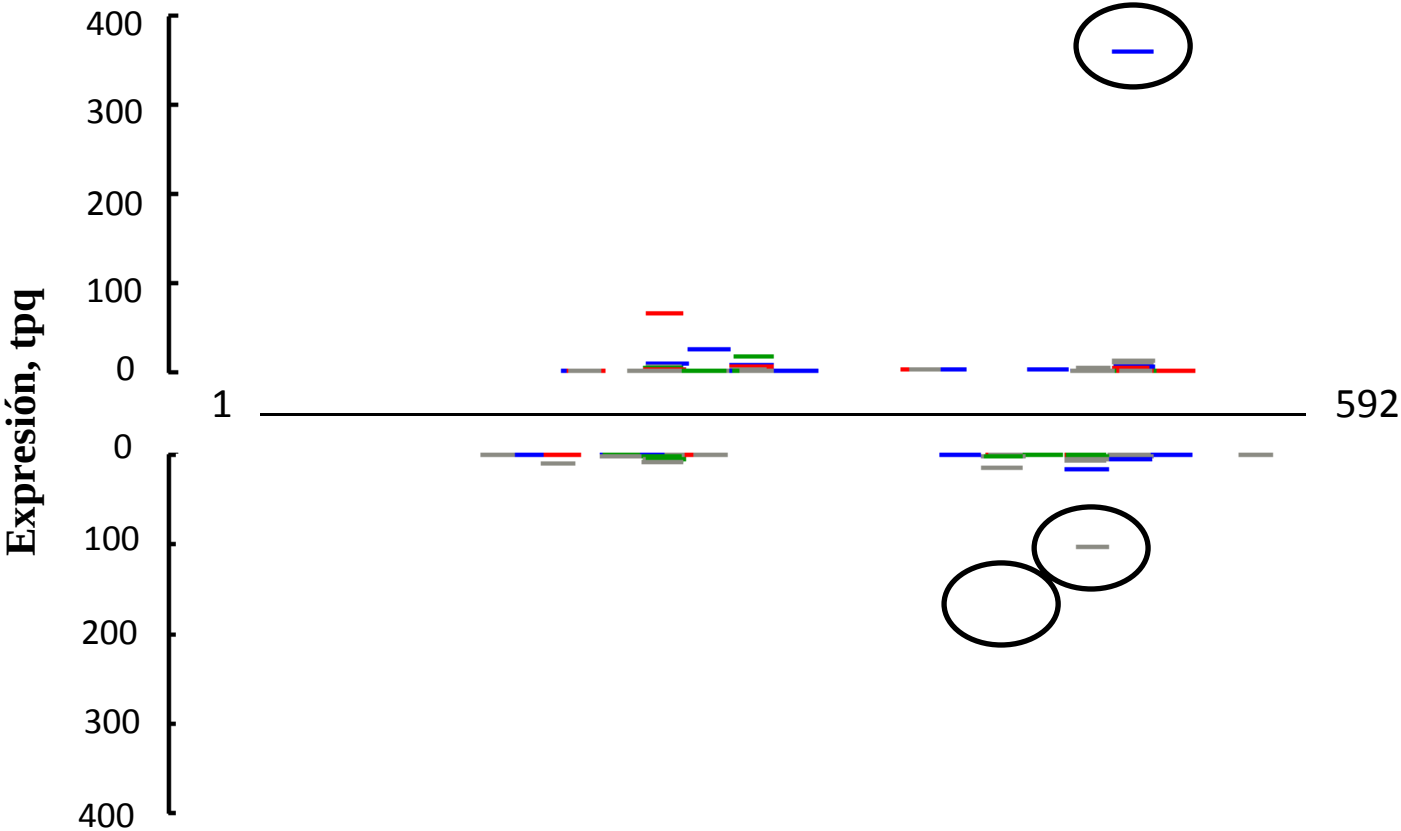
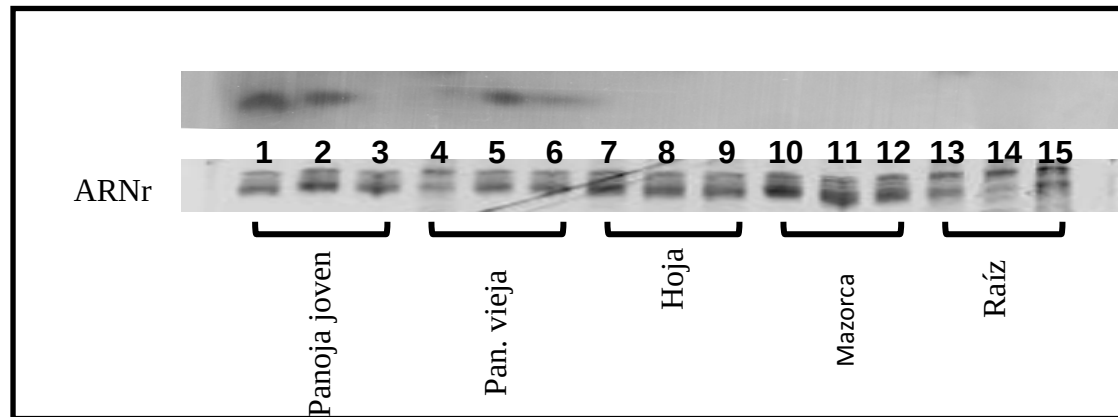


FIGURA 2



Muestra #	nombre de la muestra
1	91DUA6 Panoja Joven
2	01DKD2 Panoja Joven
3	LH244 Panoja Joven
4	91DUA6 Panoja vieja
5	01DKD2 Panoja vieja
6	LH244 Panoja vieja
7	91DUA6 Hoja
8	01DKD2 Hoja
9	LH244 Hoja
10	91DUA6 Mazorca
11	01DKD2 Mazorca
12	LH244 Mazorca
13	91DUA6 Raíz
14	01DKD2 Raíz
15	LH244 Raíz

FIGURA 3

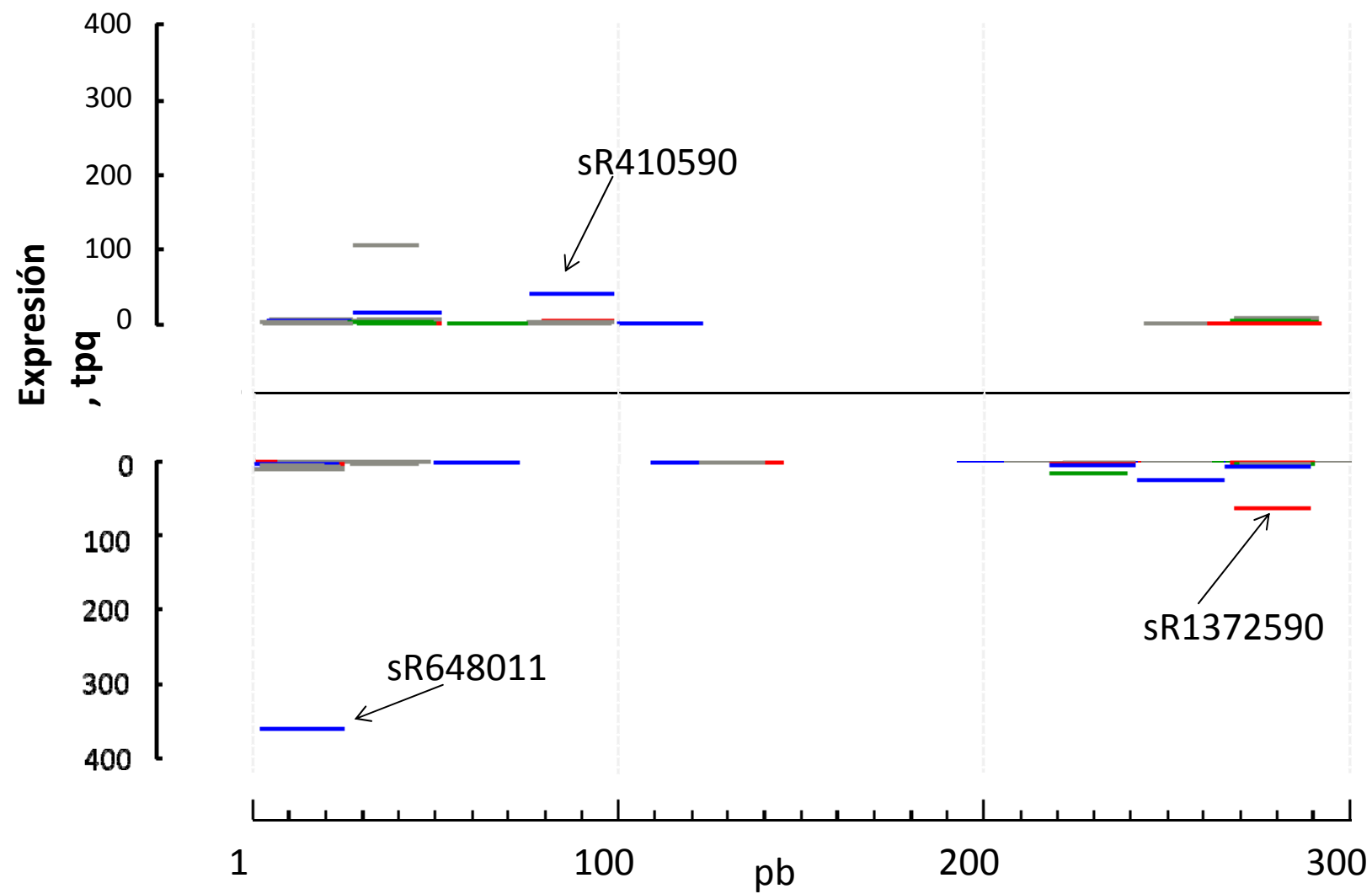


FIGURA 4

Lane	Inbred
1	C3SUD402
2	HIQA202
3	BEBE788
4	BIQA207
5	DIDA404
6	5DA92
7	DIDA406
8	80DJD5
9	JEDO115
10	FIDA240
11	BIQA347
12	HOQA203
13	91DUA6
14	BIDA345
15	01DKD2
16	DIDA403
17	64DJD1
18	DIQA423
19	BIQA208
20	LH244
21	BIQA208 - hoja
22	LH244- hoja
23	BIQA208 –maz.
24	LH244 –maz.

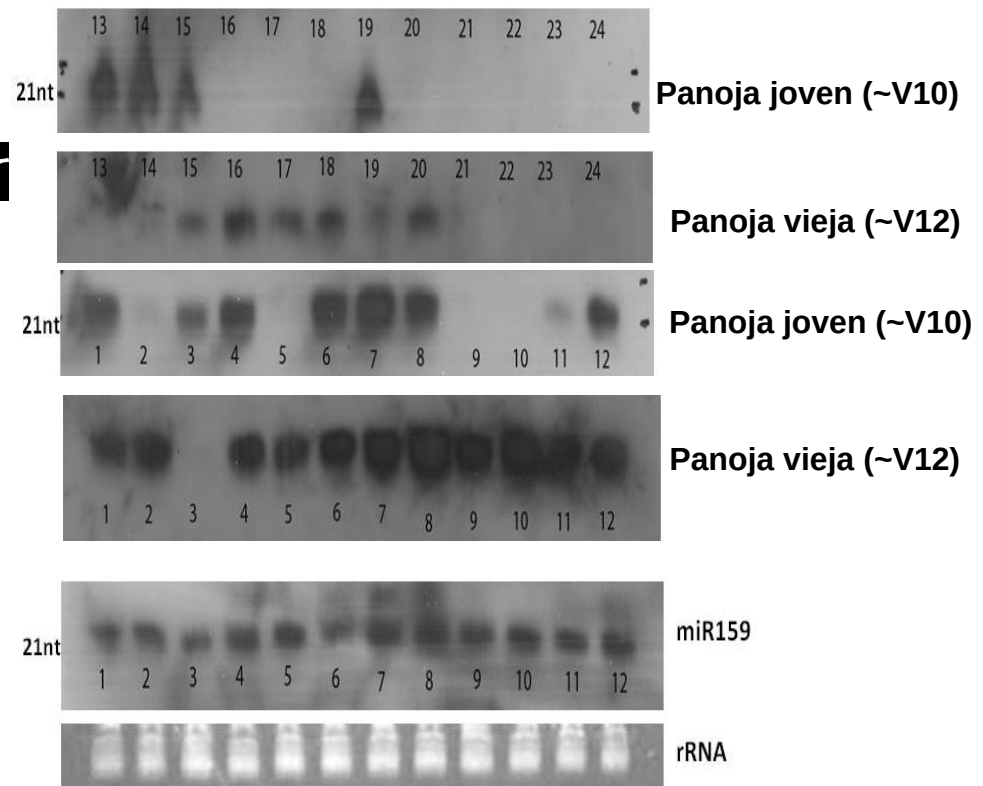
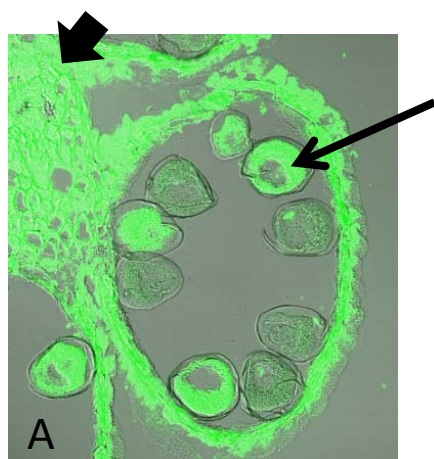


FIGURA 5



FIGURA 6

Constructo 4



Constructo 3

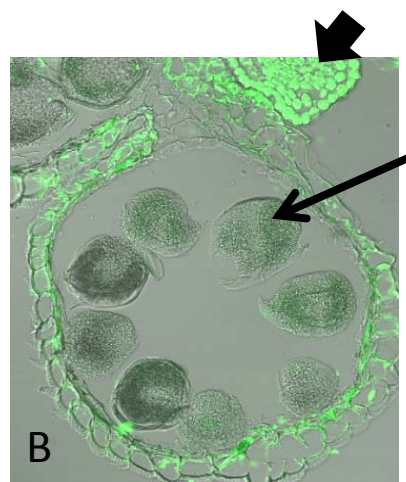


FIGURA 7

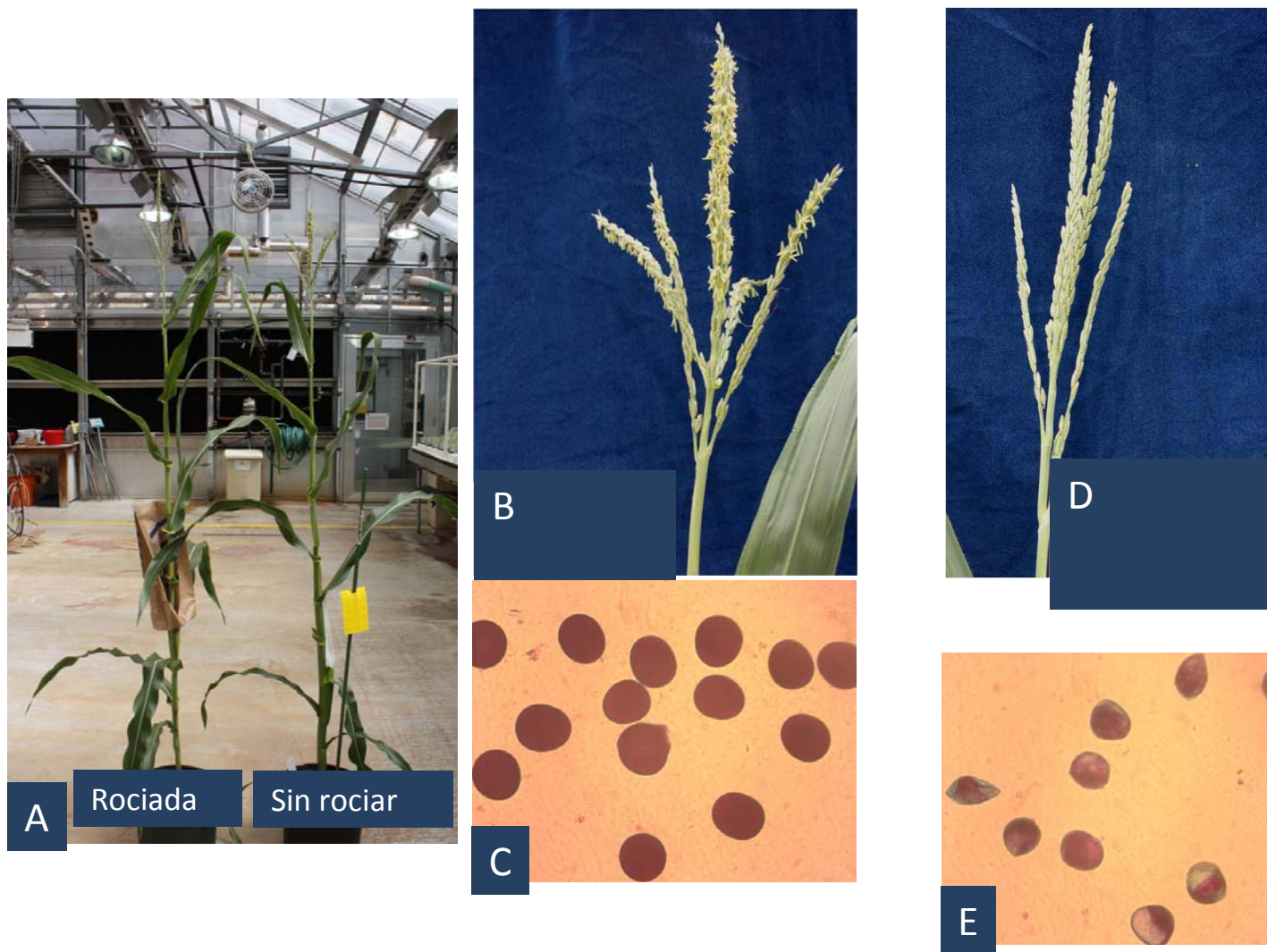


FIGURA 8

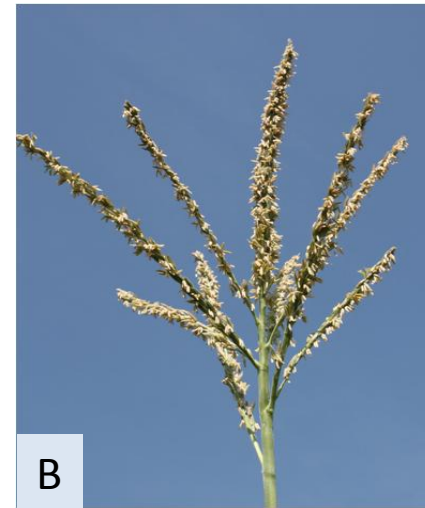
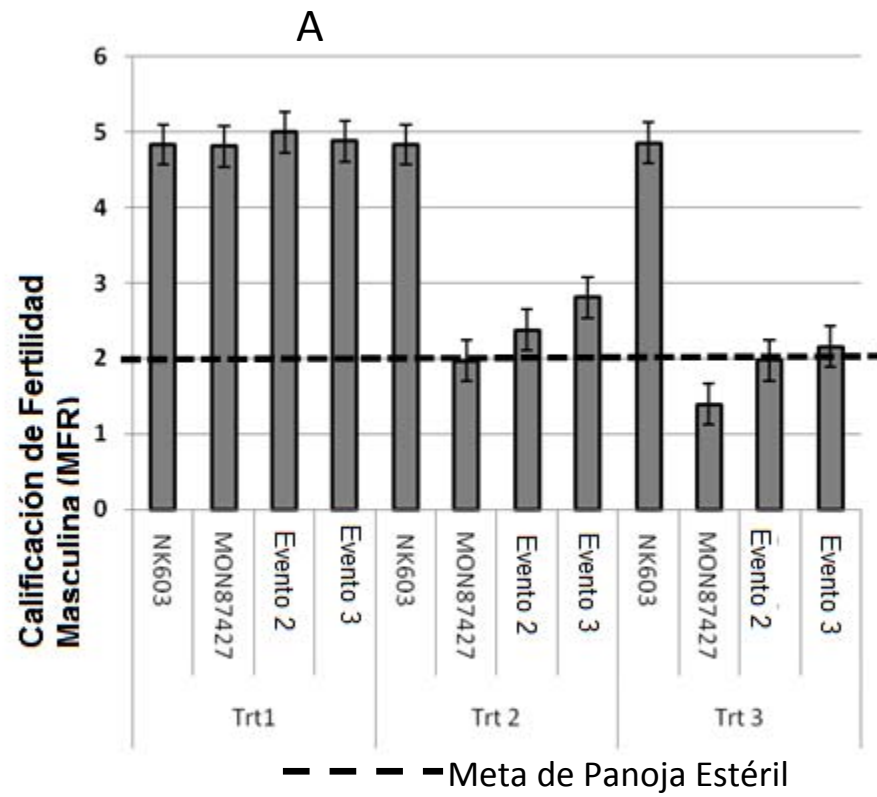


FIGURA 9

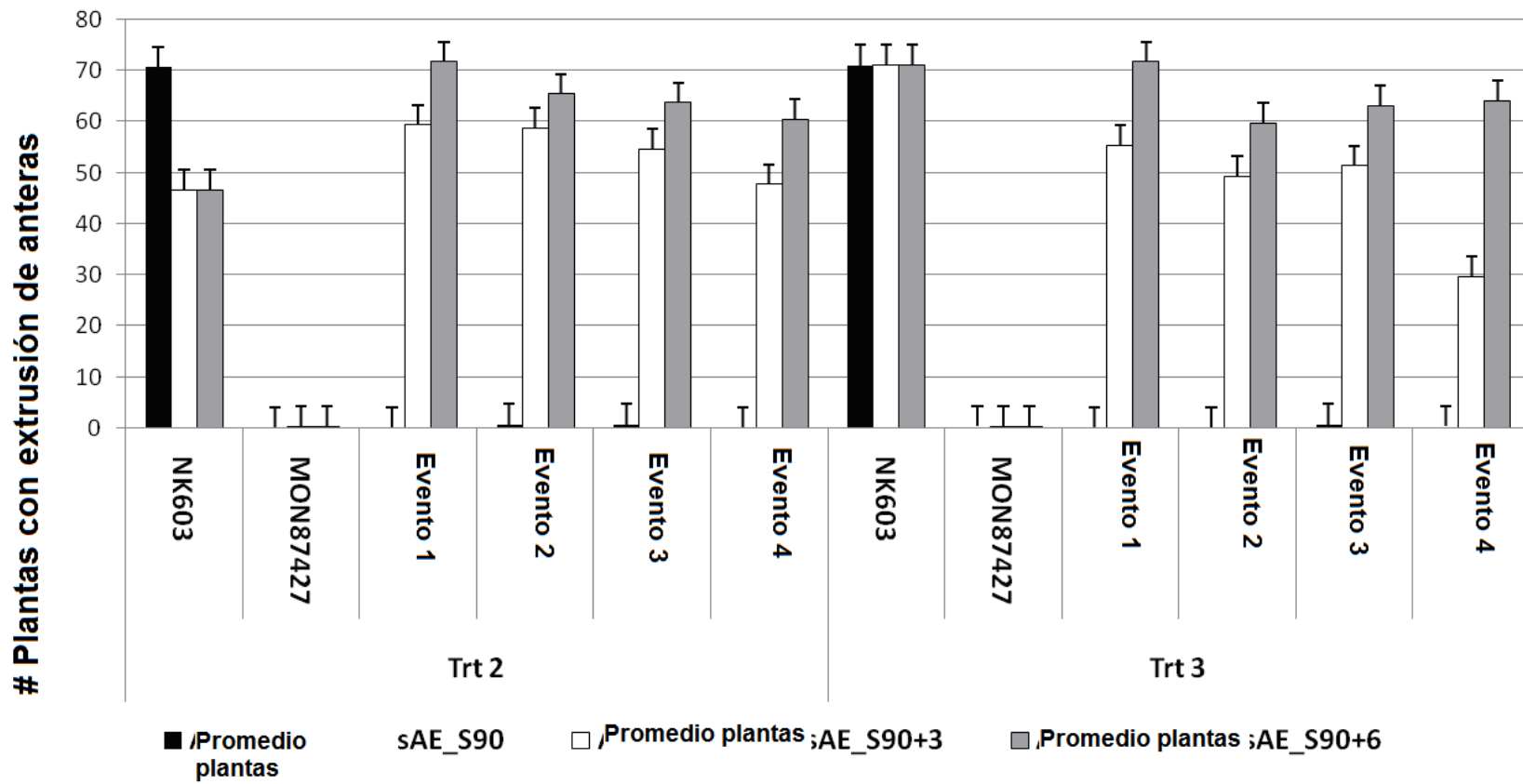


FIGURA 10

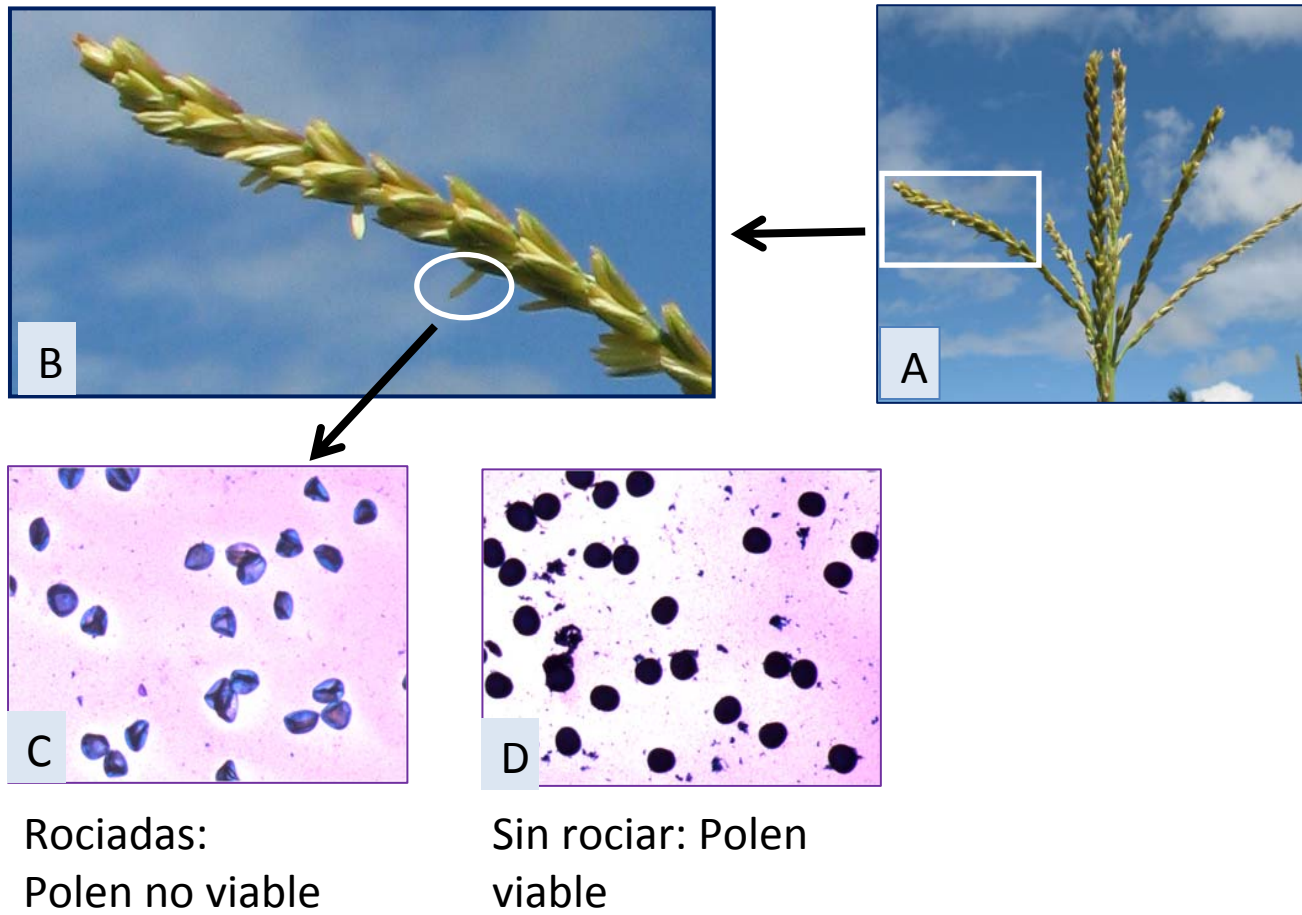


FIGURA 11

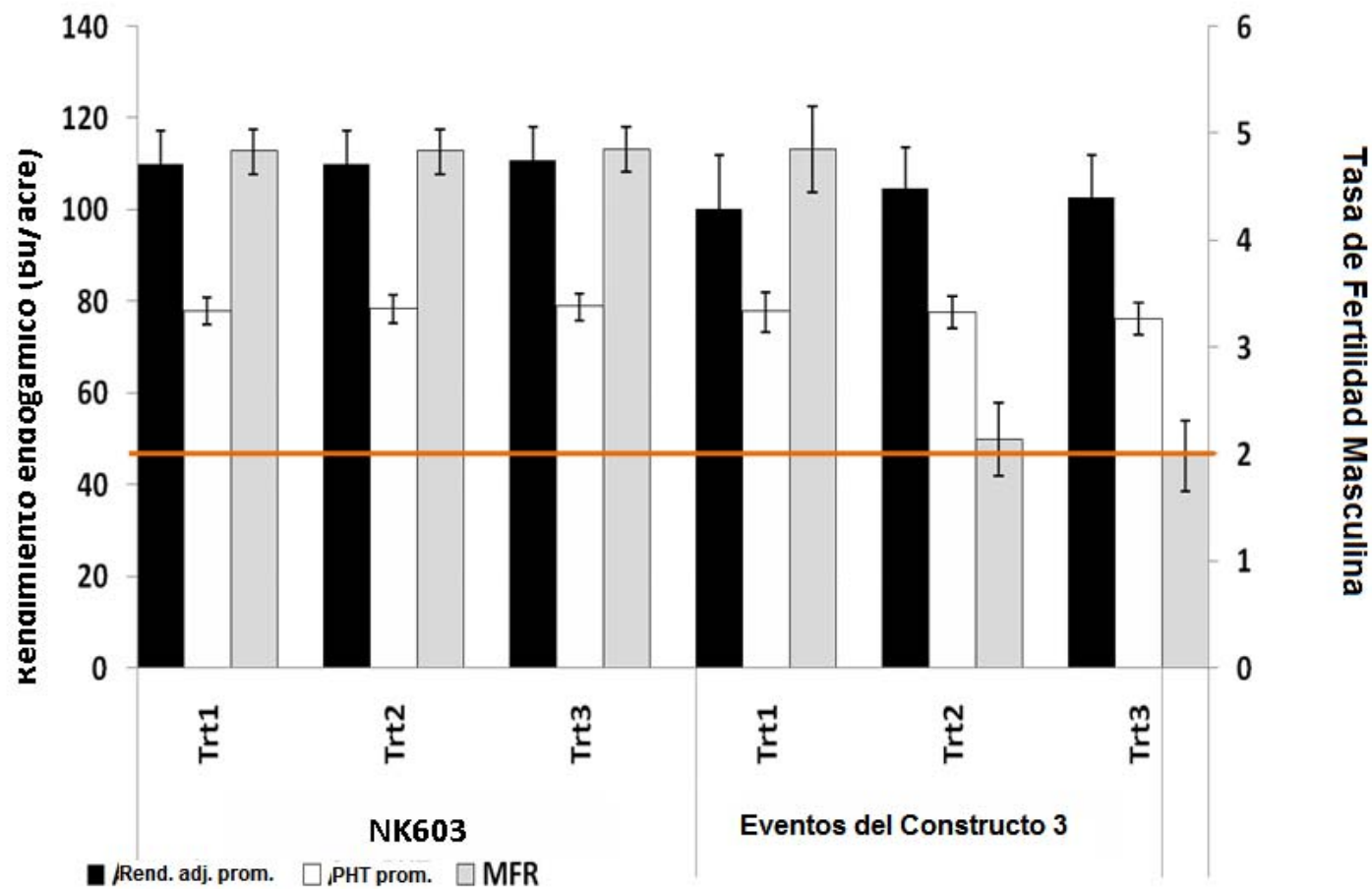


FIGURA 12

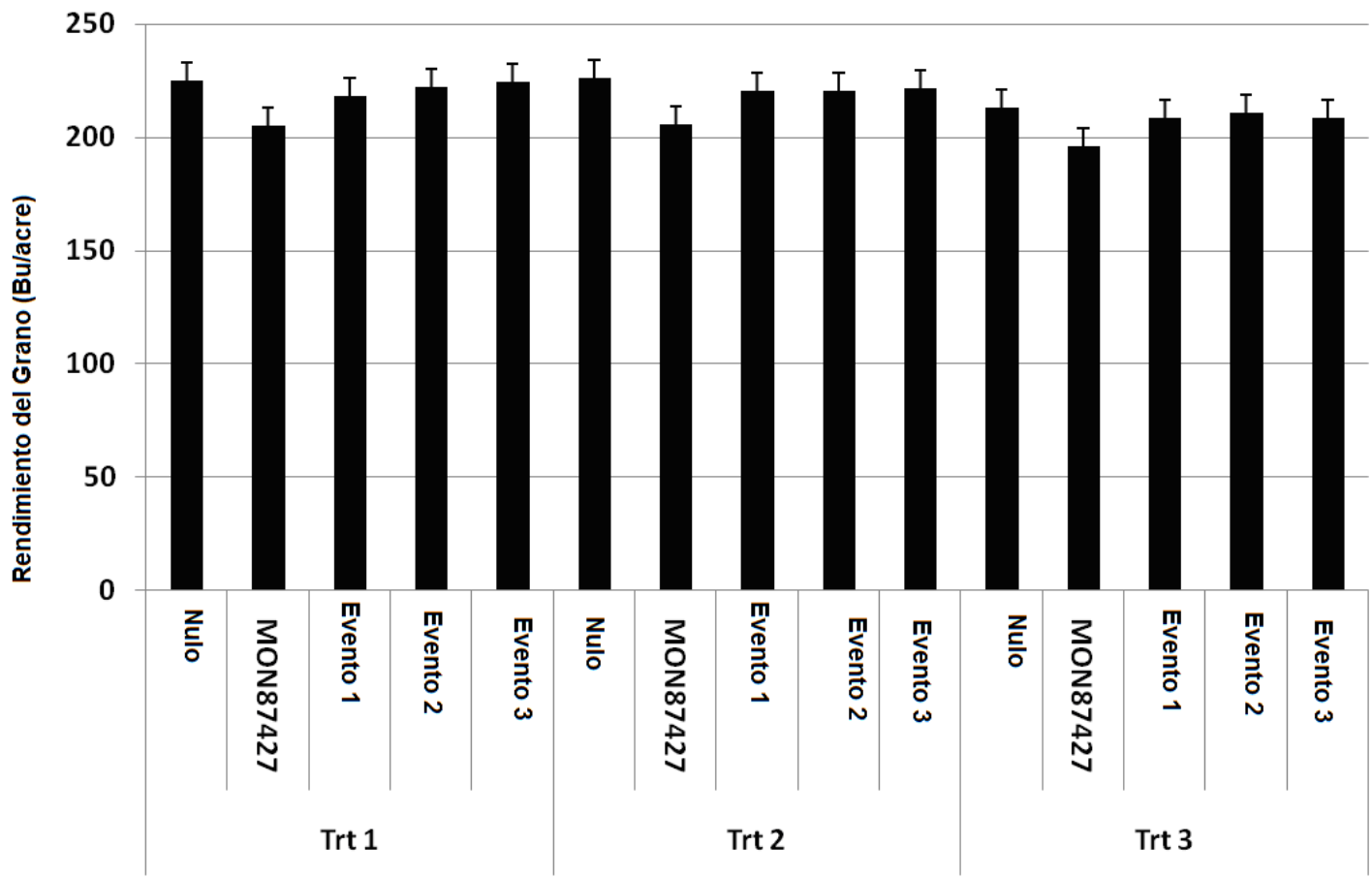
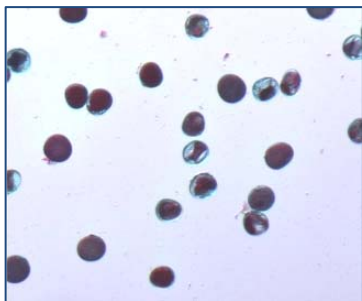
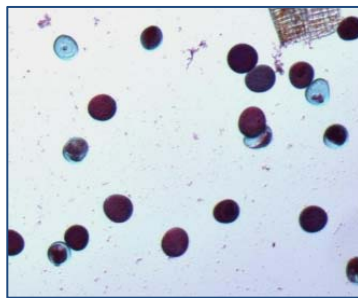


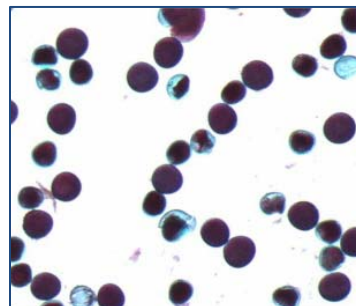
FIGURA 13



Nulo x MON88017



MON87427 x MON88017



Evento 3 x MON88017

FIGURA 14

promotor	secuencia codif. de proteína	elemento mts-siRNA*	3' UTR
----------	------------------------------	---------------------	--------

*Una o más seleccionada de SEC ID NOs:57-94 and 96-104

promotor	intrón	péptido de tránsito	SEC ID NO:95	SEC ID NO:81	3' UTR
----------	--------	---------------------	--------------	--------------	--------



- (51) **International Patent Classification:**
C07H 21/04 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/US2012/045040
- (22) **International Filing Date:**
29 June 2012 (29.06.2012)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
61/504,102 1 July 2011 (01.07.2011) US
- (71) **Applicant** (for all designated States except US):
MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US).
- (72) **Inventors; and**
- (75) **Inventors/Applicants** (for US only): **HUANG, Jintai** [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). **IVASHUTA, Sergey** [RU/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). **QI, Youlin** [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). **WIGGINS, Barbara, E.** [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US). **ZHANG, Yuanji** [US/US]; 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167 (US).

- (74) **Agent:** **HANSON, Robert, E.**; SNR Denton US LLP, 7800 Willis Tower, 233 South Wacker Dr., Chicago, IL 60606 (US).

- (81) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) **Title:** METHODS AND COMPOSITIONS FOR SELECTIVE REGULATION OF PROTEIN EXPRESSION

(57) **Abstract:** The invention provides methods and compositions for selectively suppressing the expression of a recombinant protein in a male reproductive tissue of a transgenic plant. The invention also provides methods and compositions for inducing male sterility in a transgenic plant. Plants, plant cells, plant parts, seeds, and commodity products including such compositions are aspects of the invention.



TITLE OF THE INVENTION

METHODS AND COMPOSITIONS FOR SELECTIVE REGULATION OF PROTEIN EXPRESSION

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims the benefit of priority of U. S. Provisional Patent Application 61/504,102, which was filed on 1 July 2011, which is incorporated herein by reference in its entirety.

INCORPORATION OF SEQUENCE LISTING

[0002] The sequence listing contained in the file named "MONS294WO.txt", which is 41 kilobytes (size as measured in Microsoft Windows®) and was created on June 29, 2012, is filed herewith by electronic submission and is incorporated by reference herein.

FIELD OF THE INVENTION

[0003] The invention relates generally to the fields of agriculture, plant breeding, and molecular biology. More specifically, the invention relates to methods and compositions for selectively suppressing recombinant protein expression in the male reproductive tissue of transgenic plants and uses thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0004] Hybrid seed, that is, seed produced by hybridization or cross-fertilization of closely related plants, can be grown into progeny hybrid plants possessing a desirable combination of traits not possessed by either parent plant. Hybrid plants can display superior agronomic characteristics, including improvement of plant size, yield, nutritional composition, disease resistance, herbicide tolerance, stress tolerance, climatic adaptation, and other desirable traits. Efficient hybrid seed production requires that a plant's own pollen not be permitted to self-fertilize the plant.

[0005] In hybrid seed production, pollen production and/or shed may be prevented in a female parent plant in order to facilitate cross-pollination of the female rather than self-pollination. Such prevention may be achieved by, for example, manual removal of the pollen-containing structures (*e.g.*, manual or mechanical detasseling in corn), use of a genetic means of pollination control (*e.g.*, cytoplasmic male sterile, nuclear male sterile), and/or use of a chemical agent.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0006] The invention relates generally to methods of selectively suppressing recombinant protein expression in the male reproductive tissue of transgenic plants, recombinant DNA constructs useful in such methods, as well as transgenic plants, cells, and seeds containing such recombinant DNA constructs. The recombinant DNA constructs and the transgenic plants, cells, and seeds containing such constructs provide a greatly improved way to use herbicides for inducing male sterility in transgenic plants for the production of hybrid seed.

[0007] In one aspect, the invention provides a recombinant DNA construct that includes a protein-coding sequence encoding a recombinant protein and a male tissue-specific siRNA (mts-siRNA) element operably linked to the protein-coding sequence. In one embodiment, the mts-siRNA element is included within the 3' untranslated region of the protein-coding sequence. In another embodiment, the mts-siRNA element is located between the protein-coding sequence and a polyadenylation sequence which is part of a 3' untranslated region. In another embodiment, the mts-siRNA element includes at least one mts-siRNA sequence. In another embodiment, the mts-siRNA element includes at least one mts-siRNA sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-56 and 105-149. In another embodiment, the mts-siRNA element is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 57-94 and 96-104. In another embodiment, the expression of the recombinant protein in a transgenic plant confers at least vegetative herbicide tolerance to the plant. In another embodiment, the recombinant protein is a glyphosate-tolerant EPSPS.

[0008] Another aspect of the invention provides a method of making a recombinant DNA construct including identifying an mts-siRNA element including at least one mts-siRNA sequence and operably linking the mts-siRNA element to a protein-coding sequence, for instance a DNA sequence encoding a recombinant protein. In one embodiment, the mts-siRNA element includes at least one mts-siRNA sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-56 and 105-149 or is at least one mts-siRNA element selected from the group consisting of SEQ ID NO: 57-94 and 96-104. In another embodiment, the mts-siRNA element is tassel-specific.

[0009] In a further aspect, the invention provides a transgenic plant including a recombinant DNA construct of the invention, as well as a seed, cell, or part of the transgenic plant. In one embodiment, the plant is a monocotyledonous plant. In another embodiment, the plant is a maize (*Zea mays*) plant.

[0010] In a further aspect, the invention also provides a method of selectively suppressing the expression of a recombinant protein in a male reproductive tissue of a transgenic plant by expressing in the transgenic plant a recombinant DNA construct that includes a protein-coding sequence operably linked to a DNA sequence including an mts-siRNA element. In one embodiment, the mts-siRNA element includes at least one mts-siRNA sequence. In another embodiment, the male reproductive tissue is a tassel of a maize plant. In another embodiment, the mts-siRNA element includes at least one mts-siRNA sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-56 and 105-149. In another embodiment, the mts-siRNA element is at least one element selected from the group consisting of SEQ ID NO: 57-94 and 96-104. In another embodiment, the expression of the recombinant protein in a transgenic plant confers at least vegetative herbicide tolerance to the plant. In another embodiment, the recombinant protein is a glyphosate-tolerant EPSPS.

[0011] The invention also provides a method of inducing male sterility in a transgenic plant, including the step of applying herbicide to a transgenic plant that has in its genome a recombinant DNA construct comprising a protein-coding sequence operably linked to a DNA sequence including an mts-siRNA element that confers at least vegetative herbicide tolerance to the transgenic plant, wherein the herbicide is applied during the development of the male reproductive tissue of the transgenic plant thereby inducing male-sterility in the transgenic plant. In one embodiment, the transgenic plant is a maize plant. In another embodiment, the herbicide application prevents at least pollen shed or anther extrusion in the treated transgenic plant. In another embodiment, the development stage of the male reproductive tissue during which herbicide is applied is a stage selected from the group consisting of the V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13, and V14 stage of maize plant development. In another embodiment, the herbicide is selected from the group consisting of acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibitors, acetolactate synthase (ALS) inhibitors, photosystem II (PSII) inhibitors, protoporphyrinogen oxidase (PPO) inhibitors, 4-hydroxyphenyl dioxygenase (HPPD) inhibitors, 5-enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase (EPSPS) inhibitors, glutamine synthetase (GS) inhibitors, and synthetic auxins. In another embodiment, the herbicide is glyphosate and the recombinant protein is a glyphosate-tolerant EPSPS.

[0012] The invention also provides a method of producing hybrid seed including applying an effective amount of an herbicide to a transgenic plant including in its genome a recombinant DNA construct comprising a protein-coding sequence operably linked to a DNA sequence including an mts-siRNA element, wherein the herbicide is applied during the

development of the male reproductive tissue of the transgenic plant thereby inducing male sterility in the transgenic plant; fertilizing the transgenic plant with pollen from a second plant; and harvesting hybrid seed from the transgenic plant. In one embodiment, the transgenic plant is maize. An effective amount of an herbicide is a dose of herbicide sufficient to render a transgenic plant comprising a recombinant DNA construct of the invention male sterile (an effective dose). In another embodiment, the herbicide is glyphosate and the recombinant protein is a glyphosate-tolerant EPSPS. In another embodiment, the glyphosate is applied during the development at an effective dose of about 0.125 pounds acid equivalent per acre to about 8 pounds acid equivalent per acre. Other specific embodiments of the invention are disclosed in the following detailed description. Throughout this specification and the claims, unless the context requires otherwise, the word “comprise” and its variations, such as “comprises” and “comprising”, will be understood to imply the inclusion of a stated integer, element, or step or group of integers, elements, or steps, but not the exclusion of any other integer, element, or step or group of integers, elements, or steps.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0013] **Figure 1** depicts mapping of mts-siRNA sequences on an mts-siRNA element (SEQ ID NO: 85), as described in Example 1. The X-axis from left to right represents the orientation of the mts-siRNA element with the top strand represented in the top half of the chart and the bottom strand represented in the bottom half of the chart; the nucleotide position from 5' to 3' orientation is shown from left to right on the top and from right to left on the bottom. The mts-siRNA sequences are shown in their relative alignment positions. The Y-axis represents the relative abundance of the mts-siRNA expressed in tassel tissue as transcripts per quarter million sequences (tpq). The mts-siRNA that were highly represented in the library are circled.

[0014] **Figure 2** depicts Northern blot analysis to measure tassel-specific sRNA expression, as described in Example 2.

[0015] **Figure 3** depicts mapping of mts-siRNA sequences on an mts-siRNA element (SEQ ID NO: 87), as described in Examples 2 and 8. The X-axis from left to right represents the orientation of the mts-siRNA element with the top strand represented in the top half of the chart and the bottom strand represented in the bottom half of the chart; the nucleotide position from 5' to 3' orientation is shown from left to right on the top and from right to left on the bottom. The mts-siRNA sequences are shown in their relative alignment positions. The three mts-siRNA sequences used to design three specific probes (sR648011

(SEQ ID NO: 8), sR1372590 (SEQ ID NO: 26), and sR410590 (SEQ ID NO: 33)) are indicated.

[0016] **Figure 4** depicts Northern blot analysis of tassel maturity temporal expression of an mts-siRNA element (SEQ ID NO: 87) using RNA from different inbred germplasm, as described in Example 2.

[0017] **Figure 5** depicts *in situ* localization of siRNA expression in mature anther using antisense (left panel) or sense (right panel) probes for an mts-siRNA sequence (sR648011, SEQ ID NO: 8), as described in Example 2

[0018] **Figure 6** depicts CP4-EPSPS protein localization in anthers from unsprayed plants transgenic for construct 3 (Figure 6A) or construct 4 (Figure 6B), as described in Example 4. Construct 3 transgenic maize plants contain a CP4-EPSPS/mts-siRNA element expression cassette. Construct 4 plants are a control.

[0019] **Figure 7** depicts transgenic maize plants generated from constructs containing a CP4-EPSPS/mts-siRNA element expression cassette, which were vegetatively tolerant to glyphosate and had induced male-sterility with late application of glyphosate, as described in Example 7. Figure 7A shows glyphosate-sprayed and unsprayed transgenic maize plants. Figure 7B shows tassels from unsprayed transgenic plants, and Figure 7C shows pollen grains from unsprayed transgenic plants. Figure 7D shows tassels from sprayed transgenic plants, and Figure 7E shows pollen grains from sprayed transgenic plants.

[0020] **Figure 8** depicts data for one year of field trials measuring Male Fertility Rating (MFR) following late glyphosate spray. Figure 8A shows average MFR produced under three different glyphosate spray treatment regimens (Trt 1, Trt 2, and Trt 3) for NK603 (CP4-EPSPS transgenic maize), MON 87427 (CP4-EPSPS transgenic maize with glyphosate-inducible male-sterility), and two events from construct 3, as described in Example 5; the dashed line indicates the industry standard for male-sterility, MFR 2. Figure 8B depicts a tassel from a plant treated with a weed-only spray treatment. Figure 8C depicts a tassel from a plant treated with a late glyphosate spray treatment for inducing male-sterility.

[0021] **Figure 9** depicts field trial results measuring the number of plants per plot with male-sterility measured by anther extrusion through S90, at S90+3, and at S90+6 under two different glyphosate spray treatment regimens (Trt 2 and Trt 3) for NK603 (CP4-EPSPS transgenic maize), MON 87427 (CP4-EPSPS transgenic maize with glyphosate-inducible male-sterility), and four events from construct 3, as described in Example 5.

[0022] **Figure 10** depicts results of pollen viability studies as described in Example 5. Figures 10A and 10B show an example of late breaking anther extrusion in tassel from a

sterility sprayed construct 3 event. The box in Figure 10A is the portion magnified in Figure 10B. An example of late breaking anther extrusion is circled in Figure 10B. Alexander staining of pollen from sterility-sprayed, late breaking extruded anther of sprayed construct 3 events shows only non-viable pollen (translucent light blue, irregular shape pollen grains) (Figure 10C). Pollen from non-sprayed construct 3 anthers was fully viable and appears opaque, dark purple and spherical with Alexander stain (Figure 10D).

[0023] Figure 11 depicts results of field trial testing of NK603 plants and construct 3 events for inbred grain yield and male fertility, as described in Example 6. Inbred yield was measured as bushels/acre (Bu/acre) and induced male-sterility was measured as Male Fertility Rating (MFR). The horizontal bar indicates the industry standard for male-sterility, MFR 2. Trt 1, Trt 2, and Trt 3 refer to treatment regimens 1, 2, and 3.

[0024] Figure 12 depicts results of field trial testing of a non-transgenic female inbred (Null), line MON87427, and three events from construct 3, all in the same genetic background, which were cross pollinated with a male MON810/MON88017 tester to generate F1 hybrid seed. Hybrid grain yield was measured as bushels/acre (Bu/acre). Trt 1, Trt 2, and Trt 3 refer to treatment regimens 1, 2, and 3.

[0025] Figure 13 depicts pollen grain analysis from F1 hybrid plants, as described in Example 7. The panels show Alexander staining results of pollen from three different F1 hybrid crosses: non-transgenic female x MON88017 male; MON87427 female x MON88017 male; and construct 3 event female x MON88017 male. Tassel fertility was functionally restored in F1 hybrids produced from construct 3 event plants using MON88017 pollen.

[0026] Figure 14 depicts schematic drawings of embodiments of recombinant DNA constructs (shown in 5' to 3' direction from left to right) including (top) a protein-coding sequence (*e.g.*, DNA encoding a glyphosate-resistant EPSPS) operably linked to a DNA sequence comprising an mts-siRNA element (*e.g.*, one or more selected from the group consisting of SEQ ID NO: 57-94 and 96-104) (top). In a non-limiting specific embodiment (bottom) the recombinant DNA construct includes a promoter operably linked to, in order, an intron, a transit peptide, CP4-EPSPS encoded by SEQ ID NO: 95, an mts-siRNA element (SEQ ID NO: 81), and a 3'UTR.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

RECOMBINANT DNA CONSTRUCTS

[0027] The invention provides compositions and methods for selectively suppressing recombinant protein expression in a male reproductive tissue of a transgenic

plant and uses thereof. In one aspect, the invention provides a recombinant DNA construct that includes a protein-coding sequence operably linked to a DNA sequence including an mts-siRNA element, *i.e.* a chimeric transgene including a protein-coding sequence encoding the recombinant protein and at least one mts-siRNA element operably linked to the protein-coding sequence. In one embodiment, such recombinant DNA constructs are useful for selectively suppressing the expression of a recombinant protein in a male reproductive tissue of a transgenic plant. In one aspect, the invention provides a recombinant DNA molecule comprising the recombinant DNA construct and methods of use thereof. Nucleic acid sequences can be provided as DNA or as RNA, as specified; disclosure of one necessarily defines the other, as is known to one of ordinary skill in the art. Furthermore, disclosure of a given nucleic acid sequence necessarily defines the exact complement of that sequence, as is known to one of ordinary skill in the art.

[0028] A “male tissue-specific siRNA” or “mts-siRNA” is a small RNA (sRNA) of about 18 to about 26 nucleotides (*e.g.*, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 or 26 nucleotides) enriched or specifically expressed in the male reproductive tissue(s) (*e.g.*, male inflorescence) of a plant, *i.e.*, having an male tissue-specific expression pattern. Male tissue-specific siRNA are naturally occurring in plants and can be detected using techniques known in the art, such as low molecular weight northern analysis. A DNA sequence that is complementary to an mts-siRNA is referred to herein as an “mts-siRNA sequence”. Examples of mts-siRNA sequences for endogenous plant mts-siRNA are provided as SEQ ID NO: 1-56 and 105-149. In an embodiment, an mts-siRNA sequence is the exact DNA complement (with no mismatches) to a given mts-siRNA. In other embodiments, an mts-siRNA sequence varies by 1-3 nucleotide mismatches compared to a given mts-siRNA and nonetheless has sufficient complementarity to bind or hybridize, *e.g.*, under typical physiological conditions, to that mts-siRNA. “Complementarity” refers to the capability of nucleotides on one polynucleotide strand to base-pair with nucleotides on another polynucleotide strand according to the standard Watson-Crick complementarity rules (*i.e.*, guanine pairs with cytosine (G:C) and adenine pairs with either thymine (A:T) or uracil (A:U); it is possible for intra-strand hybridization to occur between two or more complementary regions of a single polynucleotide. When included in a recombinant DNA construct as described herein, an mts-siRNA is capable of RNAi-mediated suppression or disruption of the expression of a gene and/or protein.

[0029] At least one, at least two, at least three, or more than three mts-siRNA sequences can be clustered together or even overlap within a single DNA molecule. Such a

DNA molecule is referred to herein as a “male tissue-specific siRNA element” or “mts-siRNA element” and is defined as including at least one, at least two, at least three, or more than three mts-siRNA sequences within an about 500 nucleotide sequence window. An mts-siRNA element can be any length, such as about 20 nucleotides (nt), about 25 nt, about 30 nt, about 40 nt, about 50 nt, about 60 nt, about 70 nt, about 80 nt, about 100 nt, about 150 nt, about 200 nt, about 250 nt, about 300 nt, about 350 nt, about 400 nt, about 450 nt, about 500 nt, about 550 nt, or about 600 nt.

[0030] A recombinant DNA construct of the invention is a DNA molecule including at least a protein-coding sequence operably linked to a DNA sequence including an mts-siRNA element. The term “recombinant” refers to a molecule or a cell or organism that man-made through genetic engineering and as such is the product of human activity and would not otherwise normally occur in nature. As used herein, a recombinant DNA construct is a recombinant DNA molecule including two or more heterologous DNA sequences. The term “heterologous” refers to the relationship between two or more nucleic acid or protein sequences that are derived from different sources (*e.g.*, from different locations in a genome, or from different species). In one example, a promoter and a protein-coding DNA sequence are heterologous with respect to each other if the promoter is not the native promoter of the protein-coding DNA sequence. In another example, a protein-coding sequence is heterologous with respect to an mts-siRNA element if such a combination is not normally found in nature, such as a plant mts-siRNA element operably linked to a gene for herbicide tolerance, such as CP4-EPSPS. In addition, a particular sequence can be “heterologous” with respect to a cell or organism into which it is introduced (*i.e.*, a sequence that does not naturally occur in that particular cell or organism).

[0031] The term “operably linked” refers to two polynucleotide molecules linked in manner so that one can affect the expression of the other. For example, a first polynucleotide molecule is operably linked with a second polynucleotide molecule where the polynucleotide molecules are so arranged that the first polynucleotide molecule can affect the expression of the second polynucleotide molecule. The two polynucleotide molecules can be part of a single contiguous polynucleotide molecule and can be adjacent or separated. For example, an mts-siRNA element is operably linked to a protein-coding sequence if, after transcription in male reproductive tissue cell, the presence of the mts-siRNA element results in the suppression of recombinant protein expression in the cell. Operable linkage of the protein-coding sequence and the mts-siRNA element can be achieved, for example, through incorporation of an mts-siRNA element adjacent to the protein-coding sequence (such as

located 5' or 3' to the protein-coding sequence, but not necessarily in contiguous linkage), in or adjacent to an untranslated region (UTR) of the recombinant DNA construct (such as located in or next to the 5' UTR or the 3' UTR), and/or after the protein-coding sequence and before the polyadenylation signal. In one embodiment, one or more mts-siRNA elements are located between the protein-coding sequence and the polyadenylation sequence, *i.e.*, 3' to and adjacent to the protein-coding sequence. In another embodiment, one or more mts-siRNA elements are located between the stop codon of the protein-coding sequence and the polyadenylation sequence. In another embodiment, one or more mts-siRNA elements are located within the 3' UTR sequence adjacent to the protein-coding sequence.

[0032] The DNA sequence of the mts-siRNA element can be varied by using different combinations and locations of individual mts-siRNA sequences and/or by incorporating 1-3 nucleotide mismatches in an mts-siRNA element (relative to a given mts-siRNA sequence). Examples of mts-siRNA elements are provided herein as SEQ ID NO: 57-94 and 96-104 and in the working Examples. An mts-siRNA element can function in either direction, *i.e.*, it is non-directional, and as such can be used in either the 5' to 3' orientation or in the 3' to 5' orientation in a recombinant DNA construct.

[0033] Mts-siRNA elements, mts-siRNA sequences, and mts-siRNAs can be identified by methods known to those skilled in the art, for example through bioinformatic analysis of plant sRNA and cDNA libraries. An example of such an identification method is provided in the Examples below. In particular, mts-siRNA and mts-siRNA sequences can be identified from sRNA libraries. The identified mts-siRNA sequences can be compared to cDNA and/or genomic sequence collections to identify mts-siRNA elements (*i.e.*, regions of DNA including at least one, at least two, at least three, or more than three mts-siRNA sequences within a 500 nucleotide sequence window), which are useful for developing recombinant DNA constructs as described herein.

[0034] In some embodiments, these mts-siRNA elements are synthesized or modified *in vitro* to contain more, fewer, or different mts-siRNA sequences and/or to rearrange the relative position of one or more mts-siRNA sequence(s), where such a modification is beneficial in increasing or decreasing the effect of the mts-siRNA element. Methods for synthesizing or for *in vitro* modification of an mts-siRNA element and determining the optimal variation for the desired level of suppression are known by those of skill in the art. Chimeric mts-siRNA elements can also be designed using methods known to those of skill in the art, such as by inserting additional desired mts-siRNA sequences internally in an mts-siRNA element or by linking additional mts-siRNA sequences 5' or 3' to

an mts-siRNA element. Non-limiting embodiments of a chimeric mts-siRNA element include mts-siRNA elements having about 80 nt, about 100 nt, about 150 nt, about 200 nt, about 250 nt, or about 300 nt of SEQ ID NO: 86; about 80 nt, about 100 nt, about 150 nt, about 200 nt, about 250 nt, or about 300 nt of SEQ ID NO: 87; and/or about 80 nt, about 100 nt, about 150 nt, about 200 nt, about 250 nt, about 300 nt, about 350 nt, about 400 nt, about 450 nt, about 500 nt, or about 550 nt of SEQ ID NO: 85. Additional embodiments are provided in the working Examples.

[0035] The recombinant DNA construct can be used to selectively suppress expression of the recombinant protein in male reproductive tissues of a transgenic plant expressing the construct, *i.e.*, resulting in expression in at least vegetative tissues but not in male reproductive tissues. As used herein, “expression of a recombinant protein” refers to the production of a recombinant protein from a protein-coding sequence and the resulting transcript (mRNA) in a cell. As used herein the term “suppressing” means reducing; for example, suppressing the expression of a recombinant protein means reducing the level of recombinant protein produced in a cell, *e.g.*, through RNAi-mediated post-transcriptional gene suppression.

[0036] Selective suppression of recombinant protein as used herein refers to a reduction of recombinant protein production in a cell or tissue as compared to a reference cell or tissue by at least about 75%, at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, or at least about 99%. A reference cell or tissue can be, *e.g.*, a vegetative cell or tissue from the same or a similar transgenic plant expressing the recombinant protein, or *e.g.*, a vegetative cell or tissue from a transgenic plant having a similar transgene for expressing the recombinant protein but lacking the mts-siRNA element. Suppression of protein expression can be determined using any technique known to one skilled in the art, such as by directly measuring protein accumulation in a cell or tissue sample using a technique such as ELISA or western blot analysis, by measuring enzymatic activity of the protein, or by phenotypically determining protein expression. In one embodiment, selective suppression of recombinant protein refers to sufficient reduction in expression of a recombinant protein capable of conferring herbicide tolerance in the male tissue of a transgenic plant, resulting in a detectable phenotype of altered male fertility in a transgenic plant to which herbicide was applied as a sterility spray. The detection of altered male fertility in such a transgenic plant would therefore indicate the selective suppression of the recombinant protein.

[0037] As used herein, the term “protein-coding sequence” refers to a polynucleotide molecule having a nucleotide sequence that encodes a polypeptide or protein sequence. *i.e.*, a polynucleotide sequence encoding a recombinant protein. Depending upon conditions, the nucleotide sequence may or may not be actually translated into a polypeptide molecule in a cell. The boundaries of a protein-coding sequence are commonly delineated by a translation start codon at the 5'-terminus and a translation stop codon at the 3'-terminus. A protein-coding sequence of the invention includes, but is not limited to, a protein-coding sequence that provides a desirable characteristic associated with plant morphology, physiology, growth and development, yield, nutritional enhancement, disease or pest resistance, herbicide tolerance, or environmental or chemical tolerance. In one embodiment, a protein-coding sequence of the invention encodes a recombinant protein that when expressed in a transgenic plant confers herbicide tolerance at least in a cell and/or tissue where the expressed protein occurs; selective suppression of the herbicide tolerance protein in male reproductive tissue of the transgenic plant in conjunction with timely application of the herbicide results in at least reduced male fertility or in male sterility. Such inducible male-sterility combined with vegetative herbicide tolerance can be used to increase the efficiency with which hybrid seed is produced, for example by eliminating or reducing the need to physically emasculate the maize plant used as a female in a given cross during hybrid seed production. Herbicide-inducible male-sterility systems have been described, for instance in U.S. Pat. No.6,762,344 and U.S. Patent Publication 2011/0126310. Examples of herbicides useful in practicing the invention include, but are not limited to, acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibitors (*e.g.*, fops and dims), acetolactate synthase (ALS) inhibitors (*e.g.*, sulfonylureas (SUs) and imidazolinones (IMIs)), photosystem II (PSII) inhibitors (*e.g.*, triazines and phenyl ethers), protoporphyrinogen oxidase (PPO) inhibitors (*e.g.*, flumioxazin and fomesafen), 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitors (*e.g.*, isoxaflutole and triketones such as mesotrione), 5-enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase (EPSPS) inhibitors (*e.g.*, glyphosate), glutamine synthetase (GS) inhibitors (*e.g.*, glufosinate and phosphinothricin), synthetic auxins (*e.g.*, 2,4-D and dicamba). Examples of protein-coding sequences and/or recombinant proteins for use in practicing the invention include but are not limited to genes encoding recombinant proteins conferring tolerance to HPPD inhibitors (such as herbicide-insensitive HPPD), genes encoding recombinant proteins conferring tolerance to glufosinate (such as *pat* and *bar*), genes encoding recombinant proteins conferring tolerance to glyphosate (such as the glyphosate-tolerant EPSPS known as

CP4-EPSPS, provided herein as SEQ ID NO: 95), and genes encoding recombinant proteins conferring tolerance to dicamba (such as dicamba monooxygenase (DMO)).

[0038] Recombinant DNA constructs of the invention are made by techniques known in the art and in various embodiments are included in plant transformation vectors, plasmids, or plastid DNA. Such recombinant DNA constructs are useful for producing transgenic plants and/or cells and as such can be also contained in the genomic DNA of a transgenic plant, seed, cell, or plant part. This invention therefore includes embodiments wherein the recombinant DNA construct is located within a plant transformation vector, or on a biolistic particle for transforming a plant cell, or within a chromosome or plastid of a transgenic plant cell, or within a transgenic cell, transgenic plant tissue, transgenic plant seed, transgenic pollen grain, or a transgenic or partially transgenic (*e.g.*, a grafted) plant. A vector is any DNA molecule that may be used for the purpose of plant transformation, *i.e.*, the introduction of DNA into a cell. Recombinant DNA constructs of the invention can, for example, be inserted into a plant transformation vector and used for plant transformation to produce transgenic plants, seeds, and cells. Methods for constructing plant transformation vectors are well known in the art. Plant transformation vectors of the invention generally include, but are not limited to: a suitable promoter for the expression of an operably linked DNA, an operably linked recombinant DNA construct, and a polyadenylation signal (which may be included in a 3'UTR sequence). Promoters useful in practicing the invention include those that function in a plant for expression of an operably linked polynucleotide. Such promoters are varied and well known in the art and include those that are inducible, viral, synthetic, constitutive, temporally regulated, spatially regulated, and/or spatio-temporally regulated. Additional optional components include, but are not limited to, one or more of the following elements: 5' UTR, enhancer, cis-acting element, intron, signal sequence, transit peptide sequence, and one or more selectable marker genes. In one embodiment, a plant transformation vector comprises a recombinant DNA construct.

[0039] The recombinant DNA constructs and plant transformation vectors of this invention are made by any method suitable to the intended application, taking into account, for example, the type of expression desired, the protein-coding sequence (and thus herbicide tolerance) desired, and convenience of use in the plant in which the recombinant DNA construct is to be expressed. General methods useful for manipulating DNA molecules for making and using recombinant DNA constructs and plant transformation vectors are well known in the art and described in detail in, for example, handbooks and laboratory manuals including Sambrook and Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (third edition),

Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001. The recombinant DNA constructs of the invention can be modified by methods known in the art, either completely or in part, *e.g.*, for increased convenience of DNA manipulation (such as restriction enzyme recognition sites or recombination-based cloning sites), or for including plant-preferred sequences (such as plant-codon usage or Kozak consensus sequences), or to include sequences useful for recombinant DNA construct design (such as spacer or linker sequences). In certain embodiments, the DNA sequence of the recombinant DNA construct includes a DNA sequence that has been codon-optimized for the plant in which the recombinant DNA construct is to be expressed. For example, a recombinant DNA construct to be expressed in a plant can have all or parts of its sequence codon-optimized for expression in a plant by methods known in the art. The recombinant DNA constructs of the invention can be stacked with other recombinant DNA for imparting additional traits (*e.g.*, in the case of transformed plants, traits including herbicide resistance, pest resistance, cold germination tolerance, water deficit tolerance) for example, by expressing or suppressing other genes.

TRANSGENIC PLANT CELLS AND TRANSGENIC PLANTS

[0040] An aspect of the invention includes transgenic plant cells, transgenic plant tissues, and transgenic plants or seeds which include a recombinant DNA construct of the invention. A further aspect of the invention includes artificial or recombinant plant chromosomes which include a recombinant DNA construct of the invention. Suitable methods for transformation of host plant cells for use with the current invention include virtually any method by which DNA can be introduced into a cell (*e.g.*, where a recombinant DNA construct is stably integrated into a plant chromosome) and are well known in the art. An exemplary and widely utilized method for introducing a recombinant DNA construct into plants is the *Agrobacterium* transformation system, which is well known to those of skill in the art. Transgenic plants can be regenerated from a transformed plant cell by the methods of plant cell culture. A transgenic plant homozygous with respect to a transgene can be obtained by sexually mating (selfing) an independent segregant transgenic plant that contains a single exogenous gene sequence to itself, for example an F0 plant, to produce F1 seed. One fourth of the F1 seed produced will be homozygous with respect to the transgene. Plants grown from germinating F1 seed can be tested for heterozygosity, typically using a SNP assay or a thermal amplification assay that allows for the distinction between heterozygotes and homozygotes (*i.e.*, a zygosity assay).

[0041] The invention provides a transgenic plant having in its genome a recombinant DNA construct of the invention, including, without limitation, alfalfa, cotton, maize, canola, rice, soybean, and wheat, among others. The invention also provides transgenic plant cells, plant parts, and progeny of such a transgenic plant. As used herein “progeny” includes any plant, seed, plant cell, and/or plant part produced from or regenerated from a plant, seed, plant cell, and/or plant part that included a recombinant DNA construct of the invention. Transgenic plants, cells, parts, and seeds produced from such plants can be homozygous or heterozygous for the recombinant DNA construct of the invention.

[0042] Further included in this invention are embodiments wherein the recombinant DNA construct is in a commodity product produced from a transgenic plant, seed, or plant part of this invention; such commodity products include, but are not limited to harvested parts of a plant, crushed or whole grains or seeds of a plant, or any food or non-food product comprising the recombinant DNA construct of this invention.

METHODS OF INDUCING MALE-STERILITY IN TRANSGENIC PLANTS AND OF PRODUCING HYBRID SEED

[0043] Another aspect of the invention includes a method of inducing male-sterility in a transgenic plant including applying an effective amount of an herbicide to a transgenic plant including a recombinant DNA construct that includes a protein-coding sequence encoding a recombinant protein that confers herbicide tolerance to the transgenic plant operably linked to a DNA sequence including an mts-siRNA element that confers at least vegetative herbicide tolerance to the transgenic plant, wherein the herbicide application is carried out during the development of the male reproductive tissue of the transgenic plant thereby inducing male-sterility in the transgenic plant.

[0044] In one embodiment, the transgenic plant is a maize plant. In one embodiment, the herbicide application prevents at least pollen shed or anther extrusion. In one embodiment, the development of the male reproductive tissue is a stage selected from the group consisting of the V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13, and V14 stage of maize plant development.

[0045] In one embodiment, the herbicide is selected from the group consisting of acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase), acetolactate synthase (ALS) inhibitors, photosystem II (PSII) inhibitors, protoporphyrinogen oxidase (PPO) inhibitors, 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitors, 5-enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase (EPSPS) inhibitors, glutamine synthetase (GS) inhibitors, and synthetic

auxins. In one embodiment, the herbicide is glyphosate and the recombinant protein is a glyphosate-tolerant EPSPS.

[0046] A further aspect of the invention includes a method of producing hybrid seed including: (a) herbicide application to a transgenic plant including a recombinant DNA construct including a protein-coding sequence encoding a recombinant protein that confers herbicide tolerance to the transgenic plant operably linked to a DNA sequence including an mts-siRNA element, wherein the herbicide application is carried out during the development of the male reproductive tissue of the transgenic plant thereby inducing male-sterility in the transgenic plant; (b) fertilizing the transgenic plant with pollen from a second plant; and (c) harvesting hybrid seed from the transgenic plant. In one embodiment, the transgenic plant is maize. In one embodiment, the herbicide is glyphosate and the recombinant protein is a glyphosate-tolerant EPSPS. In one embodiment, the glyphosate is applied during the development at an effective dose of about 0.125 pounds acid equivalent per acre to about 8 pounds acid equivalent per acre.

[0047] Yet another aspect of the invention includes hybrid seed harvested from a male-sterile transgenic plant that has been fertilized with pollen from a second plant, wherein the male-sterile transgenic plant includes a recombinant DNA construct including a protein-coding sequence encoding a recombinant protein that confers herbicide tolerance to the transgenic plant operably linked to a DNA sequence including an mts-siRNA element, and wherein the transgenic plant has been induced to be male-sterile by application of an effective amount of herbicide during the development of the male reproductive tissue of the transgenic plant. In one embodiment, the hybrid seed is hybrid transgenic maize seed. In one embodiment, the herbicide is glyphosate and the recombinant protein is a glyphosate-tolerant EPSPS. In one embodiment, the glyphosate is applied during the development at an effective dose of about 0.125 pounds acid equivalent per acre to about 8 pounds acid equivalent per acre. In one embodiment, the herbicide application prevents at least pollen shed or anther extrusion. In one embodiment, the development of the male reproductive tissue is a stage selected from the group consisting of the V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13, and V14 stage of maize plant development.

EXAMPLES

Example 1

[0048] This example describes identification of mts-siRNAs and mts-siRNA elements. Bioinformatic analysis of sequencing data from multiple maize small RNA

libraries identified a group of small RNAs (sRNAs) that were enriched or specifically expressed in maize tassel. The relative abundance of these mts-siRNAs in maize tassels ranged from about 50 to 631 transcripts per quarter million sequences, which is the normalized abundance. These sRNAs are identified as siRNAs because of their length (18-26 nucleotides) and their likely origin from a dsRNA precursor. Because of their expression pattern, the male tissue-specific siRNAs are referred to as “mts-siRNAs”. As used herein, an “expression pattern” is any pattern of differential DNA, RNA, or protein expression. For example, a tassel-specific expression pattern refers to specific or enriched expression of a DNA, RNA, or protein in a tassel tissue and/or cell. Examples of the corresponding DNA sequence for mts-siRNAs, referred to herein as “mts-siRNA sequences”, are provided as SEQ ID NO: 1-56 and 105-149.

[0049] These mts-siRNA sequences were then compared with cDNA sequence collections. A sequence comparison of the mts-siRNA against a maize unigene collection (compiled cDNA sequences) using BLAST yielded the surprising result that a large number of mts-siRNA clustered together, and were even overlapping, within a DNA region found in several closely related, but unique, cDNA sequences. The group of cDNA sequences all contained such a region, although the DNA sequence of the region varied due to different combinations and locations of individual mts-siRNA sequences and/or 1-3 nucleotide mismatches to individual mts-siRNA sequences. Such a region defined as having at least one mts-siRNA sequence within a nucleotide sequence window, is referred to herein as a “mts-siRNA element”. In various embodiments, the nucleotide sequence window includes at least about 20 contiguous nucleotides (nt) (*e.g.*, at least 18, 19, 20, 21, 22, 23, or 24 nt), at least about 25 nt, at least about 30 nt, at least about 40 nt, at least about 50 nt, at least about 100 nt, or at least about 150 nt. Examples of the DNA sequence for mts-siRNA elements are provided herein as SEQ ID NO: 57-94 and 96-104. An mts-siRNA element can have more than one mts-siRNA sequence, for example, at least two, at least three, at least four, at least five, or more than five mts-siRNA sequences within a given nucleotide sequence window. Two or more mts-siRNA sequences within a given mts-siRNA element may overlap because at least a portion of their nucleotide sequences are identical (see Table 5 for examples of mts-siRNAs that have overlapping nucleotide sequences).

[0050] Bioinformatic analysis indicated that multiple mts-siRNAs could be generated from the same RNA transcript, for example a transcript produced from one of the cDNA sequences described above as including an mts-siRNA element. Many of the mts-siRNAs were also found to have 1-3 mismatches when compared to mts-siRNA elements

from across the group of closely related cDNA sequences. This is believed to indicate that these mts-siRNAs are generated from multiple, closely-related transcripts, resulting in a large, closely-related group of mts-siRNAs. Thus, an RNA transcript produced from a cDNA including an mts-siRNA element (containing multiple mts-siRNA sequences) would be complementary to, and therefore capable of hybridizing to, multiple mts-siRNAs and/or their complements. Thus, a naturally occurring mts-siRNA has an RNA sequence that is either a perfect or near-perfect complement to an mts-siRNA sequence (*e.g.*, where the mts-siRNA has an RNA sequence with no more than approximately 1-3 mismatches relative to the mts-siRNA sequence); by extension that same mts-siRNA has an RNA sequence that is a perfect or near-perfect complement to a segment of an mts-siRNA element.

[0051] A sequence similarity search of the mts-siRNAs against a maize genomic DNA database using BLAST identified multiple loci with significant similarity to the mts-siRNA element. These loci were then analyzed for open reading frames (ORFs), but the identified putative polypeptides were not found to have significant homology to any known protein. Bioinformatic analysis of the mts-siRNA producing cDNA sequences indicated that there was no significant sequence homology at the nucleotide level to any known plant gene. These data suggest that mts-siRNAs could be produced from such loci by processing of dsRNA formed between transcripts of opposite polarity or by processing of dsRNA from aberrant transcripts due to RNA-dependent RNA polymerase activity. It also possible that mts-siRNAs are processed from internal secondary dsRNA structures that can be formed in some mts-siRNAs producing transcripts.

[0052] Reverse-transcription of the mts-siRNAs provided mts-siRNA sequences which were mapped onto one of the mts-siRNA elements (SEQ ID NO: 87). This is presented in Figure 1 with the X-axis representing the nucleotide position from 5' to 3' orientation from left to right on the top and from right to left on the bottom. The relative abundance of the mts-siRNA is given as transcripts per quarter million sequences (tpq) plotted on the Y-axis. As can be seen from Figure 1, a few mts-siRNAs (circled) are highly represented in the tassel-specific sRNA library (Y-axis). The predicted mts-siRNA sequences are also non-uniformly distributed across the mts-siRNA element (X-axis).

Example 2

[0053] This example illustrates endogenous tassel expression analysis of mts-siRNAs. The native *in planta* expression patterns of the mts-siRNAs were analyzed using several different methods. These analyses confirmed that the sRNAs that hybridize to mts-siRNA elements are enriched in and/or specifically expressed in tassels across maize

germplasms (*i.e.*, the mts-siRNAs are enriched in and/or specifically expressed in tassels), and that in an embodiment, an mts-siRNA is enriched in and/or specifically expressed in the pollen grain at the uninucleate microspore stage of pollen development.

[0054] To demonstrate *in planta* tassel-specific accumulation of the mts-siRNA, three representative mts-siRNA sequences (SEQ ID NO: 26 (1372590), SEQ ID NO: 8 (648011), SEQ ID NO: 33 (410590)) were used to design probes for low molecular weight (LMW) northern blot analysis of sRNAs prepared from either maize or rice. For these experiments, total RNA was extracted from plant tissue using TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA (7.5 µg) from each sample was denatured at 95°C for 5 minutes before separation on a 17% PAGE gel containing 7 M urea in 0.5X TBE buffer (Allen *et al.* (2004) Nature Genetics 36:1282-1290). Following electrophoresis, the gel was blotted onto a Nytran SuPerCharge® membrane (Whatman-Schleicher & Schuell, Florham Park, NJ) using Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's protocol. The resulting blot was crosslinked at 1200 microjoules/cm² x 100 in a Stratalinker® 1800 (Stratagene, Cedar Creek, TX). To prepare the probes, an RNA probe template was generated by PCR and contained the T7 promoter on one end and one of the small RNA sequences on the opposite end. The sRNA sequences incorporated into the RNA probe template included: [1] Gma-miR159a (miRBase.org accession number MI0001773), which was used as a control for loading; [2] sR1372590 (SEQ ID NO: 26); [3] sR648011 (SEQ ID NO: 8); and [4] sR410590 (SEQ ID NO: 33). The RNA probes were transcribed using T7 RNA polymerase, and labelled with digoxigenin (DIG) using the DIG Northern Starter Kit (Roche, Indianapolis, IN), according to the manufacturer's protocol. Hybridization was performed with 100 ng of the DIG-labelled probe in PerfectHyb™ hybridization buffer (Sigma, St. Louis, MO) at 38°C for 16 hrs. Detection was performed with the DIG Northern Starter Kit according to the manufacturer's protocol, before exposure to Kodak® Biomax™ XAR film (Sigma, St. Louis, MO). The samples tested included all, or a subset of the following: maize leaf from plants grown under nitrogen stress; maize shoot, root or endosperm from plants grown under cold stress; maize leaf and root from plants grown under drought stress; maize silk; maize young tassel; maize mature tassel; unpollinated maize kernels; maize embryo – 24 days after pollination (DAP); maize kernels – 22 DAP; mature maize kernels; maize embryo – mature (dry) kernels; maize endosperm – dry; rice grain; and rice seedling. The results obtained with the LMW northern analysis using at least three different mts-siRNA probes (sR1372590, sR648011, and sR410590) showed signal only in the lanes corresponding to the young tassel and mature tassel lanes, confirming the

bioinformatic analysis and the conclusion that the mts-siRNA expression is highly enriched in or specific to tassel tissue.

[0055] The tissue specificity and accumulation of sRNAs that would recognize an mts-siRNA element was assessed across a wide spectrum of maize germplasm using LMW northern analysis. For this analysis an mts-siRNA element (SEQ ID NO: 87, which contains multiple mts-siRNA sequences) was selected. This mts-siRNA element includes the three mts-siRNA sequences used to design the siRNA probes sR1372590, sR648011, and sR410590, allowing these probes to be used for the LMW northern analysis of the maize germplasm samples. For these experiments, RNA was prepared from twenty different maize inbred lines with diverse genetic backgrounds, *e.g.*, with relative maturity rating from 83 to 120 (Table 1). For three of these inbred lines (91DUA6, 01DKD2, and LH244), tissue was collected from young tassel, old tassel, leaf, ear, and root. Table 1 provides the corresponding V-stage and tassel size at collection of young tassel and old tassel. Total RNA was extracted using TRIzol® solution. LMW RNA was isolated with mirVana™ miRNA isolation kit (cat. no. AM1560, Ambion, Austin, TX). LMW northern analysis was done using a Bio-Rad Criterion™ Precast 15% TBE-urea acrylamide gel (cat. no. 345-0092, BioRad, Hercules, CA). The gel was blotted onto a positive charged membrane (cat. no. 11209272, Roche Applied Systems, Mannheim, Germany). Probes were labelled with either (1) 32-P-random priming, or (2) with DIG DNA using Roche PCR labeling kit, or (3) with DIG RNA probe as described above. All probes used to probe the northern blots were the reverse complement to the endogenous transcript or the cDNA sequence of the mts-siRNA element. The presence of sRNA that hybridized to the transgenic mts-siRNA element was specific to tassel; no signal was detected for leaf, ear, or root for any of the three inbred maize genotypes 91DUA6, 01DKD2, and LH244 (Figure 2).

[0056] To determine the temporal expression pattern during tassel development of sRNAs which would recognize an mts-siRNA element (SEQ ID NO: 87), LMW northern analysis was done. RNA was prepared from young and old tassel from different maize inbred lines, see Table 1. The RNA preparation and LMW northern techniques were essentially as described above.

Table 1: Inbred germplasm, maturity rating, and tassel development stage

Inbred	Maturity rating	young tassel		old tassel	
		Stage	Tassel size (inches)	Stage	Tassel size (inches)
C3SUD402	108	V9	5	V12	10
HIQA202	113	V9-10	4.5	V13	13
BEBE788	83	V10-11	10	V13	7.5
BIQA207	103	V10	7	V11	9.5
DIDA404	112	V10	2.5 - 3	V11	9.5
5DA92	107	V10-11	5.7	V12	11
DIDA406	109	V10	6.5	V12	9
80DJD5	114	V10	6.5	V11	10
JEDO115	120	V9	2.5	V11-12	10
FIDA240	116	V9-10	2.5	V12	11
BIQA347	99	V9-10	3.5	V11-12	10.5 - 11
HOQA203	105	V10-11	5.5	V12-13	11
91DUA6	90	V10-11	10	V12-13	10
BIDA345	95	V10	5	V12-13	10
01DKD2	111	V9-10	5	V13	10.5 - 11
DIDA403	108	V10	2.5 - 3	V12	10.5 - 11
64DJD1	105	V9-10	2.5 - 3	V12	10.5 - 11
DIQA423	108	V9-10	3	V12	9.5
BIQA208	102	V10	5.5	V13	9.5
LH244	111	V9-10	1 - 2.5	V13	10

[0057] As seen in Figure 4, a DIG-labelled RNA probe corresponding to the reverse complement of an mts-siRNA element (SEQ ID NO: 87) hybridized to sRNA in both young and old tassel, with the exception of young tassel that was 2.5 inches to 3 inches in length: lanes 5 (inbred DIDA404), 9 (inbred JEDO115), 10 (inbred FIDA240), 16 (inbred DIDA403), 17 (inbred 64DJD1), 18 (inbred DIQ423), and 20 (inbred LH244). Additionally, this experiment confirmed no detection of sRNA hybridizing to the mts-siRNA element from samples of leaf (lanes 21 and 22) or ear (lanes 23 and 24) from the inbreds BIQA208 and LH244. Collectively these data indicate that the sRNAs that hybridize to the mts-siRNA

element are specifically expressed in the tassel from each inbred genotype tested when the tassel is greater than about 3.5 inches.

[0058] *In situ* hybridization analysis was done to investigate cell specific expression of an mts-siRNA sequence (sR648011, SEQ ID NO: 8). In maize anthers, microspores are produced through meiosis and develop into mature pollen. Maize microsporeogenesis can be roughly divided into the following stages: meiosis of sporogenous cells, release of tetrads as free microspores, mitosis of uninucleate microspores to produce tricellular pollen, and mature pollen grains. For these experiments, maize tassel before anthesis obtained from maize plants grown under standard conditions in a greenhouse was used. Locked Nucleic Acid (LNA) probes (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) were used as indicated below with the position of the LNA indicated by a '+' symbol. The antisense probe was designed to detect the mts-siRNA for sR648011 (SEQ ID NO: 8) (5'-Biotin-CAT+GCA+CTG+GTG+AGT+CAC+TGT-3'), while the sense probe was the reverse complement of the antisense probe (5'-Biotin-ACA+GTG+ACT+CAC+CAG+TGC+ATG-3') for use as a negative control. The LNA probes allow high stringent washes and therefore ensure highly specific hybridization (Válóczi *et al.*, 2006; Nuovo *et al.*, 2009). All probes were biotin labelled. The samples of maize tassel were fixed in 4% paraformaldehyde in 1xPBS at 4°C for 36 h, and then dehydrated at 4°C through a graded ethanol:H₂O series. The tassels were then placed in 75% EtOH and 25% Histoclear (National Diagnostics, Atlanta, GA) for 1.5 h, 50% EtOH and 50% Histoclear for 1.5 h, 25% EtOH and 75% Histoclear for 1.5 h, and 100% Histoclear for 3x1.5 h, all at 25°C. Next, the Histoclear was gradually replaced with molten paraplast at 50°C, and the tassels were transferred into molds and stored at 4°C before sectioning. The paraffin-embedded tassels were sectioned on a microtome to 8 µm thickness. A series of sections were made from the same anthers and adjacent sections were then used for probing with the sense or antisense probe, respectively. Prehybridization and hybridization were conducted at 42°C and washing at 55°C. Detection of the biotin-labelled LNA probes annealed with the transcripts was with a 1 to 400 dilution of Anti-Biotin-Alkaline Phosphatase (AP) and BM Purple AP Substrate (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Images were captured from a camera on an Olympus microscope (Center Valley, PA). Sections from the same anthers were divided into two groups – one was used for the antisense probe (Figure 5, left panel) and the other for the sense probe (Figure 5, right panel). The hybridization signal (dark purple) was detected only on the sections that were hybridized with the antisense probe but not on those that were incubated with the sense probe (Figure 5). The strong signal obtained with the antisense probe indicates that this mts-siRNA

was abundant (highly expressed) in the pollen grain at the uninucleate microspore stage of pollen development.

Example 3

[0059] This example illustrates plant transformation constructs and transgenic plant production. An mts-siRNA element was incorporated into the 3'UTR of a transgene expression cassette and used to produce transgenic maize plants to test the effect of the element on transgene expression in transgenic plants. An mts-siRNA element (SEQ ID NO: 87) was inserted into the 3'UTR of a CP4-EPSPS transgene expression cassette for maize transformation. This mts-siRNA element was selected because it has an abundance of mts-siRNA sequences in it (Figure 3), including sequences for three of the siRNA probes (sR1372590, sR648011 and sR410590) used for the LMW northern analysis in Example 2. This mts-siRNA element also allowed testing the effect of mts-siRNA mismatches. The mts-siRNA element tested here (SEQ ID NO: 87) has a one nucleotide change (CAT: AAGCTATTGATTCCCTAAGTGCCA) compared to one of the underlying mts-siRNA sequences (SEQ ID NO: 33, used to design Probe sR410590). The mts-siRNA element was inserted in the transgene cassette in the reverse complement orientation relative to its position in the endogenous cDNA, but the element is believed to function similarly in both orientations because tassel-specific siRNA molecules complementary to either strand of the mts-siRNA element can be found in maize tassel (Figures 1 and 3).

[0060] Several CP4-EPSPS/mts-siRNA element expression cassettes were constructed (Table 2) and used to transform maize plants. Different combinations of expression elements were tested in the CP4-EPSPS/mts-siRNA element expression cassettes. Expression elements such as promoters, leaders, introns, chloroplast transit peptides, and 3'UTR's needed for efficient and stable expression of a transgene are well known in the art. The CP4-EPSPS/mts-siRNA element expression cassettes were designed to include one of two separate promoters; operably linked to a DNA of one of two separate leaders; operably linked to a DNA of one of two introns; operably linked to one of two DNA molecules encoding the same chloroplast transit peptide (CTP); operably linked to a DNA molecule derived from the *aroA* gene from the *Agrobacterium* sp. strain CP4 and encoding the CP4-EPSPS protein; operably linked to DNA encoding an mts-siRNA element; operably linked to one of two 3'UTR DNA molecules. Construct 4 contained the wildtype CP4-EPSPS gene and all the other vectors contained a plant codon optimized version of the CP4-EPSPS gene. Constructs 3, 5, and 6 (Table 2) were designed to determine if an mts-siRNA element incorporated into the 3'-UTR would produce plants with tassel-specific sensitivity to

glyphosate and vegetative glyphosate tolerance. Constructs 4 and 7 are control constructs, lacking an mts-siRNA element.

Table 2: Plant transformation constructs

Construct	Promoter	Leader	Intron	CTP	Transgene	mts-siRNA	3'UTR
3	A	A	A	A	CP4	SEQ ID NO: 87	A
4	A	A	A	A	CP4	**	A
5	B	B	B	B	CP4	SEQ ID NO: 87	A
6	B	B	B	B	CP4	SEQ ID NO: 87	B
7	B	B	B	B	CP4	**	A

[0061] Transgenic maize plants transformed with one of each of the five expression cassettes were produced using well-known methods. Briefly, maize cells were transformed by *Agrobacterium*-mediated transformation with one each of the constructs listed in Table 2 (individually) and regenerated into intact maize plants. Individual plants were selected from the population of plants that showed integrity of the transgene expression cassette and resistance to glyphosate. Rooted plants with normal phenotypic characteristics were selected and transferred to soil for growth and further assessment. R0 plants were transferred to soil for growth, sprayed with 0.75 lb/acre glyphosate at V3-V4 followed by 0.75 lb/acre glyphosate at V7-V9, and then cross-pollinated with pollen from non-transgenic maize plants of the same germplasm (for constructs 3, 5, and 6 events) or self-pollinated (for constructs 4 and 7 events) to produce R1 seed. Plants were then selected by a combination of analytical techniques, including TaqMan, PCR analysis, and vegetative tolerance to herbicide spray and a reduced (desired) male fertility rating following herbicide (glyphosate) spray.

Example 4

[0062] This example illustrates methods of analyzing transgenic plants in a greenhouse. Transgenic plants transformed with the CP4-EPSPS/mts-siRNA element expression cassettes were analyzed for vegetative glyphosate tolerance and male fertility. Transgenic plants generated from constructs containing the CP4-EPSPS/mts-siRNA element expression cassettes were found to have vegetative tolerance to glyphosate and induced male-sterility with late application of glyphosate.

[0063] R0 plants were grown in duplicates in the green house and left unsprayed or sprayed with 0.75 lb/acre glyphosate at the (early) V6 stage followed by 0.75 lb/acre glyphosate at the (late) V9 stage. (Figure 7 and Table 3) The R0 events tested were multi-copy events. All R0 plants that were unsprayed had normal anther extrusion and fully fertile

pollen as determined by Alexander staining. All R0 plants that were sprayed had vegetative tolerance to glyphosate. R0 plants produced from constructs 4 and 7, which did not contain the mts-siRNA element, did not show tassel sensitivity to glyphosate or induced male-sterility. R0 plants produced from constructs 3, 5, and 6, which did contain the mts-siRNA element, showed tassel sensitivity to glyphosate and induced male-sterility; these plants had no or very few anther extrusions and >99% of the pollen was non-viable as determined by Alexander staining.

Table 3: Glyphosate spray data

Construct	Early Glyphosate Spray Vegetative Tolerance	Late Glyphosate Spray Induced Male-sterility
3	Yes	Yes
4	Yes	No
5	Yes	Yes
6	Yes	Yes
7	Yes	No

[0064] These observations demonstrated that the presence of the mts-siRNA element in the 3'UTR of a transgene cassette led to tassel-specific transgene silencing of the transgene. Tassel-specific loss of the mRNA transcript produced by CP4-EPSPS/mts-siRNA element expression cassette resulted in tassels which were sensitive to glyphosate, producing a plant with induced male-sterility, while the other tissues of the plant were glyphosate tolerant, producing vegetative glyphosate tolerance and good female fertility.

[0065] Immunolocalization was then used to measure CP4-EPSPS protein in the transgenic plant tissues. Tassel was obtained from plants transformed with construct 3 or construct 4 and from non-transgenic maize (LH198). The plants were grown in a greenhouse with 14 hours of light at 80°F and 8 hours of dark at 70°F. One seed was planted per pot. The pots were randomly arranged on the greenhouse floor. Plants were watered as necessary and fertilized with 20-20-20 mixture of nitrogen, potassium and phosphorus, respectively. Plants from construct 3 or construct 4 were sprayed with glyphosate at 0.75 lb/acre at the V2 stage to confirm vegetative tolerance to glyphosate. Young tassels were harvested at V10-V11 for anther tissues at microspore mother cell and free microspore stages; mature tassels were harvested at the T7 stage, 1-2 days before pollen shedding, for anther tissues with fully-developed pollen. Anthers were removed from the tassel spikelet using dissecting forceps and immediately fixed in 3.7% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) under gentle vacuum. After washing in PBS, tissues were placed in embedding medium and frozen

immediately. Frozen tissue blocks were stored at -80°C until sectioned in -20°C microtome and collected on the charged slides.

[0066] Tissue sections were blocked with blocking agent (10 % normal goat serum, 5% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100 in PBS) for 2 hours. Sections were incubated with anti-CP4-EPSPS antibody (1/500 in PBS). After washing the sections three times in PBS, tissue sections were incubated with the secondary antibody, goat anti-mouse IgG conjugated with Alexa fluorophore 488 (Invitrogen, Eugene, Oregon). For a negative control, CP4-EPSPS antibody incubation was omitted. As a positive control, an antibody to α -tubulin (Sigma, St. Louis, MO), a cytoskeletal protein expressed in most cell types, was substituted for the CP4-EPSPS antibody on separate sections. Both primary and secondary antibodies were incubated at room temperature for 2-4 hours and then further incubated overnight at 4 °C. After washing, the tissues were imaged with Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM) 510 META confocal microscope using a 488 nm laser for excitation and 500-550 nm for emission filter set. The same imaging parameter was applied throughout the samples including controls. Fluorescent and bright field images were scanned from each section, and merged using LSM software afterward to show structural information. A strong signal was obtained with the anti-CP4-EPSPS antibody in filament tissue (Figure 6A, short arrow) and pollen (Figure 6A, long arrow) in mature tassel from plants generated with construct 4 (Figure 6A), lacking the mts-siRNA element. The plant in Figure 6A is hemizygous for the transgene cassette, therefore only about 50% of the pollen showed the positive CP4-EPSPS signal. In contrast, a strong signal was obtained with the anti-CP4-EPSPS antibody only in filament tissue (Figure 6B, short arrow) and no signal was seen in pollen (Figure 6B, long arrow) in mature tassel from plants generated with construct 3 containing the mts-siRNA element (Figure 6B). The positive control antibody (anti- α -tubulin) showed signal in pollen within the mature tassel from plants generated from either construct 4 or construct 3. The data for the negative controls showed the expected absence of signal. The data for the conventional non-transgenic control showed the expected absence of signal from staining with the anti-CP4-EPSPS antibody and positive signal with staining with the anti- α -tubulin antibody. These data indicate that no or very few transcripts from the transformation cassette containing the mts-siRNA element are translated in the pollen, but that the transcript was translated in the vegetative filament tissue. The loss of CP4-EPSPS protein expression in pollen correlates to the observed tassel-specific glyphosate sensitivity in plants generated from construct 3.

Example 5

[0067] This example illustrates transgenic plant field trial testing for male fertility or sterility. Thirteen confirmed single-copy R1-R3 transgenic plant events generated by transformation with the CP4-EPSPS/mts-siRNA element expression cassette (construct 3) were tested in field trials for efficacy of the expression cassette. In the first year, thirteen events were tested at one field location. In the second year, eight events were tested at four field locations. In the third year, four events were tested in four field locations. During the three years of field trials, the average male fertility rating (MFR) for events generated from construct 3 was near or below MFR 2, which is considered the industry standard for male-sterility.

[0068] The data for one year of efficacy field trials is presented in Figure 8, with the average MFR produced under three different glyphosate spray treatment regimens presented in the graph (Figure 8A) for NK603 (CP4-EPSPS transgenic maize), MON87427 (CP4-EPSPS transgenic maize with glyphosate-inducible male-sterility), and two events from construct 3. Photos of tassel from plants grown during this particular efficacy field trial illustrate fertile tassel when the plants were sprayed with glyphosate at 0.75 lb/acre only at V3 (Figure 8B); and sterile tassel (no or minimal anther extrusion) on plants sprayed with glyphosate 0.75 lb/acre at V3 followed by 0.75 lb/acre at V8 followed by 0.75 lb/acre at V10 (Figure 8C). For this field trial, the spray regimens were: treatment 1 consisted of 0.75 lb/acre glyphosate at V3 (weed control); treatment 2 consisted of 0.75 lb/acre glyphosate at V3 (weed control) followed by 0.75 lb/acre at V8 followed by 0.75 lb/acre at V10; treatment 3 consisted of 0.75 lb/acre glyphosate at V3 (weed control) followed by 1.25 lb/acre at V8 followed by 1.25 lb/acre at V10. The later two sprays (i.e., V8 and V10) are referred to as sterility sprays. These results indicate that with only weed control glyphosate spray treatment 1 all plants (NK603, MON87427, and construct 3 events) were male fertile. With glyphosate sterility spray treatment 2, NK603 plants had a MFR=5, MON87427 were sterile with a MFR=2, and events 2 and 3 of construct 3 were partially male-fertile with a MFR<3. With glyphosate sterility spray treatment 3, NK603 plants had a MFR=5, MON87427 were male-sterile with a MFR<2, and events 2 and 3 of construct 3 were male-sterile with a MFR near or below a score of 2.

[0069] Although the average MFR was near or at a score of 2, anther extrusion was observed in glyphosate treated construct 3 events at S90+3 and S90+6 (Figure 9). For these data, four separate construct 3 events were compared to MON87427 and NK603 plants for two glyphosate spray regimens: treatment 2 consisted of 1.5 lb/acre glyphosate at V2/V3 (weed control) followed by 0.75 lb/acre glyphosate at growing degree units (GDU) 875

(~V8) followed by 0.75 lb/acre glyphosate at GDU 1025 (~V10) and treatment 3 consisted of 1.5 lb/acre glyphosate at V2/V3 (weed control), followed by 1.25 lb/acre glyphosate at GDU 875 (~V8) followed by 1.25 lb/acre glyphosate at GDU 1025 (~V10). The number of plants per plot (68 – 74 plants/plot) showing anther extrusion were scored at S90, S90+3 and S90+6, where S90 is the day when 90% of the plants in the field are showing silk; S90+3 is 3 days after S90; and S90+6 is 6 days after S90. As seen in the Figure 9, at S90 there were 70(±15) NK603 plants per plot showing anther extrusion for both glyphosate treatment regimens. In contrast, for the MON87427 and the four construct 3 events, there was 1(±12) plant per plot showing anther extrusion at S90 for both glyphosate treatment regimens. At S90+3 and S90+6, there were 30(±12) to 70(±12) plants per plot for the four construct 3 events showing anther extrusion with either glyphosate treatment regimen, nearing that seen for NK603. The anther extrusion for the MON87427 event remained at the S90 level for both S90+3 and S90+6 time points, and for each glyphosate treatment regimens. Any plants with ≥ 1 extruded anther were scored as positive for anther extrusion. This late anther extrusion, *i.e.* S90+3 and S90+6, occurs at a time of maize development when there is a maximum growth height of the tassel and there is sufficient distance to allow machine cutting of the tassel with minimal injury to the top two leaves of the maize plant, hence minimal impact on inbred yield. Also, anther extrusion at S90+3 or later is considered to have little impact on seed purity.

[0070] Analysis of pollen viability was conducted to determine if the low level, but consistent anther extrusion observed at S90+3 to S90+6 was an indication of potential late breaking male fertility. Figures 10A and 10B illustrate an example of late breaking anther extrusion in tassel from a sterility sprayed construct 3 event. The box in Figure 10A is the portion magnified in Figure 10B. An example of late breaking anther extrusion is circled in Figure 10B. To determine pollen viability, pollen was gathered from late breaking extruded anther and stained with Alexander stain, Figure 10C. Pollen was also gathered from non-sprayed construct 3 events on the same day and stained with Alexander stain as a comparison, Figure 10D. The results of this Alexander staining shows only non-viable pollen (translucent light blue, irregular shape pollen grains) from the late breaking anthers of sprayed construct 3 events (Figure 10C). Fully viable pollen appears opaque, dark purple and spherical with Alexander stain (Figure 10D). In addition to staining pollen collected from individually isolated late breaking extruded anther, pollination bags were placed on some sprayed construct 3 events to determine pollen shed. No noticeable pollen was shed into these pollination bags, which failed to generate any seed when used to cross pollinate recipient

ears. This result suggested that there was no pollen shed from the late extruding anthers or that any pollen shed is non-viable.

[0071] Collectively, these data indicate that although there is low level anther extrusion from sterility sprayed construct 3 events, these extruded anthers do not shed viable pollen.

Example 6

[0072] This example illustrates transgenic plant field trials testing for yield. Construct 3 R2 plants were tested for inbred and hybrid yield. For inbred yield, construct 3 R2 plants were tested in four field locations for yield, vegetative tolerance to glyphosate spray, and male-sterility with glyphosate spray. For these field trials, four events from construct 3 were planted in plots of 68-74 plants/plot. The spray treatments were: treatment 1 consisted of 1.5 lb/acre glyphosate at V3 (weed control); treatment 2 consisted of 1.5 lb/acre glyphosate at V3 followed by 0.75 lb/acre at V8 followed by 0.75 lb/acre at V11; treatment 3 consisted of 1.5 lb/acre glyphosate at V3 followed by 1.25 lb/acre at V8 followed by 1.25 lb/acre at V11. As can be seen in Figure 11, the construct 3 events at all three glyphosate treatment regimens showed good vegetative tolerance (white bars) as measured by plant height and good inbred yield (black bars) as measured as bushels (Bu)/acre. These same events were fully male-fertile when treated with only the weed control glyphosate treatment regimen (treatment 1), but were male-sterile with a MFR score of equal to or less than 2 (gray bars) when treated with glyphosate treatment regimens 2 or 3. The horizontal bar on Figure 11 indicates the industry standard for sterility, MFR 2. NK603 is provided for comparison. The measures of yield of inbred grain for construct 3 events and NK603 with glyphosate spray are provided in Table 4, where MST = % moisture of the grain, TWT = test weight (a density rating, typically pounds per bushel), and S50D is number of days to 50% silking of the ears in the plot. There was no significant difference (nd) measured in yield for any of the four construct 3 events tested with either glyphosate treatment 2 or 3 compared to the NK603 control.

Table 4: Inbred grain yield measures

	Comparison of Treatments 2 and 3 to Treatment 1		
Events	MST	TWT	S50D
cNK603	nd	nd	nd
Event 1	nd	nd	nd
Event 2	nd	nd	nd
Event 4	nd	nd	nd
Event 3	nd	nd	nd

[0073] For F1 hybrid grain yield, construct 3 R3 events were tested in four field locations. For these hybrid yield field trials, a non-transgenic female inbred (Null), line MON87427, and three events from construct 3, all in the same genetic background, were cross pollinated with a male MON810/MON88017 tester to generate F1 hybrid seed. The F1 hybrid seed generated from each of these crosses was planted in standard plots of 68 – 74 plants/plot. The spray treatments consisted of treatment 1 of no glyphosate spray; treatment 2 of 2.25 lb/acre glyphosate at V4 followed by 2.25 lb/acre at V7; treatment 3 of 2.25 lb/acre glyphosate at V4 followed by 2.25 lb/acre at V7 followed by 2.25 lb/acre at V10. The F1 plants were open pollinated to generate F2 grain, which is the yield measured in bushels/acre (Bu/acre). All three construct 3 events showed equivalent F1 hybrid grain yield at all glyphosate treatment regimens when compared to the control crosses of NullxMON810/MON88017 and MON87427xMON810/MON88017 (Figure 12).

Example 7

[0074] This example illustrates male fertility restoration in F1 hybrid plants. F1 hybrid plants generated from a cross of construct 3 events as the female parent were tested for male fertility. Three different F1 hybrid crosses were set-up: non-transgenic female x MON88017 male; MON87427 female x MON88017 male; and construct 3 event female x MON88017 male. The F1 hybrid seed was harvested from each of the three crosses, planted in a field, and sprayed with glyphosate at 1.125 lb/acre at V4 followed by 1.125 lb/acre at V10. Male fertility in F1 was assessed by male fertility rating (MFR) and by Alexander viability staining of the pollen. For each of the crosses, the MFR of the F1 hybrid plants was 5, or fully fertile. The Alexander viability staining showed 50% of the pollen produced by the F1 hybrid of each of the crosses was viable, as expected. (Figure 13) These data indicate that male fertility can be functionally restored in F1 hybrid plants produced from glyphosate-

inducible male-sterile transgenic plants transformed with a CP4-EPSPS/mts-siRNA element expression cassette.

Example 8

[0075] This example illustrates variant and chimeric mts-siRNA element construction. Individual mts-siRNA were mapped onto an mts-siRNA element as presented in Figure 3; the X-axis indicates the nucleotide position from 5' to 3' orientation from left to right on the top and from right to left on the bottom, and the Y-axis indicates the relative abundance of the mts-siRNA is indicated as transcripts per quarter million sequences (tpq). The mts-siRNAs were also non-uniformly distributed across the mts-siRNA element (X-axis).

[0076] Using this information, variants of an mts-siRNA element and/or chimeras produced using one or more mts-siRNA element(s) were engineered to contain more (or fewer) total mts-siRNA sequences (optionally or alternatively, one or more mts-siRNA sequence(s) is added or deleted), resulting in more (or less) silencing of an operably linked protein-coding sequence. Such variants or chimeric mts-siRNA elements are useful for increasing or decreasing the selective suppression of the expression of a recombinant protein in a male reproductive tissue of a transgenic plant.

[0077] Examples of variants and chimeras of mts-siRNA elements were constructed using fragments of SEQ ID NO: 87. The first variant (SEQ ID NO: 88) was constructed using a 104 nucleotide fragment from the 5'-end of SEQ ID NO: 87. The second variant (SEQ ID NO: 89) was constructed using an 80 nucleotide fragment from the 3'-half of SEQ ID NO: 87. Chimeric mts-siRNA elements were constructed by joining one fragment (SEQ ID NO: 88) to another fragment (SEQ ID NO: 89) to form new chimeric mts-siRNA elements (SEQ ID NO: 90 and SEQ ID NO: 91). Additional chimeric mts-siRNA elements were constructed by joining three individual mts-siRNA contained within SEQ ID NO: 87: a first chimera (SEQ ID NO: 92) was constructed by joining mts-siRNA sequences SEQ ID NO: 26, 27, and 8; a second chimera (SEQ ID NO: 93) was constructed by joining mts-siRNA sequences SEQ ID NO: 10, 33, and 5; a third chimera (SEQ ID NO: 94) was constructed by joining mts-siRNA sequences SEQ ID NO: 26, 10, and 33. These variants and chimeras can be operably linked to protein-coding sequences to produce recombinant DNA constructs (see Figure 14) that can be tested in plants and plant cells for selective suppression of a recombinant protein encoded by the protein-coding sequence in a male reproductive tissue of a transgenic plant.

Example 9

[0078] This example illustrates design of variant and chimeric mts-siRNA elements. Variant and chimeric mts-siRNA elements were designed based on a 300-nucleotide (nt) long mts-siRNA element having SEQ ID NO: 81, which is similar to the 300-nucleotide mts-siRNA elements having SEQ ID NO: 82 and 87. A highly conserved consensus sequence for mts-siRNA elements SEQ ID NO: 81, 82, and 87 is provided by SEQ ID NO: 96. Individually, each of these are also useful as an mts-siRNA element or as the basis of designing variant or chimeric mts-siRNA elements, *e.g.*, by selecting fragments of an mts-siRNA element identified from genomic sequence or cDNAs, such as fragments including at least one mts-siRNA sequence, and combining or concatenating such fragments.

[0079] Two fragments within SEQ ID NO: 81 were selected; fragment A (SEQ ID NO: 97) contained 104 contiguous nucleotides from the 5' region (positions 1 – 104) of SEQ ID NO: 81 and fragment B (SEQ ID NO: 98) contained 80 contiguous nucleotides from the 3' region (positions 215 – 294) of SEQ ID NO: 81; it is clear that either fragment A (SEQ ID NO: 97) or fragment B (SEQ ID NO: 98) individually are mts-siRNA elements containing at least one mts-siRNA sequence. The location of fragments A and B (indicated by underlined text) is shown in the following full sequence of SEQ ID NO: 81, which also indicates the location of mts-siRNA sequences (indicated by italicized text; italicized segments of greater than 18 contiguous nucleotides can include more than one overlapping mts-siRNA sequences) found to

map to this mts-siRNA element:

GGACAACAAGCACCTTCTTGCCCTGCAAGGCCTCCCTTCCCTATGGTAGCCACTTGAG
TGGATGACTTCACCTTAAAGCTATCGATTCCCTAAGTGCCAGACATAATAGGCTATA
 CATTCTCTCTGGTGGCAACAATGAGTCATTTTGGTTGGTGTGGTAGTCTATTATTG
 AGTTTGTTTTGGCACCGTACTCCCATGGAGAGTACAAGACAAACTCTTCACCGTTG
TAGTCGTTGATGGTATTGGTGGTGACGACATCCTTGGTGTGCATGCACTGGTGAGTCA
CTGTTGTACTCGGCG (SEQ ID NO: 81). Variant mts-siRNA elements were designed

using the “A” and “B” fragments, including an “A+B” mts-siRNA element (SEQ ID NO: 99) and a “B+A” mts-siRNA element (SEQ ID NO: 100). A chimeric element (SEQ ID NO: 101) was designed to include the mts- mts-siRNA sequences (shown above in italicized text in SEQ ID NO: 81) that were found to map to the mts-siRNA element (SEQ ID NO: 81).

[0080] Similarly, a 251-nt long mts-siRNA element (SEQ ID NO: 102) and a 121-nt long mts-siRNA element (SEQ ID NO: 103, a fragment of SEQ ID NO: 102, *i.e.*, the contiguous segment located at nucleotide positions 47 – 167 of SEQ ID NO: 102) were

identified from maize genomic sequence (Zm_B73_CR10::Segment{75361491..75361742}) as tassel-specific and corresponding to mts-siRNAs from young tassel (maize LH244, library 347; individually identified mts-siRNAs in some cases overlap over much of their sequence and vary by only a few nucleotides; see Table 5). Based on SEQ ID NO: 102 and 103 a chimeric mts-siRNA element (SEQ ID NO: 104) was designed.

Table 5: mts-siRNAs mapped to SEQ ID NO: 103

library ID	sRNA ID (specific to each library)	map start*	map end*	strand	expression (tpq for lib9, raw counts for others)	SEQ ID NO:	Sequence (as DNA equivalent)
347	710618	48	72	-1	1	105	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCCTA
347	325	49	72	-1	667	106	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
9	75221	49	72	-1	14.0375	107	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
9	79587	49	70	-1	1.7547	108	CAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
347	1443964	49	70	-1	1	109	CAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
347	1798947	50	72	-1	1	110	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCC
9	993198	51	74	1	5.264	111	GGCTAAGTATTGCGGCTTTGGTAG
346	2511625	56	79	-1	1	112	GACAACCTACCAAAGCCGCAATACT
347	1978935	62	84	-1	1	113	GATATGACAACCTACCAAAGCCGC
347	955660	63	86	-1	1	114	TAGATATGACAACCTACCAAAGCCG
347	1183103	64	84	-1	1	115	GATATGACAACCTACCAAAGCC
347	36752	73	96	-1	12	116	ATCAAAAGTTTAGATATGACAACCT
347	151532	75	98	1	4	117	TTGTCATATCTAACTTTTGATAG
347	1372	97	120	-1	197	118	ACGAGTACTCTAACATATAAGACT
347	316040	97	117	-1	2	119	AGTACTCTAACATATAAGACT
347	1310155	98	121	1	1	120	GTCTTATATGTTAGAGTACTCGTT
347	26503	99	122	1	15	121	TCTTATATGTTAGAGTACTCGTTA
347	490490	109	132	-1	2	122	ATCAAAACCCTAACGAGTACTCTA
347	1125767	114	137	-1	1	123	AGACAATCAAAACCCTAACGAGTA
347	442804	115	138	-1	2	124	GAGACAATCAAAACCCTAACGAGT
347	965720	118	141	-1	1	125	CAGGAGACAATCAAAACCCTAACG
345	1549424	119	142	-1	1	126	ACAGGAGACAATCAAAACCCTAAC
347	311196	120	143	-1	2	127	CACAGGAGACAATCAAAACCCTAA
347	190	121	144	-1	1018	128	ACACAGGAGACAATCAAAACCCTA
346	591709	121	144	-1	2	129	ACACAGGAGACAATCAAAACCCTA
347	363241	121	143	-1	2	130	CACAGGAGACAATCAAAACCCTA
347	1603891	121	141	-1	1	131	CAGGAGACAATCAAAACCCTA
347	135176	122	144	-1	4	132	ACACAGGAGACAATCAAAACCCT
347	48157	123	146	1	9	133	GGGTTTTGATTGTCTCTGTGTAT
347	1866298	123	144	-1	1	134	ACACAGGAGACAATCAAAACCC
347	1707358	124	147	-1	1	135	AATACACAGGAGACAATCAAAACC

347	1788406	129	146	1	1	136	TGATTGTCTCCTGTGTAT
347	519539	130	153	1	2	137	GATTGTCTCCTGTGTATTTACCCCT
347	383791	133	156	-1	2	138	GAGAGGGTAAATACACAGGAGACA
347	273115	135	158	1	2	139	TCTCCTGTGTATTTACCCTCTCGC
345	1244664	135	157	-1	1	140	CGAGAGGGTAAATACACAGGAGA
346	1460995	135	157	-1	1	141	CGAGAGGGTAAATACACAGGAGA
347	697148	135	157	1	1	142	TCTCCTGTGTATTTACCCTCTCG
347	1716970	136	159	1	1	143	CTCCTGTGTATTTACCCTCTCGCA
347	839648	137	157	-1	1	144	CGAGAGGGTAAATACACAGGA
347	8578	145	168	-1	38	145	TACAATAAGTGCGAGAGGGTAAAT
9	519321	145	168	-1	8.7734	146	TACAATAAGTGCGAGAGGGTAAAT
347	423280	145	167	-1	2	147	ACAATAAGTGCGAGAGGGTAAAT
347	377787	146	168	-1	2	148	TACAATAAGTGCGAGAGGGTAAA
9	444803	146	167	-1	1.7547	149	ACAATAAGTGCGAGAGGGTAAA

*nucleotide position within SEQ ID NO: 103

Example 10

[0081] This example illustrates vectors and transgenic plant cells, tissues, and plants containing recombinant DNA constructs including a protein-coding sequence encoding a recombinant protein and an mts-siRNA element operably linked to the protein-coding sequence.

[0082] A plant transformation vector comprising a recombinant DNA construct is used for *Agrobacterium*-mediated transformation of maize cells. This transformation vector includes DNA for *Agrobacterium*-mediated transfer of T-DNA, an expression cassette (promoter operably linked to a DNA sequence of interest), a selectable marker expression cassette (for convenient selection of the transformed maize cells or plants), and DNA for maintenance of the vector in *E. coli* (e.g., an *E. coli* origin of replication sequence). In one embodiment, the transformation vector includes an expression cassette comprising a recombinant DNA construct flanked by right and left border sequences from *Agrobacterium*, wherein the recombinant DNA construct includes the herbicide tolerance transgene CR-AGRtu.aroA-CP4.nat (provided as SEQ ID NO: 95) as the DNA sequence encoding a recombinant protein. The herbicide tolerance transgene CR-AGRtu.aroA-CP4.nat is operably linked to the mt-siRNA provided as SEQ ID NO: 81 as the DNA sequence encoding an mts-siRNA element.

[0083] Transformation vectors for expressing different recombinant DNA constructs are constructed by inserting a polynucleotide including an mts-siRNA element (e.g., SEQ ID NO: 57-94 or 97-104) into the plant transformation vector. The mts-siRNA element is inserted adjacent to the DNA sequence encoding a recombinant protein or within

the 3' untranslated region of the DNA sequence encoding a recombinant protein. Such plant transformation vectors are useful for making transgenic plants that can be induced to be male-sterile by the application of herbicide.

[0084] Methods for transformation of plants are well-known in the art. For example, maize plants of a transformable line are grown in the greenhouse and ears are harvested when the embryos are 1.5 to 2.0 mm in length. Ears are surface sterilized with 80% ethanol, followed by air drying. Immature embryos are isolated from individual kernels from sterilized ears. Prior to inoculation of maize cells, individual cultures of *Agrobacterium* each containing a transformation vector for expressing at least one of the recombinant DNA constructs of this invention are grown overnight at room temperature. Immature maize embryo cell cultures are inoculated with *Agrobacterium*, incubated at room temperature with *Agrobacterium* for 5 to 20 minutes, co-cultured with *Agrobacterium* for 1 to 3 days at 23 degrees Celsius in the dark, transferred to a selection medium and cultured for approximately 2 weeks to allow embryogenic callus to develop. Embryogenic callus is transferred to a culture medium containing 100 mg/L paromomycin and subcultured at about two week intervals. Multiple events of transformed plant cells are recovered 6 to 8 weeks after initiation of selection.

[0085] Transgenic maize plants are regenerated from transgenic plant cell callus for each of the multiple transgenic events resulting from transformation and selection, by placing transgenic callus of each event on a medium to initiate shoot and root development into plantlets which are transferred to potting soil for initial growth in a growth chamber at 26 degrees Celsius, followed by growth on a mist bench before transplanting to pots where plants are grown to maturity. The regenerated plants are self-fertilized. First generation ("R1") seed is harvested. Plants grown from the R1 seed ("R2" plants) are used to produce progeny.

Example 11

[0086] This example illustrates methods of selecting mts-siRNA sequences and mts-siRNA elements for use in recombinant DNA constructs including a protein-coding sequence encoding a recombinant protein and an mts-siRNA element operably linked to the protein-coding sequence.

[0087] One method of verifying efficacy of an mts-siRNA element for selectively suppressing the expression of a recombinant protein in a male reproductive tissue of a transgenic plant involves use of a protoplast assay wherein plant cell protoplasts are co-transformed with: (a) a vector containing a recombinant DNA construct including a protein-

coding sequence and a mts-siRNA element operably linked to the protein-coding sequence; and (b) RNA(s) having the sequence of the siRNA(s) corresponding to the mts-siRNA element(s) (or alternatively, the mts-siRNA sequence(s)), wherein the level of expression of the recombinant protein is expected to be inversely proportional to the degree to which the mts-siRNA element is cleaved by the RNA(s).

[0088] This is illustrated by the following non-limiting example. The assay was carried out on two mts-siRNA sequences (corresponding to two siRNAs found to be highly expressed in maize tassel). In brief, maize leaf protoplasts were co-transformed with: (a) a plasmid (3 micrograms/320,000 cells) containing a recombinant DNA construct including a protein-coding sequence encoding a recombinant protein (CP4-EPSPS, SEQ ID NO: 95) and an mts-siRNA element (SEQ ID NO: 81), and (b) a first dsRNA with a first strand having the sequence SEQ ID NO: 150 in 5' to 3' direction and a second strand being the complement of the first, and a second dsRNA with a first strand having the sequence SEQ ID NO: 151 in 5' to 3' direction and a second strand being the complement of the first. The dsRNAs (from Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa) were tested at 0, 5, 25, or 50 nanograms/320,000 cells, with the total RNA used in each co-transformation assay adjusted with "filler" RNA consisting of either miRNA395 (as the mature 21-mer, provided as dsRNA) or yeast tRNA to 50 nanograms/320,000 cells. The level of CP4-EPSPS protein was determined by ELISA and used to evaluate the ability of the tested dsRNAs to suppress expression of the recombinant protein. Results are provided in Table 6.

Table 6: Level of CP4-EPSPS protein

dsRNA tested	dsRNA (ng)	filler RNA (ng)	CP4-EPSPS protein (ng/mg total protein)
none (control)	0	50	317
SEQ ID NO: 150	5	45	294
	25	25	167*
	50	0	114*
SEQ ID NO: 151	5	45	315
	25	25	223*
	50	0	91*

*statistically significant from control

[0089] Each of the dsRNAs (SEQ ID NO: 150 and 151) strongly suppressed CP4-EPSPS expression (indicated by decreased CP4-EPSPS protein accumulation) when co-

transformed with the plasmid containing the recombinant DNA construct including the CP4-EPSPS protein-coding sequence and mts-siRNA element. The observed suppression of CP4-EPSPS was dose-dependent on the amount of dsRNAs and independent of the type of filler RNA. Suppression of CP4-EPSPS was not observed in control samples co-transformed with filler RNA in place of the test dsRNAs.

Example 12

[0090] This example illustrates recombinant DNA constructs, vectors, and transformed plants of the invention. Vectors and transformation methods similar to those described in Example 10 were used to produce stably transformed maize plants containing in their genome a recombinant DNA construct including a protein-coding sequence operably linked to a DNA sequence comprising an mts-siRNA element. Six combinations of construct design/mts-siRNA element were tested (see Table 7). Plants were sprayed twice (at V5 and V8) with 0.75 lb ae/A Roundup WeatherMAX®. Results are provided in Table 7. For each construct design/mts-siRNA element combination, about 20 plants were left unsprayed for comparison to glyphosate-sprayed plants. Unsprayed plants all shed pollen and had good male fertility (data not shown). The maize plants transformed with construct design B exhibited more pronounced male-sterility than the maize plants transformed with construct design A. Construct designs (5' to 3', left to right) were Construct A is promoter A/intron A/transit peptide A/CP4-EPSPS (SEQ ID NO: 95)/mts-siRNA element/3'UTR and Construct B is promoter B/intron B/transit peptide B/CP4-EPSPS/mts-siRNA element/3'UTR. As used below, "n.m." means not measured. The male fertility rating (MFR) scale is: 5 = anther emergence is normal, pollen volume is the same as unsprayed plots but may or may not shed pollen; 4 = anther emergence 50% of normal, but are shedding slightly or not shedding normal amounts of pollen; 3 = tassel looks normal but there is sporadic anther extrusion (>10 anthers per tassel) and little or no pollen being shed; 2.5 = no pollen shed, anthesis is greatly reduced (<10 anthers per tassel) or is very late (1 week) relative to the end of silking; 2 = no pollen shed, no anthesis or anthesis is very late (1 week) relative to end of silking; and 1 = no pollen shed, tassel has abnormal stick phenotype or anthesis is delayed two or more weeks after silking. S90 is when 90% plants have silk ready for pollination and S90+3 is 3 days after S90.

Table 7: Construct design/mts-siRNA element spray data

Construct design*	mts-siRNA element SEQ ID NO:	Vegetative damage	Pollen shedding at S90	MFR at S90 to S90+2	% abnormal pollen
A	97	No	No	5	100%
A	97	No	No	2.5	100%
A	97	No	No	2	100%
A	98	No	Yes	5	n.m.
A	98	No	No	3	60%
A	98	No	No	5	70%
A	98	No	No	2.5	100%
A	104	No	No	4	n.m.
A	104	No	No	2	50%
A	104	No	No	2.5	100%
B	101	No	No	2	n.m.
B	101	No	No	2.5	100%
B	101	No	No	4	n.m.
B	101	No	No	2	n.m.
B	101	No	No	2.5	n.m.
B	101	No	No	2.5	100%
B	101	No	No	2	100%
B	101	No	No	2.5	100%
B	101	No	No	2.2	n.m.
B	101	No	No	3	20%
B	101	No	No	2	100%
B	97	No	No	2.5	n.m.
B	97	No	No	2	100%
B	97	No	No	2.5	100%
B	97	No	No	4	100%
B	97	No	No	2	n.m.
B	98	No	No	2	100%
B	98	No	No	2.5	100%
B	98	No	No	2	n.m.
B	98	No	No	2.5	n.m.

[0091] All of the materials and methods disclosed and claimed herein can be made and used without undue experimentation as instructed by the above disclosure. The above examples are included to demonstrate embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples represent techniques discovered by the inventor to function well in the practice of the invention, and

thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the appended claims.

CLAIMS

- Claim 1. A recombinant DNA construct comprising a protein-coding sequence operably linked to a DNA sequence comprising an mts-siRNA element.
- Claim 2. The recombinant DNA construct of claim 1, wherein said mts-siRNA element comprises at least one mts-siRNA sequence.
- Claim 3. The recombinant DNA construct of claim 2, wherein said mts-siRNA sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-56 and 105-149.
- Claim 4. The recombinant DNA construct of claim 1, wherein said mts-siRNA element is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 57-94 and 96-104.
- Claim 5. The recombinant DNA construct of claim 1, wherein the expression of said protein-coding sequence in a transgenic plant confers at least vegetative herbicide tolerance to said plant.
- Claim 6. The recombinant DNA construct of claim 5, wherein said protein-coding sequence encodes a glyphosate-tolerant EPSPS.
- Claim 7. A method of making a recombinant DNA construct comprising identifying an mts-siRNA element comprising at least one mts-siRNA sequence and operably linking said mts-siRNA element to a protein-coding sequence.
- Claim 8. The method of claim 7, wherein said at least one mts-siRNA sequence is at least one selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-56 and 105-149 or said mts-siRNA element is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 57-94 and 96-104.
- Claim 9. The method of claim 7, wherein said mts-siRNA element is tassel-specific.
- Claim 10. A transgenic plant having in its genome the recombinant DNA construct of claim 1.
- Claim 11. A seed, progeny, or plant part of the transgenic plant of claim 10.
- Claim 12. The transgenic plant of claim 10, wherein said transgenic plant is a monocotyledonous plant.
- Claim 13. The transgenic plant of claim 10, wherein said transgenic plant is a maize plant.

Claim 14. A method of selectively suppressing the expression of a recombinant protein in a male reproductive tissue of a transgenic plant comprising expressing in said transgenic plant a recombinant DNA construct of claim 1.

Claim 15. The method of claim 14, wherein said male reproductive tissue is a tassel of a maize plant.

Claim 16. The method of claim 14, wherein said mts-siRNA element comprises at least three mts-siRNA sequences.

Claim 17. The method of claim 14, wherein said mts-siRNA element comprises at least one mts-siRNA sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-56 and 105-149.

Claim 18. The method of claim 14, wherein said wherein said mts-siRNA element is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 57-94 and 96-104.

Claim 19. The method of claim 14, wherein the expression of said recombinant protein in a transgenic plant confers at least vegetative herbicide tolerance to said plant.

Claim 20. The method of claim 19, wherein said recombinant protein is a glyphosate-tolerant EPSPS.

Claim 21. A method of inducing male-sterility in a transgenic plant comprising applying an effective amount of an herbicide to a transgenic plant comprising a recombinant DNA construct of claim 1, wherein said herbicide application is carried out during the development of the male reproductive tissue of said transgenic plant thereby inducing male-sterility in said transgenic plant.

Claim 22. The method of claim 21, wherein said transgenic plant is a maize plant.

Claim 23. The method of claim 21, wherein said herbicide application prevents at least pollen shed or anther extrusion.

Claim 24. The method of claim 21, wherein said development of the male reproductive tissue is a stage selected from the group consisting of the V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13, and V14 stage of maize plant development.

Claim 25. The method of claim 21, wherein said herbicide is selected from the group consisting of acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibitors, acetolactate synthase (ALS)

inhibitors, photosystem II (PSII) inhibitors, protoporphyrinogen oxidase (PPO) inhibitors, 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitors, 5-enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase (EPSPS) inhibitors, glutamine synthetase (GS) inhibitors, and synthetic auxins.

Claim 26. The method of claim 21, wherein said herbicide is glyphosate and said recombinant protein is a glyphosate-tolerant EPSPS.

Claim 27. A method of producing hybrid seed comprising:

- a. applying an effective amount of herbicide to a transgenic plant comprising a recombinant DNA construct of claim 1, wherein said herbicide application is carried out during the development of the male reproductive tissue of said transgenic plant thereby inducing male-sterility in said transgenic plant;
- b. fertilizing said transgenic plant with pollen from a second plant; and
- c. harvesting hybrid seed from said transgenic plant.

Claim 28. The method of claim 27, wherein said transgenic plant is maize.

Claim 29. The method of claim 27, wherein said herbicide is glyphosate and said recombinant protein is a glyphosate-tolerant EPSPS.

Claim 30. The method of claim 29, wherein said glyphosate is applied during said development at an effective dose of about 0.125 pounds acid equivalent per acre to about 8 pounds acid equivalent per acre.

Claim 31. Hybrid seed harvested from a male-sterile transgenic plant that has been fertilized with pollen from a second plant, wherein said male-sterile transgenic plant comprises a recombinant DNA construct of claim 1 and has been induced to be male-sterile by application of an effective amount of herbicide during the development of the male reproductive tissue of said transgenic plant.

Figure 1

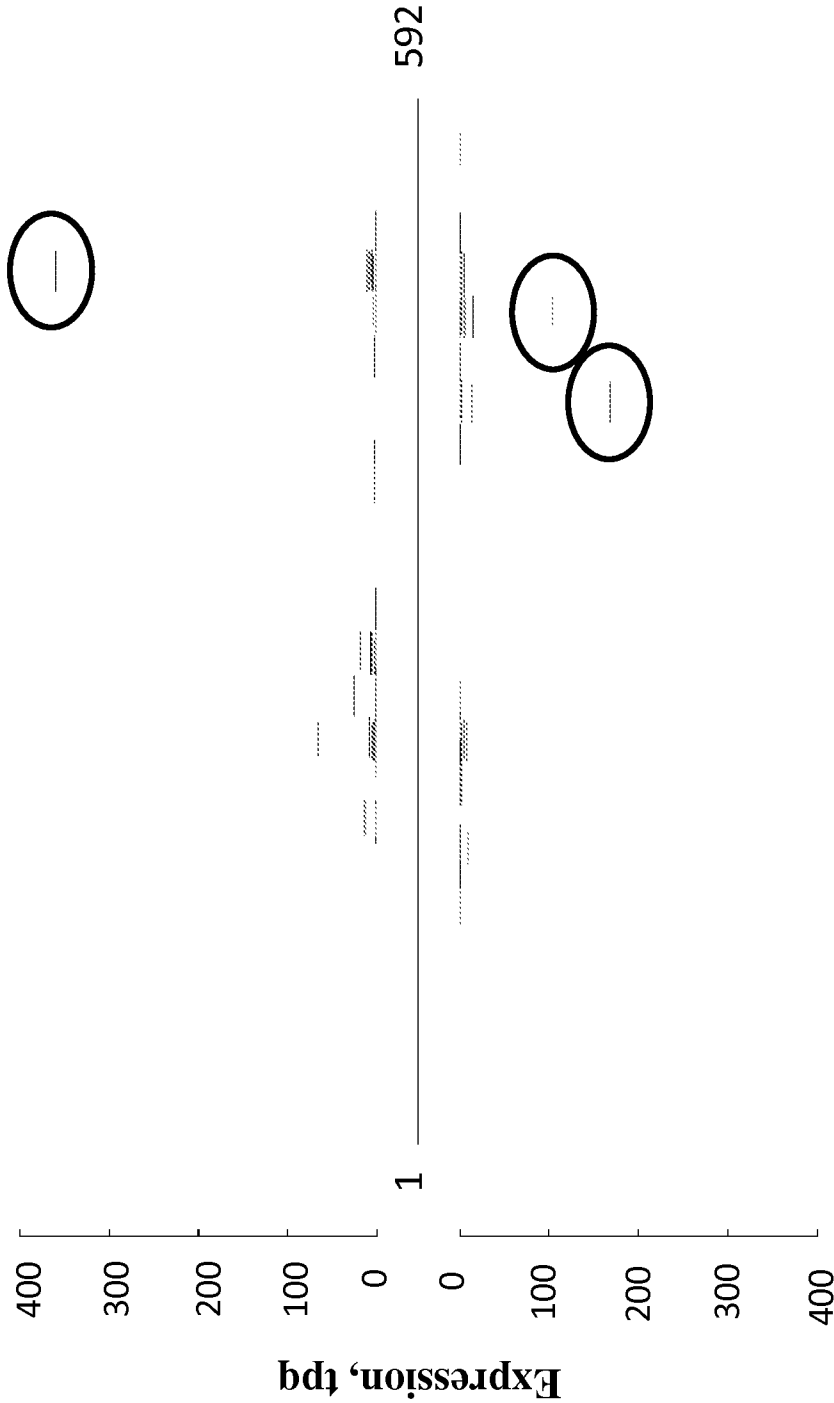
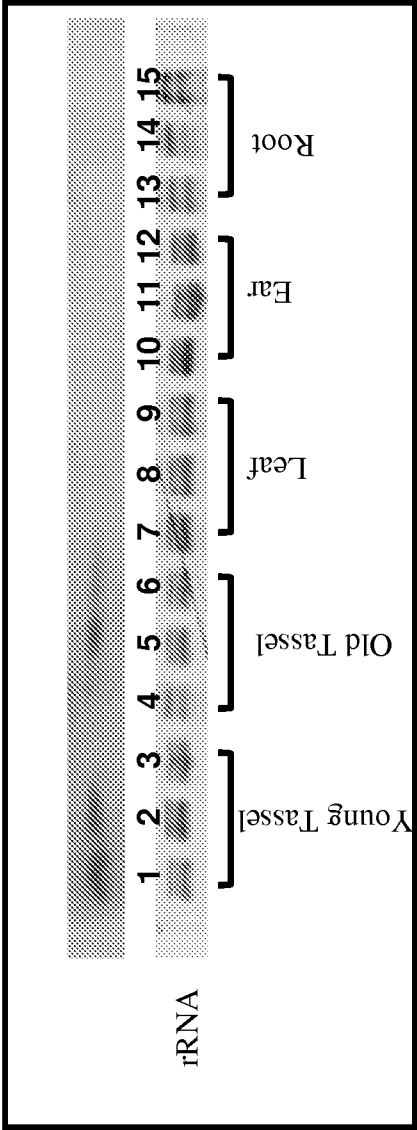


Figure 2



Sample #	LMW sample name
1	91DUA6 Young tassel
2	01DKD2 Young tassel
3	LH244 Young tassel
4	91DUA6 Old tassel
5	01DKD2 Old tassel
6	LH244 Old tassel
7	91DUA6 Leaf
8	01DKD2 Leaf
9	LH244 Leaf
10	91DUA6 Ear
11	01DKD2 Ear
12	LH244 Ear
13	91DUA6 Root
14	01DKD2 Root
15	LH244 Root

Figure 3

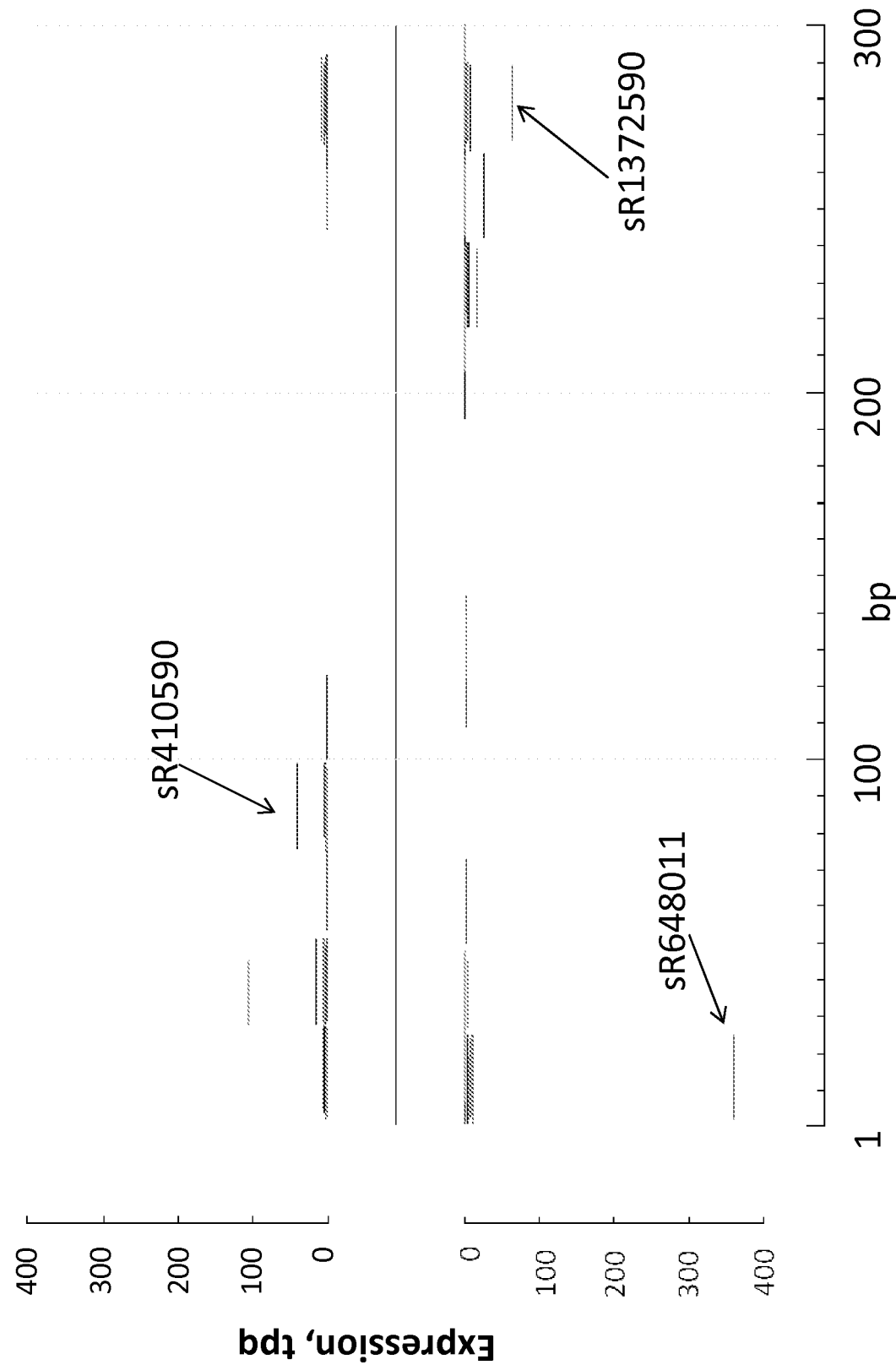


Figure 4

Lane	Inbred
1	C3SUD402
2	HIQA202
3	BEBE788
4	BIQA207
5	DIDA404
6	5DA92
7	DIDA406
8	80DJD5
9	JEDO115
10	FIDA240
11	BIQA347
12	HOQA203
13	91DUA6
14	BIDA345
15	01DKD2
16	DIDA403
17	64DJD1
18	DIQA423
19	BIQA208
20	LH244
21	BIQA208 - leaf
22	LH244- leaf
23	BIQA208 - ear
24	LH244 -ear

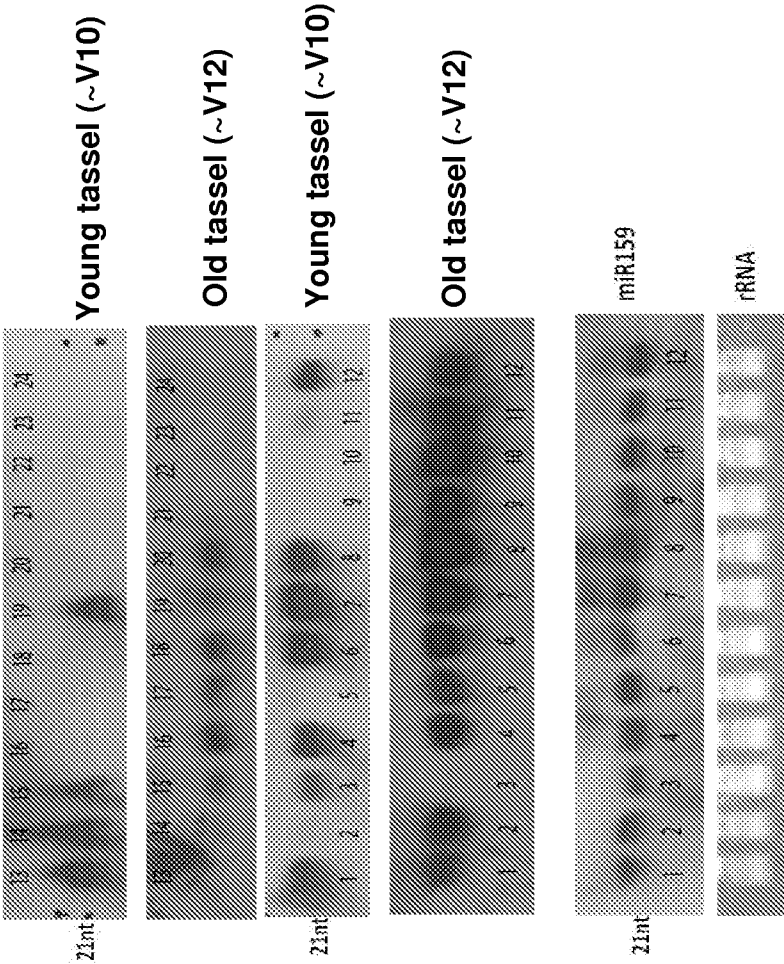


Figure 5

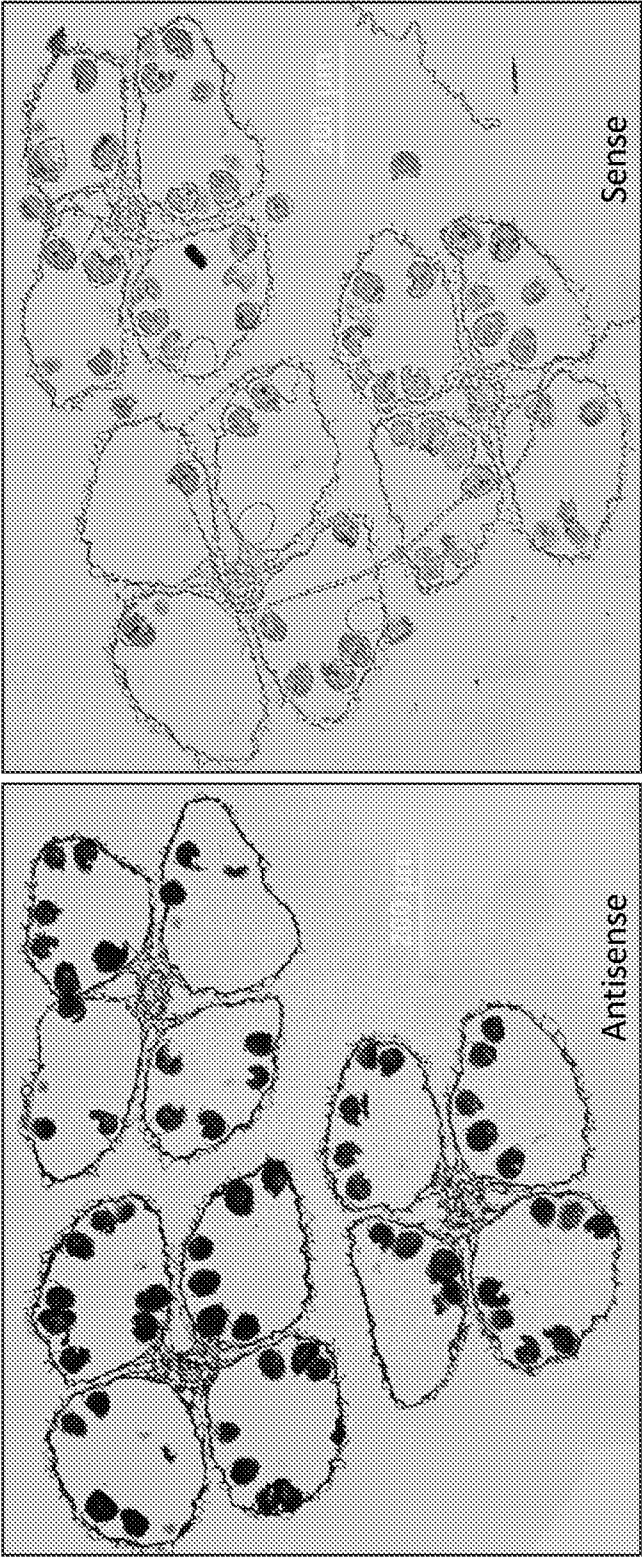
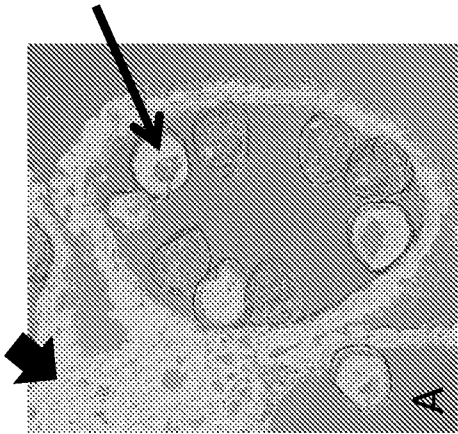


Figure 6

Construct 4



Construct 3

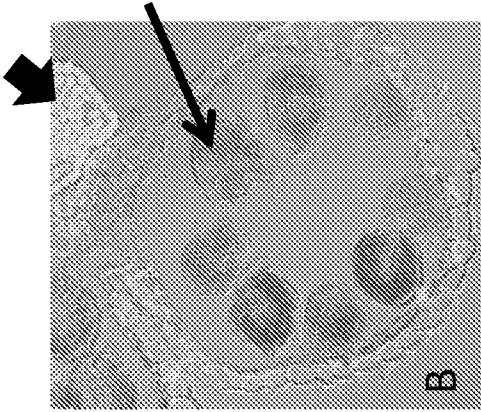


Figure 7

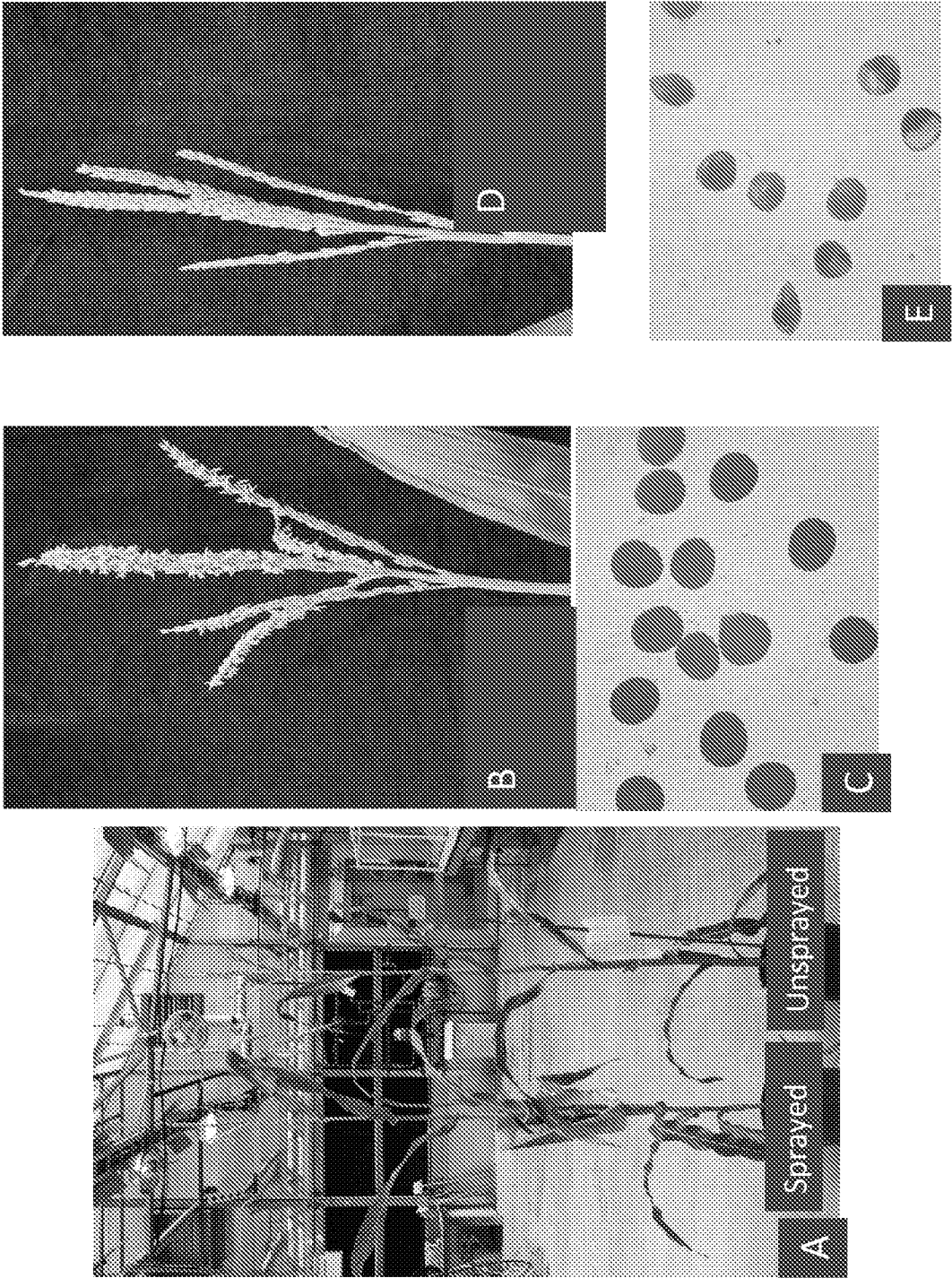


Figure 8

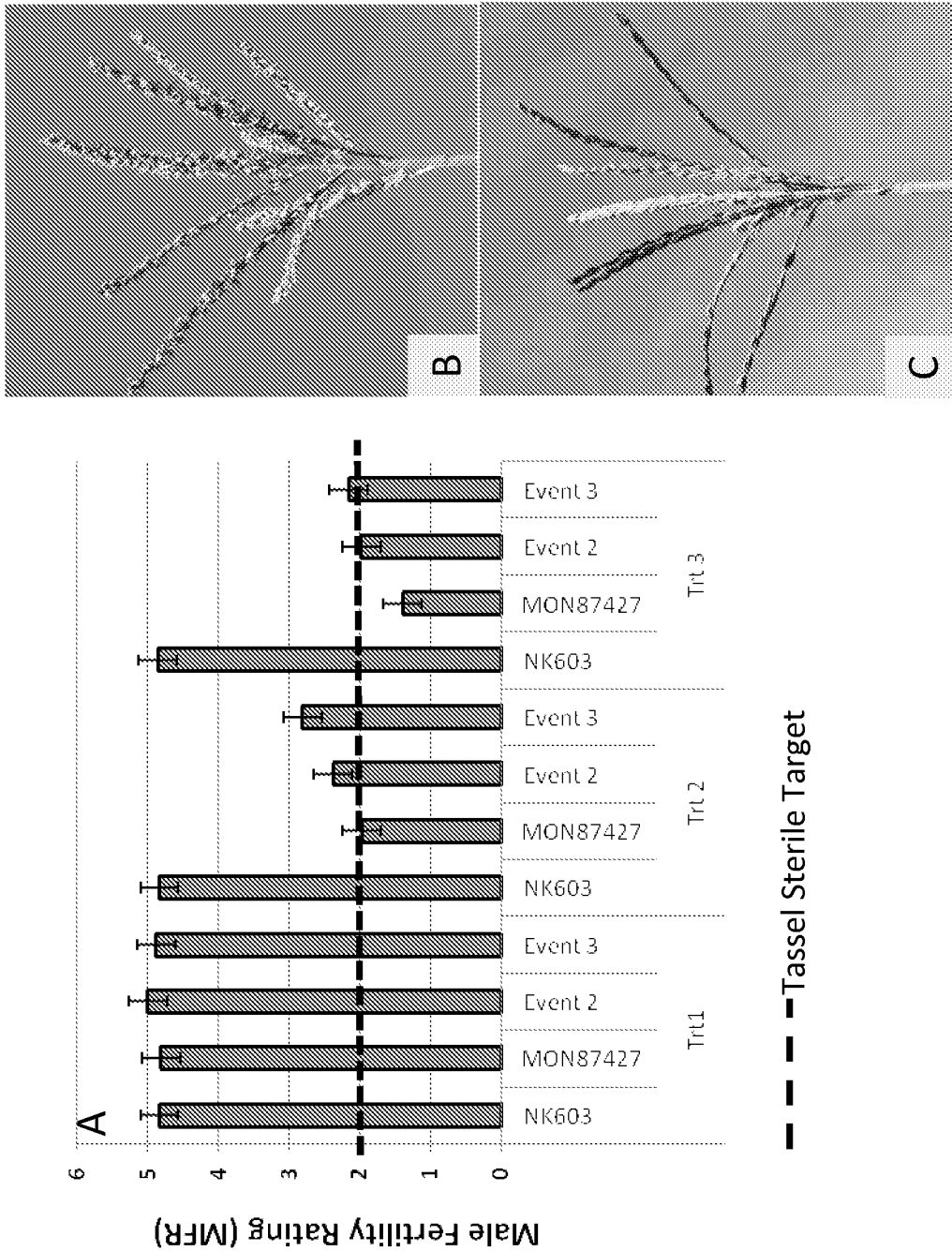


Figure 9

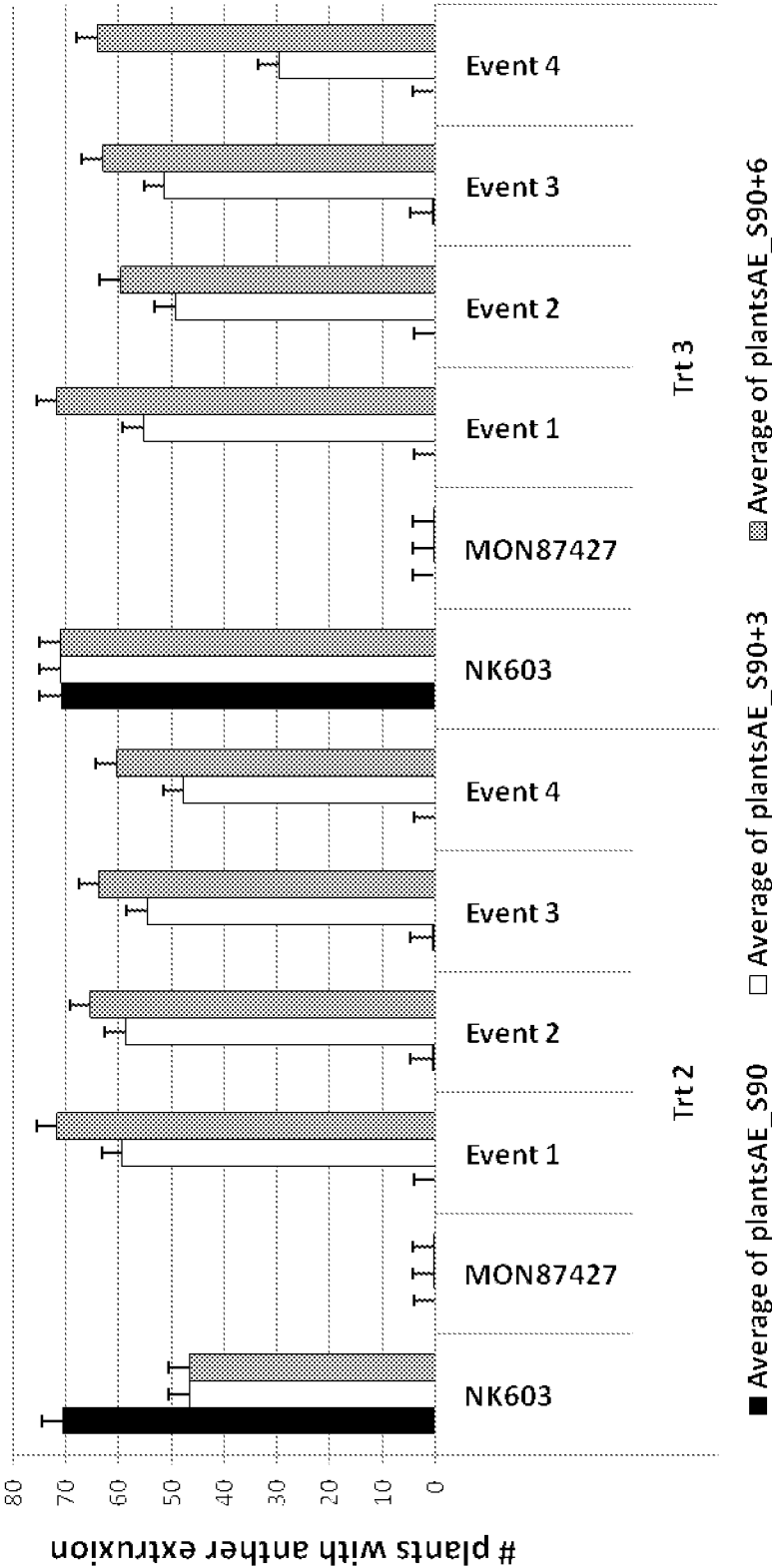


Figure 10

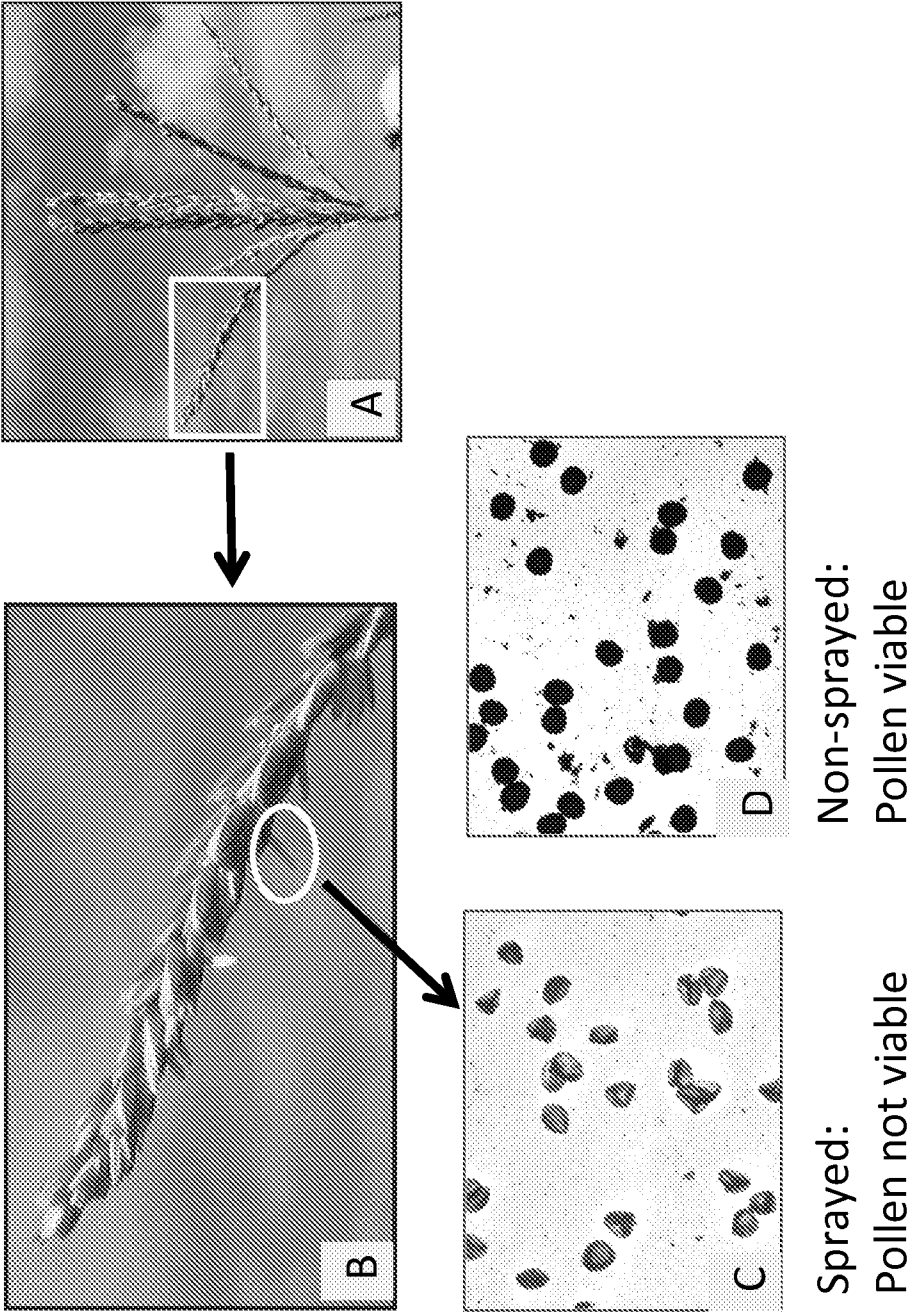


Figure 11

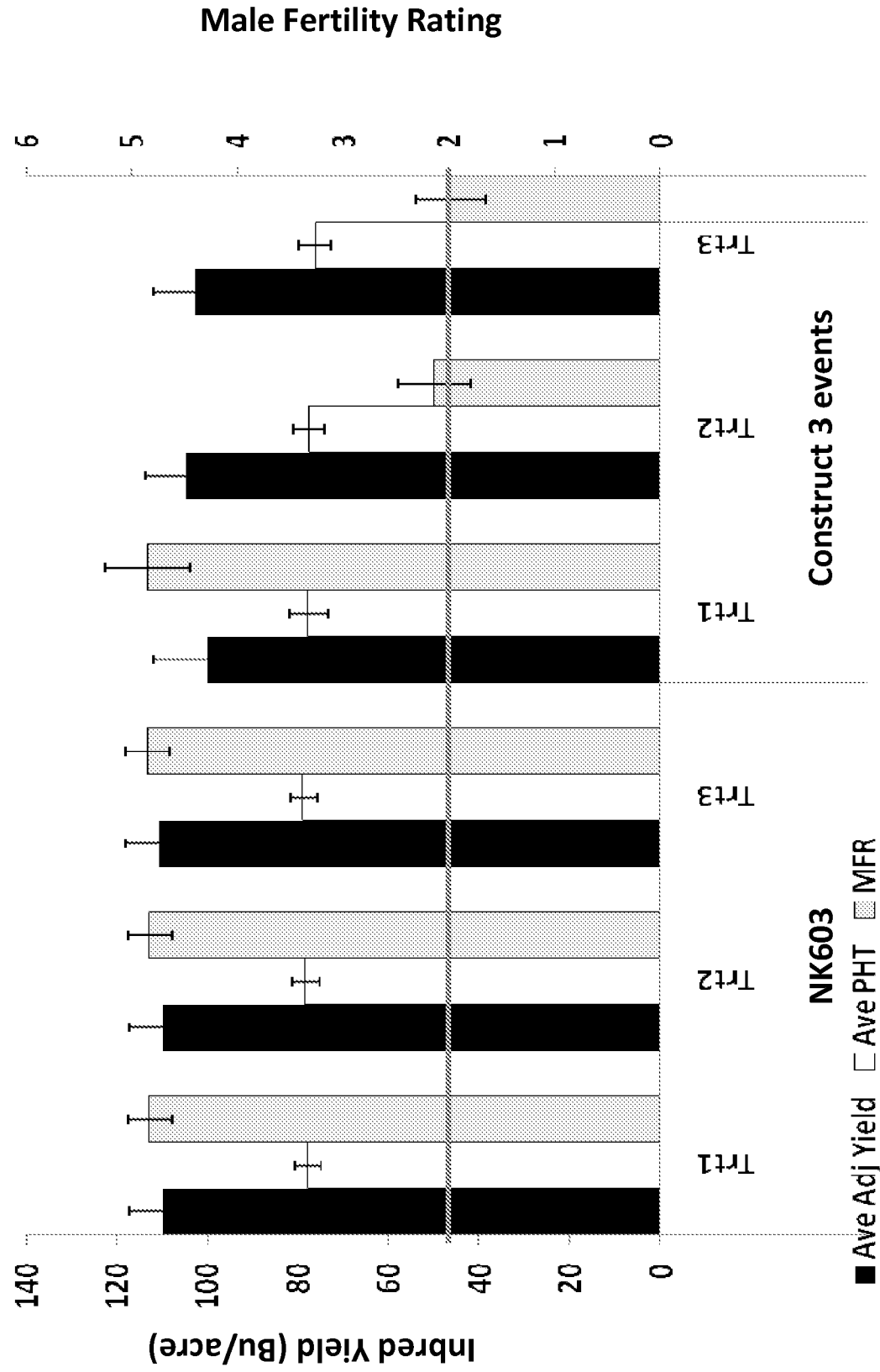


Figure 12

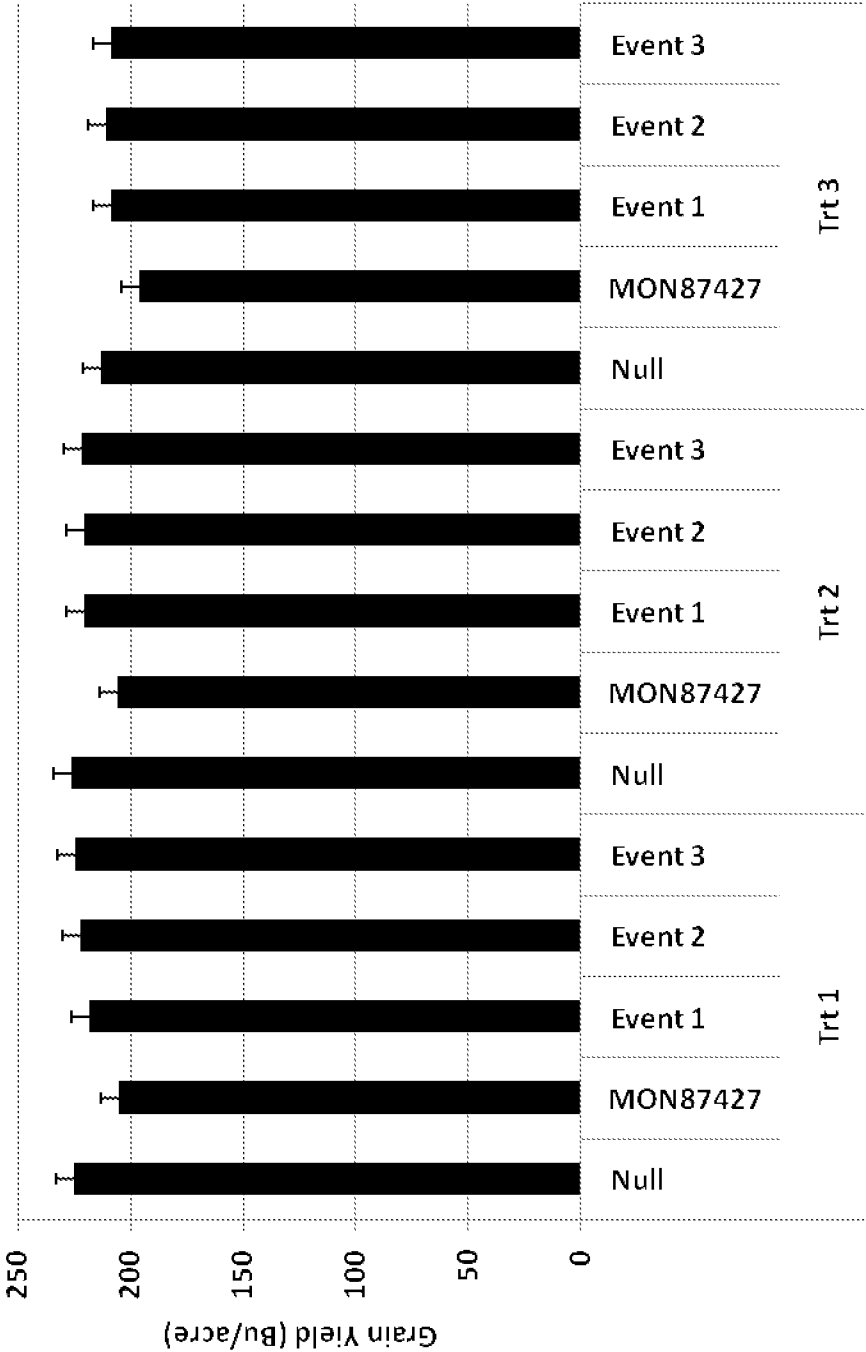
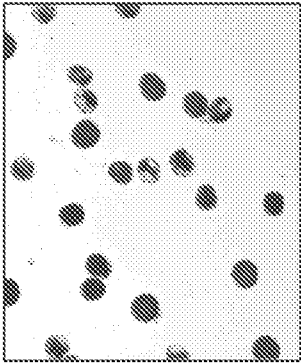
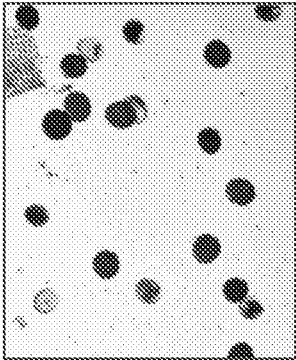


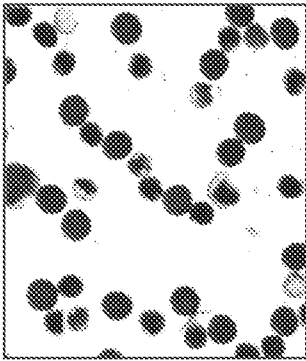
Figure 13



Null x MON88017

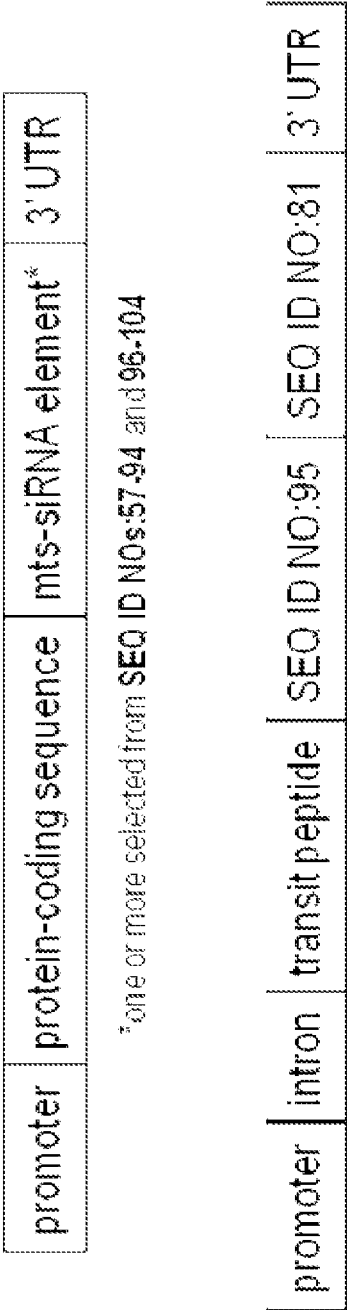


MON87427 x MON88017



Event 3 x MON88017

Figure 14



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/45040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C07H 21/04; C12N 15/82; A01H 5/00 (2012.01)

USPC - 536/24.5, 800/285, 800/298

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)
USPC: 536/24.5, 800/285, 800/298Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 536/24.5, 800/285, 286, 295, 298 (text search)

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

Electronic data bases: PubWEST (USPT, EPAB, JPAB, PGPB); Google Scholar; GenCore Sequence Search (NT)

Search terms: male sterility, siRNA, RNAi, antisense, male tissue specific siRNA, corn or maize, transgenic, herbicide tolerant, glyphosate, EPSPS, bicistronic vector, bifunctional expression vector, operably linked

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0150832 A1 (NEMUNAITIS et al.) 23 June 2011 (23.06.2011). Especially para [0012]	1-31
Y	US 2001/0023501 A1 (JOHAL et al.) 20 September 2001 (20.09.2001). Especially para [0069], [0070], claims 3, 5, 7, 8, 11	1-31
Y	US 2007/209085 A1 (WU et al.) 6 September 2007 (06.09.2007). Especially para [0025], SEQ ID NO: 9758	3, 8, 17, 18
Y	WO 2010/099084 A2 (CAO et al.) 2 September 2010 (02.09.2010). Especially pg 17 ln 28-pg 18 ln 3, SEQ ID NO: 256	4
Y	US 6,646,186 B1 (STINE et al.) 11 November 2003 (11.11.2003). Especially col 3 ln 35-43, col 7 ln 50-54, col 10 ln 19-23.	5, 6, 19-31
Y	WANG et al. Development and validation of vectors containing multiple siRNA expression cassettes for maximizing the efficiency of gene silencing. BMC Biotechnology 22 December 2006 Vol 6 No 50 Pages 1-7. Especially abstract.	16
Y	US 2011/0126310 A1 (FENG et al.) 26 May 2011 (26.05.2011). Especially para [0085], [0122].	24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* 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 application or patent 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 citation 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 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 September 2012 (12.09.2012)

Date of mailing of the international search report

28 SEP 2012

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/45040

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. 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 a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☐

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☒

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOs: 1-5, 57-61

PODER

El (los) **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Domiciliados en **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- Para la obtención de registros sanitarios;
- Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy **19 de Diciembre de 2005**

en **St. Louis, Missouri, USA**

por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Of **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia, to obtain the protection of my (our) Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- For the obtainment of Sanitary registrations;
- Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this **19th December, 2005**

in **St. Louis, Missouri**

by 
Dennis R. Hoerner
(Notary shall execute on the next page)

(Consular legalization or apostille is required)

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA

Hoy 19^{de} Dic. del año 2005
compareció (eron) personalmente
DENNIS R. HOERNER

a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en
representación de la Sociedad (Compañía) denominada
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Certifico :

a) Que MONSANTO TECHNOLOGY LLC

es una sociedad/Compañía legalmente constituida y
existente de acuerdo con las leyes de

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
St. Louis, Missouri

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el
presente poder están comprendidos dentro del objeto
social de la mencionada Sociedad /Compañía.

d) Que el Sr. DENNIS R. HOERNER
esta autorizado para otorgar el presente poder. Lo anterior
esta probado por medio de los siguientes documentos, que
certifico he visto*

(Ciudad) St. Louis

(Estado) Missouri

Hoy 19 del Diciembre de 2005

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

On this 19 day of Dec. of 2005
personally appeared

Dennis R. Hoerner

whom I know to be the person(s) who signed this document as
representative(s) of the Corporation /Company named
Monsanto Technology LLC

I certify:

a) That

Monsanto Technology LLC

is a corporation (Company legally constituted and in
existence in accordance with the laws of

b) That the domicile of said Corporation/Company is
St. Louis, Missouri

c) That the purpose or purposes for which the present
Power of Attorney is granted are comprised within the
object set forth in the charter of the mentioned
Corporation/Company.

d) That Mr. Dennis R. Hoerner
is (are) authorized to grant the present Power of Attorney. The
aforementioned was duly proven through the following
documents and I duly certify having seen them*:

(City) St. Louis

(State) Missouri

this 19 day of Dec of the year 2005

(Notary Public)

Michelle Ludwig

*Documents must be identified with date and origin



MICHELLE LUDWIG
My Commission Expires
July 13, 2009
St. Louis County
Commission #05550747

Apostille

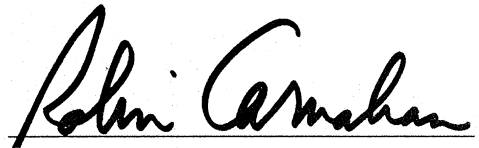
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document
2. has been signed by MICHELLE LUDWIG
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of MICHELLE LUDWIG-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 21ST day of DECEMBER, 2005
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 142500
9. Seal/Stamp
10. Signature:



de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia, al igual que la presente.-----

(Adjunto a un documento de Poder otorgado por MONSANTO TECHNOLOGY LLC)

Sello Notarial:

MICHELLE LUDWIG

Mi comisión vence Julio 13, 2009

Condado de St. Louis – Comisión #05550747

APOSTILLA

(Convención de La Haya de octubre 5, 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por Michelle Ludwig

3. actuando en su carácter de Notario Público

4. Lleva el sello de Michelle Ludwig – Notario Público – Estado de Missouri

CERTIFICADO

5. En Jefferson City, Missouri

6. El día 21 de Diciembre de 2005

DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

7. por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. No. 142500

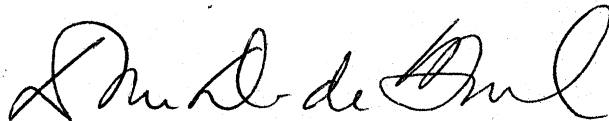
9. Sello (en dorado)

10. Firma:

(fdo) Robin Carnahan

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Febrero 9, 2006.



DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 FEB 13 A 11:55

Jefe de Legalizaciones
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

613662
Dora Duque
Cuya firma aparece en el
documento desempeña
las funciones indicadas

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Monsanto Technology LLC
 Huang, Jintai
 Ivashuta, Sergey
 Qi, Youlin
 Wiggins, Barbara E
 Zhang, Yuanji
 10 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA REGULACIÓN SELECTIVA DE LA
 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
 <130> 38-21(55174)-0001
 15 <140> US ##/###,###
 <141> 2012-0#-##
 <150> US 61/504,102
 20 <151> 2011-07-01
 <160> 151
 <170> PatentIn version 3.5
 25 <210> 1
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 30 <400> 1
 catgcactgg tgagtcactg ttg
 23
 35 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 40 <400> 2
 acagtgactc accagtgcac
 20
 45 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 50 <400> 3
 ggcctccctt ccctatggta gcc
 23
 55 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 60 <400> 4
 aagctattga ttccctaagt gcca
 24
 65 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 70 <400> 5
 aggcctccct tccctatg
 18
 75 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Zea mays
 <400> 6
 5 acagtgactc accagtgcac gcac
 24

 <210> 7
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Zea mays

 <400> 7
 15 catccgcccc ttcttcagtc
 20

 <210> 8
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Zea mays

 <400> 8
 25 acagtgactc accagtgcac g
 21

 <210> 9
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Zea mays

 <400> 9
 35 aaggcaagaa ggtgcttggt gtc
 23

 <210> 10
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> Zea mays

 <400> 10
 45 gcatgcactg gtgagtcact gttg
 24

 <210> 11
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Zea mays

 <400> 11
 55 atcaacgact acaacggtga a
 21

 <210> 12
 <211> 23
 60 <212> ADN
 <213> Zea mays

 <400> 12
 65 gcatgcactg gtgagtcact gtt
 23

 <210> 13
 <211> 25
 70 <212> ADN
 <213> Zea mays

 <400> 13
 75 caaggcaaga aggtgcttgt tgtcc
 25

 <210> 14

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 5 <400> 14
 catcaacgac tacaacggtg aa
 22
 10 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 15 <400> 15
 accatcaacg actacaacgg tgaa
 24
 20 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 25 <400> 16
 aggcctccct tccctatggt agcc
 24
 30 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 35 <400> 17
 gcatgcactg gtgagtcact gt
 22
 40 <210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 45 <400> 18
 aaggcctccc ttccctatg
 19
 50 <210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 55 <400> 19
 caaggcaaga aggtgctt
 18
 60 <210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 65 <400> 20
 aaggcaagaa ggtgcttggt gtcc
 24
 70 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 75 <400> 21
 aaggcctccc ttccctatgg tagcc
 25

```

    <210> 22
    <211> 21
    <212> ADN
5    <213> Zea mays

    <400> 22
    ctattgattc cctaagtgcc a
    21
10

    <210> 23
    <211> 18
    <212> ADN
15    <213> Zea mays

    <400> 23
    aagaagggtgc ttgttgtc
    18
20

    <210> 24
    <211> 23
    <212> ADN
25    <213> Zea mays

    <400> 24
    aacaagcacc ttcttgcctt gca
    23
30

    <210> 25
    <211> 23
    <212> ADN
35    <213> Zea mays

    <400> 25
    caaggcaaga aggtgcttgt tgt
    23
40

    <210> 26
    <211> 24
    <212> ADN
45    <213> Zea mays

    <400> 26
    caaggcaaga aggtgcttgt tgtc
    24
50

    <210> 27
    <211> 24
    <212> ADN
55    <213> Zea mays

    <400> 27
    accaaggatg tcgtcaccac caat
    24
60

    <210> 28
    <211> 24
    <212> ADN
65    <213> Zea mays

    <400> 28
    caacaagcac cttcttgcct tgca
    24
70

    <210> 29
    <211> 21
    <212> ADN
75    <213> Zea mays

    <400> 29

```

accatcaacg actacaacgg t
 21

5 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Zea mays

10 <400> 30
 aagctatcga ttcctaagt g
 21

15 <210> 31
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays

20 <400> 31
 agctatcgat tccctaagtg cca
 23

25 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Zea mays

30 <400> 32
 aaagctatcg attcctaag tgcca
 25

35 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

40 <400> 33
 aagctatcga ttcctaagt gccca
 24

45 <210> 34
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

50 <400> 34
 aggcaagaaa gtgcttggtg tcgg
 24

55 <210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

60 <400> 35
 tggctaattg ttgccaccag agag
 24

65 <210> 36
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Zea mays

70 <400> 36
 aagctattga ttcccgtaag tgcca
 25

75 <210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

5 <400> 37
 caaggcaaga aagtgcttgt tgtc
 24

 10 <210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 15 <400> 38
 aagctatcga ttcactaagt gc
 22

 20 <210> 39
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 25 <400> 39
 caaggcaaga aggttcttgt tgtc
 24

 30 <210> 40
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 35 <400> 40
 caaggcgaag aaggtgcttg ttgtc
 25

 40 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 45 <400> 41
 caaggatttc atcaccacca
 20

 50 <210> 42
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 55 <400> 42
 cgaagaaggt gcttggtg
 18

 60 <210> 43
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 65 <400> 43
 aagctatcga ttccctaagt gc
 22

 70 <210> 44
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 75 <400> 44
 ttaatgtcat tgccgccgag tac
 23

 <210> 45
 <211> 23

<212> ADN
 <213> Zea mays

 5 <400> 45
 aatgactcat tgttgccacc aga
 23

 10 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 15 <400> 46
 tgggtggtgat gaaatccttg
 20

 20 <210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 25 <400> 47
 gcatgcactg gtgattcact gttg
 24

 30 <210> 48
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 35 <400> 48
 aatgactcat tgttgccacc agag
 24

 40 <210> 49
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 45 <400> 49
 caaggcaaga aagggtgcttg ttgtc
 25

 50 <210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 55 <400> 50
 aaggtaagaa ggtgcttggt gtc
 23

 60 <210> 51
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 65 <400> 51
 aggcctccct tccctactgg tagcc
 25

 70 <210> 52
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 75 <400> 52
 caaggcaaga agctgcttgt tgtc
 24

<210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 5
 <400> 53
 caaggcaaga agttgcttgt tgtc
 24
 10
 <210> 54
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 15
 <400> 54
 catcaacgac tacaatggt
 19
 20
 <210> 55
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 25
 <400> 55
 gcacgggtcgt tgtctgggggt tc
 22
 30
 <210> 56
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 35
 <400> 56
 tagactagct aagtgtctgt gc
 22
 40
 <210> 57
 <211> 451
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 45
 <400> 57
 atccgctgca ggcagccaag caaagatctt tgggacaggt atatagctaa gatcttttggc
 60
 50 gcttgctaga attttcggaa tagccagctg gctcgggcat ctccttgcca agatcttttg
 120
 gacagggtgac caccagttgc atgggtgaat cccagacgac gaccacatct gatgagacat
 180
 55 acacaacgtc gtcgtctttg tcatcattct acctgacagt tgagaagacg acgaccacaa
 240
 ctgatcagat gtacacagcg ccaccgtctt taccatcatt gtaccttaca cccaaggaga
 300
 cgctgaacaa tgggtgtcatt tcgataagca actacaacac tgatgaagca ccttcgccgc
 360
 65 aacctgtatc gttggtatct gatgagatag acatttctga atcatcacct ccgccatctc
 420
 cgtcgccaca tacagtggat gagatggaca a
 451
 70
 <210> 58
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 75
 <400> 58

ctgtttgcta gaattttcgg aataggctgg ctccggcatc tccttgccaa gatctttggg
 60
 5 gcaggtgacg agttgcacgg tggatgaatcc cagacgacgg ccacatctga tgagacatac
 120
 acaatgccgt cgtctttgtc atcattctac ctgacagttg agaagacgat gaccacatat
 180
 10 gatgagatct acacagtgcc atcgtcttag tcatcattgt acctgacacc cgaggagacg
 240
 ccgaacaatg gtgccatttc gataagcaac tacgacactg atgaaccacc ttcgccgcca
 300
 15 catgtatcgt tggatctga tgagataaac atttctgaat catcacctcc gccatctccg
 360
 20 tcgccacata cagcggatga gatggacaac tctgaggcgt caccttcacc tttgtctcac
 420
 accatagaac tccaaatgtt t
 441
 25
 <210> 59
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 30
 <400> 59
 aataaaccgg ctccaacacc tacttgcaaa gatatttgga accggtgacc agctgcacga
 60
 35 cgatgaatcc tacaagacga ccatgtaata cacagtgtcg tcctcttcgt tctactactc
 120
 aacagagcag tcgccgacca ataacgaatg gagtattatc tctgtccttc accttacacc
 180
 40 atattcacac catagaactg caaatgtccg aggtaccaac taacatcggg acctttggca
 240
 tgaatgatga atgaagagga cggcgaatgac tatattagag aatgggaaag tgaataactg
 300
 45 ctcgatctgt cactaacaat t
 321
 50
 <210> 60
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 55
 <400> 60
 aaactcaaac tctatgattt atatgttttc gctaacctac taattgattt atactcttca
 60
 cactaattta gattattaac caagagaact agctatcacc atttctaaat ccactatttt
 120
 tttactttga aaactcaatg ttgaaaagag atcaacagag acgacatcta tggcaactta
 180
 65 tgtgttcttc tgcagatgta atacgtgctc acgttcggca cccaaatgct cgtagaccat
 240
 ggtcaagggtg agggacgacg tgaaccttcc catctatcag ggtgacaaca tcaatggcaa
 300
 70 gacatttgac gagaagagtc atgtttggac ccatacaaga tgctttcggg gtacacccaa
 360
 75 tccgctgtca tgctcaacct actctacgcc ttctccaccg gtggctactc aacattcagc
 420

gcgtcacgca gtggaaactt gatgtcaccg aacatagcaa gtaggggtgac atgtgaaata
 480
 5 aaatctttcca ttcactgagt t
 501
 10 <210> 61
 <211> 241
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 15 <400> 61
 agcagacacc acttcacaag caggatggca atgaactctg gttgtttgtt tgccagggtc
 60
 ccagccctat gaaagcgctg tacgtttacg cagtgtcttt tctactggcc aacttgtgtg
 120
 20 cgtgggtcat gcgagagaac cgtatatcat attacttagc gcagcggggc aacgcccgt
 180
 gtcacgggtga ccagggctgt ctgcgggctc agagcgtgct gacaattagc cagactttct
 240
 25 g
 241
 30 <210> 62
 <211> 401
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 35 <400> 62
 tcaccaaact tggaaataga ccggttcata taacaaccat caaaatccaa tatcttgatt
 60
 40 cgttatcttc tttccttacc atgcaaacac taaatacatg tagacctacg acaaaggccc
 120
 ccacatTTTT ctaggcaacc aaaatccgtg acatatacag ggatacgaag tgtcttcggt
 180
 45 tatatacagt gataacttct atgctggctg gttgagacgg acacgcttga cacatgggtg
 240
 ttccactcat ccacgactcc atagtcactg tcaggctcggg atcgagccat ctagacccat
 300
 50 gagaagcaag gatgcgaagg actcttcaac aattatttaa ttggacttgc tagatttagt
 360
 55 tacttatatt caatcccagt tgctctctat attaatTTGG t
 401
 60 <210> 63
 <211> 466
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 65 <400> 63
 tatttctagc cacacgggtca cgtttggacg accaataata ggcttgcaac ccttcaaatt
 60
 gtgtccatca gcttcccaac gtgcatatcg ccacctctg cttcgtgtcc catgtcacca
 120
 70 cccccactct tcctctttac atgcaatgca aataaagcag atccaacgtg gatgaggggtg
 180
 aatcggatgt tgaggtgggg tctgctaaat ctcccaaata atcaaattggc ggctgcaaca
 240
 75 acacgagggg atgtcattgg tcgatgagtt ggaggcgtca aatgcagata aagctacaac
 300

ttccatgtgg aggatgactg cgacgtttgtg gcagactcat ccactacagt gagagtctag
 360
 5 gaaagcatga agccgattgt ggacatcgat gtcggtgtca aggacttata gatgtcatgt
 420
 tgggagagca accatggcac gatagttaag gcgcaagggt atctgt
 466
 10 <210> 64
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 15 <400> 64
 gcaaaatgta taggaactag ccaccatcac cacttttcta gatttggttt caggttatct
 60
 20 atgatgttct tgctccaatt tgggtgtccgc aagagtcac ccttccttgc ttcaaacaag
 120
 tgcaaagtgt tagcagattt acaatttttt atttgcttct ataaccatag ggaatctgct
 180
 25 ctcataataa gtgatccaga aattcaataa ttattacgag agtcgtcgtg ttagcatggg
 240
 30 attattaagg ggctctgcaa aaaatgagggc tgagcttctg gatctcgaga aaaatataaa
 300
 ggtctatcaa tatatgtata gtatgtatgc ttgtcaccat ttggagtcac ataattttcg
 360
 35 ccaggtgtat gtgtggttgt c
 381
 40 <210> 65
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 45 <400> 65
 cagaagacga cgtaccatat ggcttagtac caagcagaaa gaatgccaaa ggcctagggc
 60
 aaattaaggg tggcaattac tagagccccg gccaggacgt gtctctgttc ttggaaagcc
 120
 50 cgaagaacgc cctctcaacg gcctgattcc cgttctaacg ctgcatcaga ttaacatcca
 180
 55 cagcacggga tgcagcggca ccatgggatg tgagcaaagc gtgtaaccaa ggcgaagaca
 240
 actcgaacac cattgtccgg catcctcatc aaagaacaaa gagctagcta gcgagcagcg
 300
 60 aggtatcaca gtgcaaatgc aatacagacg gacatctgaa tcggccacgt tgcattcatg
 360
 tatcggacga cggggagacg agaagcacta tttagaacag ggacagacac catagcttct
 420
 65 agctctgtat cgcttgggag c
 441
 70 <210> 66
 <211> 451
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 75 <400> 66
 tctgcaggca gccaaagctag cgaagcacgg acgacaataa tgaactgtgt cttctcctgc
 60

cagggcctca gccctatgaa cgtcagatac ctgtatgcgg ctatcttcct cgtggcgaac
 120
 5 ctgtctgcgt ggttcgcacg agagaacacc gtatcgtatt acctgaagca gcgactcagc
 180
 ggcgcctgtc aggggtgaccg gggttgtctc gcggctgaaa gcgtgctcgt ggcgagccat
 240
 10 gccttctttg taccctacag tttaaacaac attgtttttt atctaacaat tttctgtatt
 300
 atgattgctc tgaccttaac aaatcgtcca gctctttttt atggccatgt tcttctccac
 360
 15 tgtacgcacc ggcaagggtga atgagttgag aaattcatgg cactgcgggt ggtggccagt
 420
 20 gaagattgcc ctcttcatgg tctgttctct c
 451
 <210> 67
 <211> 511
 25 <212> ADN
 <213> Zea mays
 <400> 67
 30 ggagtgaacc aaatgagctt atgttcttat atgactacta gctagaagtt agagcctaga
 60
 tgatggctgc ttctgttggc gtgaaagctc gagtgctcct aaatggctgt cgtattagct
 120
 35 gatacgacat ctacccgatg caatagataa tattgtttac acgcgtgagt ccaaaattgt
 180
 tggctttggg tcggagcagt taatgcgaga agtgtatttt atcacttctg agtgcaacct
 240
 40 tttttttatt atttttccga gcttctgcct cttgcatatg ttgtagattc tcgccgagaa
 300
 45 gggagtagta gtattacctg atatctatgc taattcaggt ggtgtggtcg ttagctactt
 360
 taattgagtg gggtcagaac attcaagggt tcatgtgggc cgaggagaaa gtggacgatg
 420
 50 aactagaaaa ggacatgagc agtgcttttc aacacatgaa ggccatgtgc aaatctttgg
 480
 tgctgccgaa gtgtgtcgtg acattggaat t
 511
 55 <210> 68
 <211> 351
 <212> ADN
 60 <213> Zea mays
 <400> 68
 tatgaccatg ttcttctcca ctgtacgcac cggcaagggt aatgagttga gaaattcatg
 60
 65 gcactccggg tgggtggccag tgaagattgc cctcttcatg gtctgttctc tcattctctgt
 120
 cttggctcca tcctgggtgga tccaaatcta tgttatgaaa cattgtagag tcagaagacg
 180
 acgtatcata tgggtatggc tttttccatt tcgccttcgc ggcgggctcc atgtacgtca
 240
 75 ggatggtgtt tgtcggctgg gacacacatc atacaatgaa gcaatggagc gtggatattg
 300

ggtggatgag cacgtgggtt catatcgcca atgaggctct cgtagtagta t
 351

5 <210> 69
 <211> 431
 <212> ADN
 <213> Zea mays

10 <400> 69
 taggactgta cttgtgttgg actctaggct taagctatgt atatatatgc tagcattagg
 60

15 acctcatatt ataataagta ttatttcaag acgaccatcc gattagtgtg gctacgtcga
 120

acgcccgcgc catgattgca acattctagt ggccaatgtt gttgacttca ggcaaatac
 180

20 ggtggagatg ctctctcgac tagagctcgg gacgacaggg ctcaagaccc tcacgcgcga
 240

ggtgatggac gtgctcatcg acaagcccaa gcatgtgaca ctcggcaggt ggaaaagacg
 300

25 ttcttttggc cccacaggt ctagtacgtc gttgttgatg tctatgagtt ctacaaggtt
 360

30 ggttgtctgt tgttcatgac agagcgcacg cacagctgat ggaaggacgc cgccgtctat
 420

ttgcatggag a
 431

35 <210> 70
 <211> 461
 <212> ADN
 <213> Zea mays

40 <400> 70
 gtcggaggaa gctgctgaaa aaggtttaact ttatctatgg gactaagctt caattcggca
 60

45 tcctcccatt cttcagtcctt aatgtcgttg ccgccgagta caacagtgac tcaccagtgc
 120

atgcacacca aggatgtcgt caccaccaat accatcaacg actacaacgg tgaagagttt
 180

50 gtctttctact ctccatggga gtacggtgcc aaaacaaact caataataga ctaccacacc
 240

55 aacaaaaatg actcattgtt gccaccagag agaatgtata gcctattatg tctggcactt
 300

agggaaatcga tagctttaag gtgaagtcac ccactcaagt ggctaccata gggaagggag
 360

60 gccttgcaag gcaagaaggt gcttggtgtc cgttggtgata acaccttttc aacaataatg
 420

ttcataccta cattgttcgt tcgtcgttgg gtaaaaacat t
 461

65 <210> 71
 <211> 361
 <212> ADN
 <213> Zea mays

70 <400> 71
 tgaggatgaa gtaggtgttg cagttgctgg agtacccaaa cctgacgtag ctggagacga
 60

75 cgctcaagac gatcgaggcc ttgctgccga tcgtctttgc tagggagaca cgacacttga
 120

atgagtgcc t cgtcgatacc gtcattgggtc gtgccttcct cttctagggt gacaactaag
 180
 5 ctgaaagctt caaagagttc aacatcgaca acatatgtgg caccatctgc gtcctcctac
 240
 agatatttgt cgtgctcacg ttcggtaccc aaatgcccg tgaaccgtgg caagataccc
 300
 10 catctacacc atgagcagag acaacacgca aaatgagatt cctttcgctt ttgatcaaac
 360
 a
 15 361
 <210> 72
 <211> 481
 <212> ADN
 20 <213> Zea mays
 <400> 72
 tttaaatgt gatgttgggt aaagctgaaa ttacgtagag gtgtcctagt aatggaattt
 60
 25 caaagtttgg taaaaaacta ggagtcaaca tagtaaata aaatatttat gttggaatat
 120
 attatataca tggacacagt gatccaaccg ctatgtatgt tggtttgaac tacacaacta
 180
 30 aagtagctaa aagaatgcaa gataggggtt cgcaaaccgg cttggtggca ctttgttgggt
 240
 35 ctccatgatc caagatatac tttctgggta ctgcgaaaca ctttctccta caatcaactt
 300
 gagatatcga gggcaagtgg gccgttcaaa gatgtattaa tgttgatatt ggtgccagtc
 360
 40 gatctactga tgggtgacgat gatgaaagt ttgacacctt tcgtcttcag gagcaacccc
 420
 gttcgacaag aaaatcgttg attctaaaga tctcaacgac gtttaccctg actacaacac
 45 480
 a
 50 481
 <210> 73
 <211> 451
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 55 <400> 73
 agtgaatgaca agttcagaag tgtgaggagg cgtaggaaaa atacttgggt cacttcaaga
 60
 60 acatatgatg gcaagaggcg caactctaca gatatttaca acagacgcat gcatgtattc
 120
 tacaatgaac taactacgta tattaggttt ctccaataat gtcgacctca agatttcact
 180
 65 acaatctttt cctagcgagg tcctccgggg gcgagatcca ggtccaacca agggctctct
 240
 acgcaatcac ggacaatcca ccaccctacc gtggacgatc cggtgacctt ttgcggacag
 300
 70 accaatgacc tatcgtgaac cattcaacac ctgcgaagc cgaacctaa gttttgctca
 360
 75 tcatgaggag accatagggc tcattgctat ttgaccctaa taagacttca tcatagagg
 420

ggaattcaag accatattgc aggtagtgtt a
451

5 <210> 74
<211> 361
<212> ADN
<213> Zea mays

10 <400> 74
tcagaggaag ctgctgaaaa aggttaactt tatctctggg gctaagcttc aattcggcat
60

15 ctgcccattc ttcagtctta atgtcattgc tgccgagtac aacagtgact caccggtgca
120

tgcacaccaa ggatgtcatc actaccagca ccatcaacga ctacaatagt gaagagttag
180

20 tcttctactc tacacgggag taccacacca accaaaatgg ctcatgtgtg ccaccaaaca
240

gaatgtatag cctattatgt ctggcactta gggactcgat agctttaagg gcaagttatg
300

25 cactcaagtg actatcatag ggaagggagg ccttccaagg aaagaagggtg cttgtttgtcg
360

30 g
361

35 <210> 75
<211> 371
<212> ADN
<213> Zea mays

40 <400> 75
ggagtgaacc aaatgagctt atgttcctat atgactatta gctagaagtt agagcctaga
60

tgatggctgc ttctgttggc gtgaaagctc gagtgtcctt aaatggtcgt tgtattagct
120

45 gatacgacat cgacccgatg caatagataa tattgtttac acgcgcgagt ccaaaattgt
180

tggttttgag tcggagcagt taacacgaga agtgtatatt atcacttctg agtgcaacct
240

50 tttttttatt atttttccga gcttctgcct cttgcatatg ttgtagattc tcgtcgagaa
300

55 gggagtagta gtattacctg atatctatgc taattcaggt ggtgtggtcg ttagctactt
360

taattgagtg a
371

60 <210> 76
<211> 191
<212> ADN
<213> Zea mays

65 <400> 76
catgagcagt gcttttcaac acatgaaggc catgtgcaaa tctttggtgc tgccgaagtg
60

70 tgccgtgaca ttggaattgc gggctctagaa aagcaagctc attagatttc tgaaaaaaca
120

ttaggagtta ttagattggt agcatttttt taagatttaa aattttatag aagtcatcat
180

75 tttcgtttat t
191

<210> 77
 <211> 241
 <212> ADN
 5 <213> Zea mays

 <400> 77
 tgcaggccgc caagcaaatac acggatgacg atgaactgtg tcttctcctg ccactgtcag
 60
 10 ggcctcagcc ctatgaatgt cagatacctg tatgcggcta tcttctcctt ggccaacctg
 120
 15 tctgcgtggt tcgcacgaga gaacaccgta tcatatcacc tgaagcagcg actcagcgga
 180
 tgtcaggggtg accgggggttg tctcgcgggtt gaaagcgtgc tcgtggcaag ccatgctctt
 240
 20 t
 241

 25 <210> 78
 <211> 431
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 <400> 78
 30 tctttggaac agatgaccag ctgcacggcg atgaatccca tacgacgacc gtgcatggtg
 60
 atgaagccga gacgacgacc gtgcatggtg atcaagccga gacgacgacc gtgcatgttg
 120
 35 atgaagccga gacgacgacc gtgcatggtg atcaagccga gacgacgact gtgcatggtg
 180
 40 atgaatccga gactacgacc gtgcatggtg atgaatccga gacgacgacc gtgcatggtg
 240
 atgaatcaca gacgacgaac acgcatgtca catcgccgtc ctctttgtat cacacagcgt
 300
 45 cgccctcttc gctctactac tccccgagc atcaccgacc aataacattg accatcaacc
 360
 tcctccgtcg ccgccgcgtt caccgtcctc ccttcacacc atagaactgc aaatgtccga
 420
 50 gataccaaat a
 431

 55 <210> 79
 <211> 471
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 <400> 79
 60 acttggtgct agaattttcg gaataggctt gtcctgacat ctccttgcca agatcttcgg
 60
 gacaggtgac cgattgcata gtggtgaatc ccagacgacg accacacatc tgatgagatg
 120
 65 tacacaacgt cgtcgtcttt ttcattcattc taccgaacaa ctgaggagac gatgaccaca
 180
 70 tccgatgaga tgtacacaac accgtcatct ttgtcatcat tgtacctaac acccgaggag
 240
 acgctgaaca atgatgccat ttcgataagc aactacgaca ctgatgatcc accttcgccg
 300
 75 ccacctgtat cgttggtatc tgatgacgta gacatttctg aaccatcacc tccgccatct
 360

ccgccgccac atagagtgga tgagatggac aactctgagg catcctttgt cccacaccat
 420
 5 atagctccaa atgtttgagg taccaattac ctcaggcaat aatgaggagg a
 471
 10 <210> 80
 <211> 298
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 15 <400> 80
 cgacaacaag cactttcttg ccttggaagg cctcccttcc ctattgtagt cactcgagtg
 60
 cataacttgc ccttaaagct atcgattcac taagtgccag acataatagg ctatacattc
 120
 20 tctctggtgg caacaattag ccattttggt tgggtgtgga gtctattatt gagttttttg
 180
 gcacgatact tctgtgtaga gtagaagaca aactcttcac cattgtagtc gttgatggtg
 240
 25 ctgggtggtga tgaaatcctt gctgtgcatg caccggggaa tcactattgt attcggca
 298
 30 <210> 81
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 35 <400> 81
 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg
 60
 gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acataatagg ctatacattc
 120
 40 tctctggtgg caacaatgag tcattttggt tgggtgtgga gtctattatt gagtttggtt
 180
 45 tggcaccgta ctcccatgga gagtacaaga caaactcttc accgtttagt tcgttgatgg
 240
 tattggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactggtg agtcactggt gtactcggcg
 300
 50
 55 <210> 82
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 60 <400> 82
 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg
 60
 gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acataatagg ctatacattc
 120
 65 tctctggtgg caacaatgag tcattttggt tgggtgtgga gtctattatt gagtttggtt
 180
 tggcaccgta ctcccatgga gagtacaaga caaactcttc accgtttagt tcgttgatgg
 240
 70 tattggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactggtg agtcactggt gtactcggcg
 300
 75 <210> 83
 <211> 298
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 83
 cgacaacgag cactttcttg ccttggaagg cctcccttcc ctattgtagt cactctagtg
 60
 5 cataacttgc ccttaaagct atcgattcac taagtgccag acataatagg ctatacatte
 120
 tctctagtgg caacaattag ccattttggt tgggtgtgga ctctattatt gagttttttg
 180
 10 gcacgggtact tccttgtaga gtagaagaca aactcttcac cattgtagtc gttgatgggg
 240
 ctgggtgggtga tgaaatcctt ggtgtggatg caccggggaa tcactattgt actcggcg
 15 298
 <210> 84
 <211> 297
 20 <212> ADN
 <213> Zea mays
 <400> 84
 cgacaacgag cactttcttg ccttggaagg cctcccttcc ctattgtagt cactcgagtg
 25 60
 cataacttgc ccttaaagct atcgattcac taagtgccag acaaaatagg ctatacatte
 120
 30 tctctagtgg caacaattag ccattttggt tgggtgtgga ctctattatt gagttttttg
 180
 cacgggtactt ccttgtagag tagaagacaa actcttcacc attgtagtcg ttgatggggc
 240
 35 tagtgggtgat gaaatccttg gtgtggatgc accgggggaat cactattgta ctcggcg
 297
 40 <210> 85
 <211> 592
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 45 <400> 85
 gagaccagga ttgttccaac ttcatataga ccatagttag tgacagcatt aaagtttgag
 60
 atgttgaatg ctaaaaaaca attagtcaca atattgttta gataaaaatt tgagatgtcg
 50 120
 gaggaagctg ctgaaaaagg ttaactttat ctatgggact aagcttcaat tcggcatccg
 180
 55 cccattcttc agtcttaatg tcgttgccgc cgagtacaac agtgactcac cagtgcatgc
 240
 acaccaagga tgcgtcacc accaatacca tcaacgacta caacggtgaa gagtttgtct
 300
 60 tctactctcc atgggagtac ggtgccaaaa caaactcaat aatagactac cacaccaacc
 360
 aaaatggctc attgttgcca ccagagagaa tgtatagcct attatgtctg gcacttaggg
 65 420
 aatcgatagc ttttaagggtga agtcatccac tcaagtggct accatagga agggaggcct
 480
 70 tgcaaggcaa gaagggtgctt gttgtccgtt gtgataacac cttttcaaca ataatgttca
 540
 tacctacatt gtttggtcgt cgttgggtaa aaacattgct atatctattt at
 592
 75
 <210> 86
 <211> 338

<212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 86
 5 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg
 60
 gatgacttca ccttaaagct attgattccc taagtgccag acataatagg ctatacattc
 10 120
 tctctggtgg caacaatgag ccattttggt tgggtgtgga gtctattatt gagttttttt
 180
 tggcaccgta ctcccatgga gagtagaaga caaactcttc accgtttagt tcgttgatgg
 15 240
 tattggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactggtg agtcactggt gtactcggcg
 300
 gcaacgacat taagactgaa gaatgggcgg atgccgaa
 20 338

<210> 87
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 87
 30 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg
 60
 gatgacttca ccttaaagct attgattccc taagtgccag acataatagg ctatacattc
 120
 35 tctctggtgg caacaatgag ccattttggt tgggtgtgga gtctattatt gagttttttt
 180
 tggcaccgta ctcccatgga gagtagaaga caaactcttc accgtttagt tcgttgatgg
 40 240
 tattggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactggtg agtcactggt gtactcggcg
 300

45
 <210> 88
 <211> 104
 <212> ADN
 <213> Zea mays

50
 <400> 88
 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg
 60
 55 gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acat
 104

60
 <210> 89
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Zea mays

65
 <400> 89
 ctcttcaccg ttgtagtcgt tgatggtatt ggtggtgacg acatccttgg tgtgcatgca
 60
 ctggtgagtc actgttgtac
 80

70
 <210> 90
 <211> 184
 <212> ADN
 75 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Elemento ADN sintético

<400> 90
 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg
 60
 5 gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acatctcttc accgtttag
 120
 10 tcgttgatgg tattggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactggtg agtcactgtt
 180
 gtac
 184
 15
 <210> 91
 <211> 184
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Elemento ADN sintético
 25
 <400> 91
 ctcttcaccg ttgtagtcgt tgatggtatt ggtggtgacg acatccttgg tgtgcatgca
 60
 ctggtgagtc actgttgtac ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc
 120
 30 ctatggtagc cacttgagtg gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag
 180
 acat
 184
 35
 <210> 92
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Elemento ADN sintético
 45
 <400> 92
 ggacaacaag caccttcttg ccttgcagta ttggtggtga cgacatcctt ggtgtgcatg
 60
 50 cactggtgag tcactgttgt
 80
 55
 <210> 93
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Elemento ADN sintético
 65
 <400> 93
 tacaacagtg actcaccagt gcatgctctg gcacttaggg aatcgatagc tttaccatag
 60
 ggaagggagg ccttgc
 76
 70
 <210> 94
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 75
 <220>
 <223> Elemento ADN sintético
 <400> 94

ggacaacaag caccttcttg ccttgcatat aacagtgact caccagtgcg tgctctggca
 60
 5 cttaggggaat cgatagcttt a
 81
 <210> 95
 <211> 1368
 10 <212> ADN
 <213> Agrobacterium sp. cepa CP4
 <400> 95
 15 atgcttcatg gagcttcatc taggccagct actgccagga agtctagcgg gctcagtggc
 60
 accgtgcgca tccctggcga taaaagtatt tcacacagga gcttcatggt cggaggactt
 120
 20 gctagtggag agacgagaat cactggtttg cttgagggcg aagatgttat caacaccggt
 180
 aaggcgatgc aagcaatggg tgccagaatc cgaaaagagg gcgatacgtg gatcatcgac
 240
 25 ggtgttggta acggaggatt gctcgctccc gaagcgccac ttgactttgg gaacgcagct
 300
 acgggggtgcc gtcttactat gggactggta ggcgtgtatg actttgactc taccttcatc
 360
 ggtgacgcga gcctcactaa gagaccaatg ggacgagtgc tgaatcccct gagggagatg
 420
 35 ggtgtccagg tgaaatctga ggatgggtgat cgtcttccgg ttactctgcg agggcccaag
 480
 acccccacgc caatcacgta caggggttccg atggcgtcag cacagggtcaa gtcagcggta
 540
 40 ctcttggcgg gcctcaacac acctggaatc acaaccgtga ttgaacccat catgactaga
 600
 gaccacacgg agaagatgtt gcaggggttc ggcgctaatc taacggtcga aaccgacgcc
 660
 45 gacggcgtga ggacaatccg cttggagggc agaggtaaac tgactggcca agtcatcgat
 720
 gtgcctggag atccctcgtc cacagcgttt cccctcgtag ctgcgttgct cgtccctgga
 780
 tctgatgtga cgatcctgaa tgtcctcatg aatccaacta gaaccggcct catcctcaca
 840
 55 ttgcaggaga tgggtgctga catcgagggt atcaatccta ggttggcagg tggagaggat
 900
 gtggccgatc tgcgcgtgcg ttctagtaca ctcaaaggcg tgaccgtccc tgaggatcgc
 960
 60 gctccatcca tgatcgacga gtacccatt ctgcgcgttg ctgctgcgtt tgccgagggc
 1020
 gcaactgtaa tgaacggcct tgaggagtgg aggggttaagg agagtacag gctgtccgcg
 1080
 gtggcgaatg gcctgaagct aaacggcgtg gactgcgacg aagggtgaaac gtcccttgta
 1140
 70 gtccgtggtc gccagacgg gaaggggttg gggaatgctt cgggagctgc tgtggcgacg
 1200
 caccttgatc atagaatcgc catgtcattt ctggtgatgg gacttgtctc cgagaatccg
 1260
 75 gtgaccgttg acgatgctac catgatcgcc acctcctttc ctgagttcat ggacctcatg
 1320

gcaggccttgg gggccaagat cgagctgtct gatactaagg ccgcttga
1368

5
 <210> 96
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Elemento ADN sintético

15
 <400> 96
 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg
60

20
 gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acataatagg ctatacattc
120

25
 tctctggtgg caacaatgag tcattttggt tgggtgtgga gtctattatt gagtttggtt
180

30
 tggcaccgta ctcccatgga gagtacaaga caaactcttc accgtttagt tcgttgatgg
240

35
 tatttggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactggtg agtcactggt gtactcggcg
300

40
 <210> 97
 <211> 104
 <212> ADN
 <213> Zea mays

45
 <400> 97
 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg
60

50
 gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acat
104

55
 <210> 98
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Zea mays

60
 <400> 98
 ctcttcaccg ttgtagtcgt tgatgggtatt ggtggtgacg acatccttgg tgtgcatgca
60

65
 ctggtgagtc actgttgtag
80

70
 <210> 99
 <211> 184
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

75
 <220>
 <223> Elemento ADN sintético

80
 <400> 99
 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg
60

85
 gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acatctcttc accgtttagt
120

90
 tcgttgatgg tatttggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactggtg agtcactggt
180

95
 gtac
184

<210> 100
 <211> 184
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Elemento ADN sintético
 <400> 100
 10 ctcttcaccg ttgtagtcgt tgatggtatt ggtggtgacg acatccttgg tgtgcatgca
 60
 ctggtgagtc actgtttgtac ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc
 120
 15 ctatggtagc cacttgagtg gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag
 180
 acat
 20 184
 <210> 101
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Elemento ADN sintético
 30
 <400> 101
 ggacaacaag caccttcttg ccttgcagta ttggtggtga cgacatcctt ggtgtgcatg
 60
 35 cactggtgag tcactgttgt
 80
 <210> 102
 <211> 251
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 40
 <400> 102
 45 gaggaaccg aaaccacatc acatccatac agtggcgaaa gacacagtag ggctaagtat
 60
 tgcggctttg gtagttgtca tatctaaact tttagatagtc ttatatgtta gagtactcgt
 120
 50 taggggtttg attgtctcct gtgtatttac cctctcgac ttattgtaat gggcctggcc
 180
 caactatcga gtgtatcaaa caacgccgcc caacccact caagggttag ggtttccac
 240
 55 attatatctt c
 251
 60
 <210> 103
 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 65
 <400> 103
 gtagggctaa gtattgcggc ttggtagtt gtcatatcta aacttttgat agtcttatat
 60
 70 gttagagtac tcgttagggt ttgattgtc tcctgtgtat ttaccctctc gcacttattg
 120
 t
 121
 75
 <210> 104
 <211> 216

<212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Elemento ADN sintético

 <400> 104
 acacgtggac aacaagcacc ttcttgcctt gcagtattgg tggtgacgac atccttggtg
 60
 10 tgcattgacct ggtgagtcac tgttgtgttag ggctaagtat tgcggctttg gtagttgtca
 120
 tatctaaact ttgtatagtc ttatatgtta gactactcgt tagggttttg attgtctcct
 15 180
 gtgtattttac cctctcgac ttattgtcct gcagga
 216
 20
 <210> 105
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 25
 <400> 105
 accaaagccg caatacttag cccta
 25
 30
 <210> 106
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 35
 <400> 106
 accaaagccg caatacttag ccct
 24
 40
 <210> 107
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 45
 <400> 107
 accaaagccg caatacttag ccct
 24
 50
 <210> 108
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 55
 <400> 108
 caaagccgca atacttagcc ct
 22
 60
 <210> 109
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 65
 <400> 109
 caaagccgca atacttagcc ct
 22
 70
 <210> 110
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 75
 <400> 110
 accaaagccg caatacttag ccc
 23

5 <210> 111
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 10 <400> 111
 ggctaagtat tgcggctttg gtag
 24

 15 <210> 112
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 20 <400> 112
 gacaactacc aaagccgcaa tact
 24

 25 <210> 113
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 30 <400> 113
 gatatgacaa ctaccaaagc cgc
 23

 35 <210> 114
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 40 <400> 114
 tagatatgac aactaccaa gccg
 24

 45 <210> 115
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 50 <400> 115
 gatatgacaa ctaccaaagc c
 21

 55 <210> 116
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 60 <400> 116
 atcaaaagtt tagatatgac aact
 24

 65 <210> 117
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 70 <400> 117
 ttgtcatatc taaacttttg atag
 24

 75 <210> 118
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 <400> 118

acgagtactc taacatataa gact
24

5 <210> 119
<211> 21
<212> ADN
<213> Zea mays

10 <400> 119
agtactctaa catataagac t
21

15 <210> 120
<211> 24
<212> ADN
<213> Zea mays

20 <400> 120
gtcttatatg ttagagtact cgtt
24

25 <210> 121
<211> 24
<212> ADN
<213> Zea mays

30 <400> 121
tcttatatgt tagagtactc gtta
24

35 <210> 122
<211> 24
<212> ADN
<213> Zea mays

40 <400> 122
atcaaaaccc taacgagtac tcta
24

45 <210> 123
<211> 24
<212> ADN
<213> Zea mays

50 <400> 123
agacaatcaa aaccctaacg agta
24

55 <210> 124
<211> 24
<212> ADN
<213> Zea mays

60 <400> 124
gagacaatca aaaccctaac gagt
24

65 <210> 125
<211> 24
<212> ADN
<213> Zea mays

70 <400> 125
caggagacaa tcaaaaccct aacg
24

75 <210> 126
<211> 24
<212> ADN
<213> Zea mays

5 <400> 126
 acaggagaca atcaaaaccc taac
 24

10 <210> 127
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

15 <400> 127
 cacaggagac aatcaaaacc ctaa
 24

20 <210> 128
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

25 <400> 128
 acacaggaga caatcaaaac ccta
 24

30 <210> 129
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

35 <400> 129
 acacaggaga caatcaaaac ccta
 24

40 <210> 130
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays

45 <400> 130
 cacaggagac aatcaaaacc cta
 23

50 <210> 131
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Zea mays

55 <400> 131
 caggagacaa tcaaaaccct a
 21

60 <210> 132
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays

65 <400> 132
 acacaggaga caatcaaaac cct
 23

70 <210> 133
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

75 <400> 133
 gggttttgat tgtctcctgt gtat
 24

 <210> 134
 <211> 22

<212> ADN
 <213> Zea mays

 5 <400> 134
 acacaggaga caatcaaaac cc
 22

 10 <210> 135
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 15 <400> 135
 aatacacagg agacaatcaa aacc
 24

 20 <210> 136
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 25 <400> 136
 tgattgtctc ctgtgtat
 18

 30 <210> 137
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 35 <400> 137
 gattgtctcc tgtgtattta ccct
 24

 40 <210> 138
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 45 <400> 138
 gagagggtaa atacacagga gaca
 24

 50 <210> 139
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 55 <400> 139
 tctcctgtgt atttaccctc tcgc
 24

 60 <210> 140
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 65 <400> 140
 cgagagggt aatacacagg aga
 23

 70 <210> 141
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays

 75 <400> 141
 cgagagggt aatacacagg aga
 23

<210> 142
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 5
 <400> 142
 tctcctgtgt atttacctc tcg
 23
 10
 <210> 143
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 15
 <400> 143
 ctcctgtgta tttaccctct cgca
 24
 20
 <210> 144
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 25
 <400> 144
 cgagagggt aatacacagg a
 21
 30
 <210> 145
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 35
 <400> 145
 tacaataagt gcgagagggt aaat
 24
 40
 <210> 146
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 45
 <400> 146
 tacaataagt gcgagagggt aaat
 24
 50
 <210> 147
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 55
 <400> 147
 acaataagt cgagagggt aat
 23
 60
 <210> 148
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 65
 <400> 148
 tacaataagt gcgagagggt aaa
 23
 70
 <210> 149
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 75
 <400> 149
 acaataagt cgagagggt aa
 22

5 <210> 150
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Elemento ARN sintético
10 <400> 150
 acagugacuc accagugcau g
 21

15 <210> 151
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> secuencia artificial
20 <220>
 <223> Elemento ARN sintético

 <400> 151
25 caaggcaaga aggugcuugu uguc
 24

30

RESUMEN

La invención presenta métodos y composiciones para suprimir selectivamente la expresión de una proteína recombinante en un tejido reproductor masculino de una planta transgénica. La invención presenta asimismo métodos y composiciones para inducir la esterilidad masculina en una planta transgénica. Las plantas, células vegetales, partes de plantas, semillas y productos de consumo que incluyen dichas composiciones constituyen aspectos de la invención.

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA REGULACIÓN SELECTIVA DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud provisoria de Estados Unidos 61/504,102, que fue presentada el 1 de julio de 2011, que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 El listado de secuencias contenido en el archivo denominado "MONS294US.txt", que tiene un tamaño de 40,5 kilobytes (tamaño medido en Microsoft Windows®) y que fuera generado el 15 de junio de 2012, se presenta junto con este documento mediante presentación electrónica y se incorpora a la presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

- 15 La invención se relaciona, en general, con los campos de la agricultura, el mejoramiento genético de plantas y la biología molecular. Más específicamente, la invención se relaciona con métodos y composiciones para suprimir en forma recombinante la expresión de proteínas en el tejido reproductivo masculino de las plantas transgénicas y con usos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 20 La semilla híbrida, es decir la semilla producida mediante la hibridación o fertilización cruzada de plantas estrechamente relacionadas, puede ser cultivada para obtener plantas híbridas de la progenie procesando una combinación conveniente de rasgos que no posee ninguna de las plantas progenitoras. Las
25 plantas híbridas pueden exhibir características agronómicas superiores, que incluyen la mejora del tamaño de la planta, el rendimiento, la composición nutricional, la resistencia a las enfermedades, tolerancia a los herbicidas, tolerancia al estrés, adaptación climática y otros rasgos ventajosos. La producción eficiente de semillas híbridas requiere que no se permita que el propio polen de la
30 planta autofertilice la planta.

En la producción de semillas híbridas, se puede prevenir la producción y/o diseminación del polen en una planta progenitora hembra a fin de facilitar la

polinización cruzada de la hembra en lugar de autopolinización. Dicha prevención se puede lograr, por ejemplo, mediante la remoción manual de las estructuras con contenido de polen (por ej., despanojado manual o mecánico en el caso del maíz), el uso de un medio genético de control de la polinización (por ej., macho 5 esterilidad citoplasmática, macho esterilidad nuclear) y/o el uso de un agente químico.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La invención se relaciona, en general, con métodos para suprimir selectivamente la expresión de proteínas recombinantes en el tejido reproductivo 10 masculino de las plantas transgénicas, con constructos de ADN recombinante útiles en dichos métodos, como así también con plantas, células y semillas transgénicas que contienen dichos constructos de ADN recombinante. Los constructos de ADN recombinante y las plantas, células y semillas transgénicas que contienen dichos constructos ofrecen una manera muy mejorada de utilizar 15 herbicidas para inducir la esterilidad masculina en plantas transgénicas para la producción de semillas híbridas.

En un aspecto, la invención presenta un constructo de ADN recombinante que incluye una secuencia codificadora de proteínas que codifica una proteína recombinante y un elemento ARNsi específico del tejido masculino (el ARNsi-mts) 20 operativamente ligado a la secuencia codificadora de proteína. En una forma de realización, el elemento ARNsi-mts está incluido dentro de la región 3' sin traducir de la secuencia codificadora de proteína. En otra forma de realización, el elemento ARNsi-mts está situado entre la secuencia codificadora de proteína y una secuencia de poliadenilación que es parte de una región 3' sin traducir. En 25 otra forma de realización, el elemento ARNsi-mts incluye por lo menos una secuencia de ARNsi-mts. En otra forma de realización, el elemento ARNsi-mts incluye por lo menos una secuencia de ARNsi-mts seleccionada del grupo que consiste en **SEC ID NO: 1-56 y 105-149**. En otra forma de realización, el elemento ARNsi-mts es seleccionado del grupo que consiste en **SEC ID NO: 57- 30 94 y 96-104**. En otra forma de realización, la expresión de la proteína recombinante en una planta transgénica confiere a la planta por lo menos la

tolerancia vegetativa a los herbicidas. En otra forma de realización, la proteína recombinante es una EPSPS tolerante al glifosato.

Otro aspecto de la invención presenta un método para generar un constructo de ADN recombinante que incluye identificar un elemento ARNsi-mts que incluye por lo menos una secuencia de ARNsi-mts y ligar operativamente el elemento ARNsi-mts a una secuencia codificadora de proteína, por ejemplo una secuencia de ADN que codifica una proteína recombinante. En una forma de realización, el elemento ARNsi-mts incluye por lo menos una secuencia de ARNsi-mts seleccionada del grupo que consiste en **SEC ID NO: 1-56 y 105-149** o es por lo menos un elemento ARNsi-mts seleccionado del grupo que consiste en **SEC ID NO: 57-94 y 96-104**. En otra forma de realización, el elemento ARNsi-mts es específico de las panojas.

En otro aspecto, la invención da a conocer una planta transgénica que incluye un constructo de ADN recombinante de la invención, como así también una semilla, célula o parte de la planta transgénica. En una forma de realización, la planta es una planta monocotiledónea. En otra forma de realización, la planta es una planta de maíz (*Zea mays*).

En otro aspecto, la invención también presenta un método para suprimir selectivamente la expresión de una proteína recombinante en un tejido reproductor masculino de una planta transgénica mediante la expresión en la planta transgénica de un constructo de ADN recombinante que incluye una secuencia codificadora de proteína operativamente ligada a una secuencia de ADN que incluye un elemento ARNsi-mts. En una forma de realización, el elemento ARNsi-mts incluye por lo menos una secuencia de ARNsi-mts. En otra forma de realización, el tejido reproductor masculino es una panoja de una planta de maíz. En otra forma de realización, el elemento ARNsi-mts incluye por lo menos una secuencia de ARNsi-mts seleccionada del grupo que consiste en **SEC ID NO: 1-56 y 105-149**. En otra forma de realización, el elemento ARNsi-mts es por lo menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en **SEC ID NO: 57-94 y 96-104**. En otra forma de realización, la expresión de la proteína recombinante en una planta transgénica confiere a la planta por lo menos tolerancia vegetativa a los

herbicidas. En otra forma de realización, la proteína recombinante es una EPSPS tolerante al glifosato.

La invención presenta además un método para inducir la esterilidad masculina en una planta transgénica, que incluye el paso de aplicar herbicida a una planta transgénica que tiene, en su genoma, un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia codificadora de proteína operativamente ligada a una secuencia de ADN que incluye un elemento ARNsi-
mts que confiere a la planta transgénica por lo menos tolerancia vegetativa a los herbicidas, donde el herbicida es aplicado durante el desarrollo del tejido reproductor masculino de la planta transgénica, para inducir así la macho esterilidad en la planta transgénica. En una forma de realización, la planta transgénica es una planta de maíz. En otra forma de realización, la aplicación de herbicida previene por lo menos la diseminación del polen o la extrusión de las anteras en la planta transgénica tratada. En otra forma de realización, la etapa de desarrollo del tejido reproductor masculino durante la cual se aplica el herbicida es una etapa seleccionada del grupo que consiste en las etapas V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 y V14 del desarrollo de la planta de maíz. En otra forma de realización, el herbicida es seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de la acetil coenzima A carboxilasa (ACCase), inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS), inhibidores del fotosistema II (PSII), inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO), inhibidores de la 4-hidroxifenil dioxigenasa (HPPD), inhibidores de la 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS), inhibidores de la glutamina sintetasa (GS) y auxinas sintéticas. En otra forma de realización, el herbicida es glifosato y la proteína recombinante es una EPSPS tolerante al glifosato.

La invención presenta asimismo un método para producir semillas híbridas que incluye aplicar una cantidad efectiva de un herbicida a una planta transgénica que incluye en su genoma un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia codificadora de proteína operativamente ligada a una secuencia de ADN que incluye un elemento ARNsi-mts, donde el herbicida es aplicado durante el desarrollo del tejido reproductor masculino de la planta transgénica, para inducir así la macho esterilidad en la planta transgénica; fertilizar la planta transgénica

con polen de una segunda planta; y cosechar semillas híbridas de la planta transgénica. En una forma de realización, la planta transgénica es de maíz. Una cantidad efectiva de herbicida es una dosis de herbicida suficiente para transformar en macho estéril una planta transgénica que comprende un constructo de ADN recombinante de la invención (una dosis efectiva). En otra forma de realización, el herbicida es glifosato y la proteína recombinante es una EPSPS tolerante al glifosato. En otra forma de realización, el glifosato es aplicado durante el desarrollo en una dosis efectiva de aproximadamente 0,125 libras de equivalente ácido por acre (0,14 kg/ha) a aproximadamente 8 libras de equivalente ácido por acre (8,96 kg/ha). En la siguiente descripción detallada se explican otras realizaciones específicas de la invención. En toda esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que el contexto demande lo contrario, se ha de entender que el término “comprender” y sus variaciones, como por ejemplo “comprende” y “que comprende” implica la inclusión de un número entero, elemento o paso o grupo de números enteros, elementos o pasos, aunque no excluye a ningún otro número entero, elemento o paso o grupo de números enteros, elementos o pasos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra el mapeo de secuencias de ARNsi-mts sobre un elemento ARNsi-mts (**SEC ID NO: 85**), descrito en el **Ejemplo 1**. El eje X de izquierda a derecha representa la orientación del elemento ARNsi-mts donde la hebra superior está representada en la mitad superior del gráfico y la hebra inferior está representada en la mitad inferior del gráfico; la posición de los nucleótidos en la orientación de 5' a 3' está expuesta de izquierda a derecha en la parte superior y de derecha a izquierda en la inferior. Las secuencias de ARNsi-mts están expuestas en sus posiciones de alineamiento relativo. El eje Y representa la abundancia relativa del ARNsi-mts expresado en el tejido de las panojas en términos de transcritos por cuarto de millón de secuencias (tpq). Los ARNsi-mts con gran representación en la genoteca están rodeados por círculos.

La Figura 2 ilustra análisis de Northern blot para medir la expresión de ARNs específica de la panojas, como se describe en el **Ejemplo 2**.

La **Figura 3** ilustra el mapeo de las secuencias de ARNsi–mts sobre un elemento ARNsi–mts (**SEC ID NO: 87**), de acuerdo con lo descrito en los **Ejemplos 2 y 8**. El eje X de izquierda a derecha representa la orientación del elemento ARNsi–mts donde la hebra superior está representada en la mitad superior del gráfico y la hebra inferior está representada en la mitad inferior del gráfico; la posición de los nucleótidos en la orientación de 5' a 3' está expuesta de izquierda a derecha en la parte superior y de derecha a izquierda en la inferior. Las secuencias de ARNsi–mts están expuestas en sus posiciones de alineamiento relativo. Las tres secuencias de ARNsi–mts utilizadas para diseñar tres sondas específicas (sR648011 (**SEC ID NO: 8**), sR1372590 (**SEC ID NO: 26**) y sR410590 (**SEC ID NO: 33**)) están indicadas.

La **Figura 4** ilustra análisis de Northern blot de la expresión temporal en la madurez de las panojas de un elemento ARNsi–mts (**SEC ID NO: 87**) usando ARN de un germoplasma endogámico diferente, de acuerdo con lo descrito en el **Ejemplo 2**.

La **Figura 5** ilustra la localización *in situ* de la expresión de ARNsi en las anteras maduras empleando sondas antisentido (panel izquierda) o codificantes (panel derecho) para una secuencia de ARNsi–mts (sR648011, **SEC ID NO: 8**), de acuerdo con lo descrito en el **Ejemplo 2**

La **Figura 6** ilustra la localización de la proteína CP4–EPSPS en las anteras de plantas no rociadas correspondiente al constructo 3 (**Figura 6A**) o al constructo 4 (**Figura 6B**), según lo descrito en el **Ejemplo 4**. Las plantas transgénicas de maíz del constructo 3 contienen un cassette de expresión del elemento CP4–EPSPS/ ARNsi–mts. Las plantas con el constructo 4 son un control.

La **Figura 7** ilustra plantas transgénicas de maíz generadas a partir de constructos que contienen un cassette de expresión del elemento CP4–EPSPS/ ARNsi–mts, que resultaron vegetativamente tolerantes al glifosato y tenían macho esterilidad inducida con la aplicación tardía de glifosato, de acuerdo con lo descrito en el **Ejemplo 7**. La **Figura 7A** ilustra plantas transgénicas de maíz rociadas con glifosato y no rociadas. La **Figura 7B** muestra las panojas de plantas transgénicas sin rociar y la **Figura 7C** ilustra granos de polen de plantas

transgénicas sin rociar. La **Figura 7D** ilustra panojas de plantas transgénicas rociadas y la **Figura 7E** ilustra granos de polen de plantas transgénicas rociadas.

La **Figura 8** ilustra datos correspondientes a un año de ensayos de campo que medían la Tasa de Fertilidad Masculina (MFR) después del rocío tardío con glifosato. La **Figura 8A** ilustra la MFR promedio producida por tres regímenes diferentes de tratamiento con rocío de glifosato (Trt 1, Trt 2 y Trt 3) correspondientes a NK603 (maíz transgénico con CP4–EPSPS), MON 87427 (maíz transgénico con CP4–EPSPS esterilidad masculina inducida por glifosato) y dos eventos del constructo 3, de acuerdo con lo descrito en el **Ejemplo 5**; la línea de guiones indica el standard de la industria para la macho esterilidad, MFR 2. La **Figura 8B** ilustra una panoja de una planta tratada con un tratamiento de rocío únicamente de las malezas. La **Figura 8C** ilustra una panoja de una planta tratada con un tratamiento de rocío tardío de glifosato para inducir la macho esterilidad.

La **Figura 9** ilustra los resultados de ensayos de campo que medían el número de plantas por lote con macho esterilidad, medida por la extrusión de las anteras por medio de S90, a S90+3 y a S90+6 en dos regímenes diferentes de tratamiento con glifosato (Trt 2 y Trt 3) correspondientes a NK603 (CP4–EPSPS), MON 87427 (maíz transgénico CP4–EPSPS con macho esterilidad inducible por glifosato) y cuatro eventos del constructo 3, según lo descrito en el **Ejemplo 5**.

La **Figura 10** ilustra los resultados de estudios de viabilidad del polen descritos en el **Ejemplo 5**. Las **Figuras 10A** y **10B** ilustran un ejemplo de extrusión de las anteras de rotura tardía en las panojas de un evento del constructo 3 rociado para la esterilidad. La caja de la **Figura 10A** es la porción ampliada de la **Figura 10B**. Un ejemplo de extrusión de las anteras de rotura tardía está rodeado por un círculo en la **Figura 10B**. La tinción de Alexander del polen de las anteras extruidas de rotura tardía, rociadas para inducir esterilidad de los eventos del constructo 3 rociados demuestra sólo polen no viable (granos de polen de color azul claro traslúcido, de forma irregular) (**Figura 10C**). El polen de las anteras no rociadas con el constructo 3 era totalmente viable y aparece opaco, de color violeta oscuro y esférico con la tinción de Alexander (**Figura 10D**).

La Figura 11 ilustra los resultados de las pruebas de ensayos de campo de plantas NK603 y eventos del constructo 3 correspondientes al rendimiento de grano endogámico y fertilidad masculina, según lo descrito en el **Ejemplo 6**. Se midió el rendimiento endogámico en términos de bushels/acre (Bu/acre) y la macho esterilidad fue medida en términos de Tasa de Fertilidad Masculina (MFR). La barra horizontal indica el standard de la industria correspondiente a la macho esterilidad, MFR 2. Trt 1, Trt 2 y Trt 3 se refieren a los regímenes de tratamiento 1, 2 y 3.

La Figura 12 ilustra los resultados de las pruebas de ensayos de campo de una línea endogámica femenina no transgénica, la línea MON87427 y tres eventos del constructo 3, todas con el mismo antecedente genético, que fueron sometidas a polinización cruzada con un standard masculino de análisis MON810/MON88017 para generar semillas híbridas F1. Se midió el rendimiento de los granos híbridos en términos de bushels/acre (Bu/acre). Trt 1, Trt 2 y Trt 3 se refieren a los regímenes de tratamiento 1, 2 y 3.

La Figura 13 ilustra el análisis de los granos de polen de plantas híbridas F1, según lo descrito en el **Ejemplo 7**. Los paneles exponen los resultados de la tinción de Alexander del polen de tres cruza híbridas F1 diferentes: hembra no transgénica x macho MON88017; hembra MON87427 x macho MON88017 y hembra del evento del constructo 3 x macho MON88017. Se restableció funcionalmente la fertilidad de las panojas en híbridas F1 producidas por plantas con el evento del constructo 3 usando el polen MON88017.

La Figura 14 ilustra dibujos esquemáticos de realizaciones de los constructos de ADN recombinante (expuestos en la dirección 5' a 3' de izquierda a derecha) que incluyen (parte superior) una secuencia codificadora de proteína (por ej., ADN que codifica una EPSPS resistente al glifosato) operativamente ligada a una secuencia de ADN que comprende un elemento ARNsi-mts (por ej., una o más seleccionada del grupo que consiste en **SEC ID NO: 57-94 y 96-104**) (parte superior). En una realización específica no restrictiva (parte inferior) el constructo de ADN recombinante incluye un promotor operativamente ligado a, en ese orden, un intrón, un péptido de tránsito, CP4-EPSPS codificada por **SEC ID NO: 95**, un elemento ARNsi-mts (**SEC ID NO: 81**) y una 3'UTR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

CONSTRUCTOS DE ADN RECOMBINANTE

La invención presenta composiciones y métodos para suprimir selectivamente la expresión recombinante en un tejido reproductor masculino de una planta transgénica y los usos de los mismos. En un aspecto, la invención da a conocer un constructo de ADN recombinante que incluye una secuencia codificadora de proteína operativamente ligada a una secuencia de ADN que incluye un elemento ARNsi-mts, es decir, un transgén quimérico que incluye una secuencia codificadora de proteína que codifica la proteína recombinante y por lo menos un elemento ARNsi-mts operativamente ligado a la secuencia codificadora de proteína. En una forma de realización, esas construcciones de ADN recombinantes son útiles para suprimir selectivamente la expresión de una proteína recombinante en un tejido reproductor masculino de una planta transgénica. En un aspecto, la invención presenta una molécula de ADN recombinante que comprende el constructo de ADN recombinante y métodos de uso de los mismos. Las secuencias de ácido nucleico se pueden presentar en forma de ADN o ARN, según se indique; la descripción de una define necesariamente la otra, como es de conocimiento de la persona con capacitación normal en la técnica. Más aun, la descripción de una secuencia dada de ácido nucleico define el complemento exacto de esa secuencia, como es de conocimiento de la persona con capacitación normal en la técnica.

Un “ARNsi específico de los tejidos masculinos” o “ARNsi-mts” es un pequeño ARN (ARNs) de aproximadamente 18 a aproximadamente 26 nucleótidos (por ej., 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 nucleótidos) enriquecido o expresado específicamente en el o los tejidos reproductores masculinos (*por ej.*, inflorescencia masculina) de una planta, es decir, que tiene un patrón de expresión de tejidos específicos. Los ARNsi específicos de los tejidos masculinos son de origen natural en las plantas y se los puede detectar empleando métodos conocidos en la técnica, tales como análisis northern de bajo peso molecular. En la presente se hace referencia a una secuencia de ADN que es complementaria de un ARNsi-mts como “secuencia ARNsi-mts”. Los ejemplos de secuencias de ARNsi-mts correspondientes a ARNsi-mts endógenos de las plantas se presentan

como **SEC ID NO: 1-56 y 105-149**. En una forma de realización, una secuencia de ARNsi-mts es el complemento de ADN exacto (sin errores de apareamiento) de un ARNsi-mts dado. En otras formas de realización, una secuencia de ARNsi-mts varía en malapareamientos de 1-3 nucleótidos en comparación con un ARNsi-mts dado y, de todas maneras, tiene suficiente complementariedad para unirse o hibridarse, por ej., en condiciones fisiológicas típicas, a esos ARNsi-mts. “Complementariedad” se refiere a la capacidad de los nucleótidos de una cadena polinucleotídica con los nucleótidos de otra cadena polinucleotídica de acuerdo con las reglas de complementariedad de Watson-Crick (es decir, pares de guanina con citosina (G:C) y pares de adenina con timina (A:T) o con uracilo (A:U); es posible que se produzca la hibridación intracatenaria entre dos o más regiones de complementariedad de un único polinucleótido. Cuando está incluido en un constructo de ADN recombinante descrito en la presente, un ARNsi-mts tiene capacidad para la supresión o alteración mediada por ARNi de la expresión de un gen y/o una proteína.

Por lo menos una, por lo menos dos, por lo menos tres o más de tres secuencias de ARNsi-mts pueden estar agrupadas o incluso superpuestas dentro de una única molécula de ADN. En la presente se hace referencia a ese tipo de molécula de ADN como “elemento ARNsi específico de los tejidos masculinos” o “elemento ARNsi-mts” y se lo define por incluir por lo menos una, por lo menos dos, por lo menos tres o más de tres secuencias de ARNsi-mts dentro de una ventana de secuencia de aproximadamente 500 nucleótidos. Un elemento ARNsi-mts puede tener cualquier longitud, como por ejemplo de aproximadamente 20 nucleótidos (nt), aproximadamente 25 nt, aproximadamente 30 nt, aproximadamente 40 nt, aproximadamente 50 nt, aproximadamente 60 nt, aproximadamente 70 nt, aproximadamente 80 nt, aproximadamente 100 nt, aproximadamente 150 nt, aproximadamente 200 nt, aproximadamente 250 nt, aproximadamente 300 nt, aproximadamente 350 nt, aproximadamente 400 nt, aproximadamente 450 nt, aproximadamente 500 nt, aproximadamente 550 nt o aproximadamente 600 nt.

Un constructo de ADN recombinante de la invención es una molécula de ADN que incluye por lo menos una secuencia codificadora de proteína

operativamente ligada a una secuencia de ADN que incluye un elemento ARNsi-
mts. El término “recombinante” se refiere a una molécula o una célula u
organismo que ha sido creado por el hombre por medio de ingeniería genética y,
por ello, es el producto de la actividad humana y de otro modo no aparecería
5 normalmente en la naturaleza. En el presente contexto, un constructo de ADN
recombinante es una molécula de ADN recombinante que incluye dos o más
secuencias de ADN heterólogas. El término “heteróloga” se refiere a la relación
entre dos o más secuencias de ácido nucleico o proteína que son derivadas de
diferentes fuentes (por ej., de diferentes ubicaciones en un genoma o de diferentes
10 especies). En un ejemplo, un promotor y una secuencia de ADN codificadora de
proteína son heterólogos entre sí si el promotor no es el promotor nativo de la
secuencia de ADN que codifica la proteína. En otro ejemplo, una secuencia
codificadora de proteína es heteróloga con respecto a un elemento ARNsi-mts si
esa combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza, como por
15 ejemplo un elemento ARNsi-mts vegetal operativamente ligado a un gen para
tolerancia a los herbicidas, como ser CP4-EPSPS. Además, una secuencia
específica puede ser “heteróloga” con respecto a una célula u organismo en el
cual se la introduce (es decir, una secuencia que no aparece naturalmente en esa
célula u organismo específico).

20 El término “operativamente ligado” se refiere a dos moléculas
polinucleotídicas ligadas de manera tal que una pueda afectar la expresión de la
otra. Por ejemplo, una primera molécula polinucleotídica está operativamente
ligada a una segunda molécula polinucleotídica cuando las moléculas
polinucleotídicas están dispuestas de tal manera que la primera molécula
25 polinucleotídica pueda afectar la expresión de la segunda molécula
polinucleotídica. Las dos moléculas polinucleotídicas pueden ser parte de una
única molécula polinucleotídica contigua y pueden estar adyacentes o separadas.
Por ejemplo, un elemento ARNsi-mts está operativamente ligado a una secuencia
codificadora de proteína si, después de la transcripción en la célula del tejido
30 reproductor masculino, la presencia del elemento ARNsi-mts da lugar a la
supresión de la expresión de proteínas recombinantes en la célula. El ligamiento
operativo de la secuencia codificadora de proteína y el elemento ARNsi-mts se

puede lograr, por ejemplo, por medio de la incorporación de un elemento ARNsi-
mts adyacente a la secuencia codificadora de proteína (como por ejemplo situado
5' o 3' con respecto a la secuencia codificadora de proteína, aunque no
necesariamente en un enlace contiguo) en o adyacente a una región sin traducir
5 (UTR) del constructo de ADN recombinante (por ejemplo situado en o junto a la 5'
UTR o la 3' UTR), y/o después de la secuencia codificadora de proteína y antes de
la señal de poliadenilación. En una forma de realización, hay uno o más
elementos ARNsi-mts situados entre la secuencia codificadora de proteína y la
secuencia de poliadenilación, es decir, 3' con respecto a la secuencia codificadora
10 de proteína y adyacente a la misma. En otra forma de realización, uno o más
elementos ARNsi-mts están situados entre el codón de terminación de la
secuencia codificadora de proteína y la secuencia de poliadenilación. En otra
forma de realización, uno o más elementos ARNsi-mts están situados dentro de la
secuencia 3' UTR adyacente a la secuencia codificadora de proteína.

15 La secuencia de ADN del elemento ARNsi-mts se puede variar utilizando
diferentes combinaciones y ubicaciones de las secuencias individuales de ARNsi-
mts y/o incorporando 1-3 apareamientos erróneos de nucleótidos en un elemento
ARNsi-mts (con respecto a una secuencia dada de ARNsi-mts). Se presentan
aquí ejemplos de elementos ARNsi-mts con los títulos **SEC ID NO: 57-94 y 96-**
20 **104** y en los Ejemplos de trabajo. Un elemento ARNsi-mts puede funcionar en
cualquier dirección, es decir que es no direccional y, por tal motivo, se lo puede
utilizar en la orientación 5' a 3' o en la orientación 3' a 5' en un constructo de ADN
recombinante.

Los elementos ARNsi-mts, secuencias de ARNsi-mts y los ARNsi-mts
25 pueden ser identificados por métodos conocidos por las personas con
capacitación en la técnica, como por ejemplo por medio de análisis bioinformático
del ARNs de la planta y genotecas de ADNc. En los Ejemplos expuestos más
adelante se presenta un ejemplo de ese método de identificación. En particular, el
ARNsi-mts y las secuencias de ARNsi-mts pueden ser identificados de genotecas
30 de ARNs. Las secuencias identificadas de ARNsi-mts se pueden comparar con el
ADNc y/o colecciones de secuencias genómicas para identificar los elementos
ARNsi-mts (es decir, las regiones de ADN que incluyen por lo menos una, por lo

menos dos, por lo menos tres o más de tres secuencias de ARNsi-mts dentro de una ventana de secuencia de 500 nucleótidos), que sirven para desarrollar constructos de ADN recombinante de acuerdo con lo descrito en la presente.

En algunas formas de realización, estos elementos ARNsi-mts son sintetizados o modificados *in vitro* para que contengan más, menos o diferentes secuencias de ARNsi-mts y/o para reubicar la posición relativa de una o más secuencias de ARNsi-mts, donde dicha modificación es ventajosa para aumentar o reducir el efecto del elemento ARNsi-mts. Los métodos para sintetizar o para la modificación *in vitro* de un elemento ARNsi-mts y para determinar la variación óptima para el nivel de supresión deseado son conocidos por las personas con capacitación en la técnica. También se pueden diseñar elementos ARNsi-mts quiméricos utilizando métodos conocidos por las personas con capacitación en la técnica, como por ejemplo insertando secuencias de ARNsi-mts adicionales ventajosas internamente en un elemento ARNsi-mts o ligando secuencias de ARNsi-mts adicionales 5' o 3' con respecto a un elemento ARNsi-mts. Entre las realizaciones no excluyentes de un elemento ARNsi-mts quimérico se cuentan elementos ARNsi-mts que tienen aproximadamente 80 nt, aproximadamente 100 nt, aproximadamente 150 nt, aproximadamente 200 nt, aproximadamente 250 nt o aproximadamente 300 nt de **SEC ID NO: 86**; aproximadamente 80 nt, aproximadamente 100 nt, aproximadamente 150 nt, aproximadamente 200 nt, aproximadamente 250 nt o aproximadamente 300 nt de **SEC ID NO: 87**; y/o aproximadamente 80 nt, aproximadamente 100 nt, aproximadamente 150 nt, aproximadamente 200 nt, aproximadamente 250 nt, aproximadamente 300 nt, aproximadamente 350 nt, aproximadamente 400 nt, aproximadamente 450 nt, aproximadamente 500 nt o aproximadamente 550 nt de **SEC ID NO: 85**. En los Ejemplos de trabajo se presentan otras formas de realización.

El constructo de ADN recombinante se puede utilizar para suprimir en forma selectiva la expresión de la proteína recombinante en los tejidos reproductores masculinos de una planta transgénica que expresan el constructo, es decir, que dan lugar a la expresión en por lo menos los tejidos vegetativos, aunque no en los tejidos reproductores masculinos. En el presente contexto, "expresión de una proteína recombinante" se refiere a la producción de una proteína recombinante a

partir de una secuencia codificadora de proteína el transcripto así obtenido (ARNm) en una célula. En el presente contexto el término “suprimir” se refiere a reducir; por ejemplo, suprimir la expresión de una proteína recombinante significa reducir el nivel de proteína recombinante producido en una célula, por ej., por medio de la supresión post–transcripción de genes mediada por ARNi.

La supresión selectiva de proteína recombinante se refiere, en el presente contexto, a una reducción de la producción de proteínas recombinantes en una célula o tejido en comparación con una célula o tejido de referencia de por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos aproximadamente 99%. Una célula o tejido de referencia puede ser, *por ej.*, una célula o tejido vegetativo de la misma o planta transgénica o de otra similar que expresa la proteína recombinante o, por ejemplo, una célula o tejido vegetativo de una planta transgénica que tiene un transgén similar o que expresa la proteína recombinante pero carece del elemento ARNsi–mts. La supresión de la expresión de proteínas se puede determinar empleando cualquier método conocido por las personas con capacitación en la técnica, como por ejemplo midiendo directamente la acumulación de la proteína en una muestra de células tejidos utilizando una técnica tal como ELISA o análisis de western blot, midiendo la actividad enzimática de la proteína o determinando por fenotipos la expresión de la proteína. En una forma de realización, la supresión selectiva de proteínas recombinantes se refiere a una reducción suficiente de la expresión de una proteína recombinante con capacidad para conferir tolerancia a los herbicidas en e tejido masculino de una planta transgénica, que da lugar a un fenotipo detectable de fertilidad masculina alterada en una planta transgénica a la cual se aplicara el herbicida en forma de rocío esterilizador. La detección de la fertilidad masculina alterada en esa planta transgénica indicaría, por lo tanto, la supresión selectiva de la proteína recombinante.

En el presente contexto, el término “secuencia codificadora de proteína” se refiere a una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de polipéptido o proteína, es decir, una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína recombinante. Dependiendo de las

condiciones, la secuencia de nucleótidos puede o no traducirse en realidad en una molécula polipeptídica en una célula. Los límites de una secuencia codificadora de proteína están delineados por lo general por un codón de iniciación de la traducción en el término 5' y un codón de terminación de la traducción en el término 3'. Una secuencia codificadora de proteína de la invención incluye, aunque no a modo de limitación, una secuencia codificadora de proteína que otorga una característica conveniente asociada a la morfología, fisiología, crecimiento y desarrollo, rendimiento, mejora nutricional, resistencia a las enfermedades o plagas, tolerancia a los herbicidas o tolerancia ambiental o química. En una forma de realización, una secuencia codificadora de proteína de la invención codifica una proteína recombinante que, al expresarse en una planta transgénica, confiere tolerancia a los herbicidas por lo menos en una célula y/o tejido en que aparece la proteína expresada; la supresión selectiva de la proteína de tolerancia a los herbicidas en el tejido reproductor masculino de la planta transgénica junto con la aplicación oportuna del herbicida da lugar a por lo menos macho fertilidad reducida o a la macho esterilidad. Dicha macho esterilidad, combinada con la tolerancia vegetativa a los herbicidas puede ser aprovechada para aumentar la eficiencia con la cual se producen semillas híbridas, por ejemplo eliminando o reduciendo la necesidad de emascular físicamente la planta de maíz utilizada como hembra en una cruce determinada durante la producción de semillas híbridas. Los sistemas de herbicida-macho-esterilidad inducible han sido descritos, por ejemplo, en la Pat. de EE.UU. No.6.762.344 y en la Sol. de Pat. de EE. UU 2011/0126310. Entre los ejemplos de herbicidas útiles para poner en práctica la invención se incluyen, aunque no a modo de limitación, los inhibidores de la acetil coenzima A carboxilasa (ACCase) (*por ej.*, fops y dims), inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) (*por ej.*, sulfonilureas (SUs) e imidazolinonas (IMIs)), inhibidores del fotosistema II (PSII) (*por ej.*, triazinas y éteres fenílicos), inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO) (*por ej.*, flumioxazina y fomesafeno), inhibidores de la 4-hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD) (*por ej.*, isoxaflutol y tricetonas tales como mesotriona), inhibidores de la 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) (*por ej.*, glifosato), inhibidores de la glutamina sintetasa (GS) (*por ej.*, glufosinato y fosfinotricina), auxinas sintéticas (*por ej.*, 2,4-D y

dicamba). Los ejemplos de secuencia codificadora de proteínas y/o proteínas recombinantes para usar en la práctica de la invención incluyen, aunque no a modo de limitación, genes que codifican proteínas recombinantes que confieren tolerancia a los inhibidores de la HPPD (como por ejemplo HPPD insensible a los herbicidas), genes que codifican proteínas recombinantes que confieren tolerancia al glufosinato (tal como pat y bar), genes que codifican proteínas recombinantes que confieren tolerancia al glifosato (como por ejemplo la EPSPS tolerante al glifosato conocida como CP4-EPSPS, que se presenta aquí como **SEC ID NO: 95**) y genes que codifican proteínas recombinantes que confieren tolerancia al dicamba (tal como la dicamba monooxigenasa (DMO)).

Los constructos de ADN recombinante de la invención se preparan por métodos conocidos en la técnica y en diversas realizaciones se los incluye en vectores de transformación de plantas, plásmidos y ADN plastidial. Dichos constructos de ADN recombinante son útiles para producir plantas y/o células transgénicas y, por ello, también pueden estar contenidos en el ADN genómico de una planta, semilla, célula o parte de planta transgénica. Por lo tanto, la presente invención incluye realizaciones en las cuales el constructo de ADN recombinante está situado dentro de un vector de transformación o en una partícula biolística para la transformación de una célula vegetal o dentro de un cromosoma o plastidio de una célula vegetal transgénica o dentro de una célula transgénica, tejido vegetal transgénico, semilla de planta transgénica, grano de polen transgénico o una planta transgénica o parcialmente transgénica (por ej., injertada). Un vector es cualquier molécula de ADN que se pueda utilizar con el propósito de transformación de plantas, es decir, para la introducción de ADN en una célula.

Los constructos de ADN recombinante de la invención se pueden insertar, por ejemplo, en un vector de transformación de plantas y utilizar para producir plantas, semillas y células transgénicas. Los métodos para construir vectores de transformación de plantas son conocidos en la técnica. Los vectores de transformación de plantas de la invención incluyen en general, aunque no a modo de limitación, un promotor adecuado para la expresión de un ADN operativamente ligado, un constructo de ADN recombinante operativamente ligado y una señal de poliadenilación (que puede estar incluida en una secuencia de 3'UTR). Los

promotores útiles para poner en práctica la invención incluyen los que funcionan en una planta para la expresión de un polinucleótido operativamente ligado. Dichos promotores son variados y muy conocidos en la técnica e incluyen los que son inducibles, virales, sintéticos, constitutivos, temporalmente regulados, espacialmente regulados y/o espacio-temporalmente regulados. Otros componentes opcionales incluyen, aunque no a modo de limitación, uno o más de los siguientes elementos: 5' UTR, potenciador, elemento de acción en cis, intrón, secuencia señal, secuencia de péptido de tránsito y uno o más genes marcadores seleccionables. En una forma de realización, un vector de transformación de plantas comprende un constructo de ADN recombinante.

Los constructos de ADN recombinante y los vectores de transformación de plantas de la presente invención se preparan por cualquier método adecuado para la aplicación a que están destinados, tomando en cuenta, por ejemplo, el tipo de expresión pretendida, la secuencia codificadora de proteína (y por consiguiente tolerancia a los herbicidas) pretendida y la conveniencia para utilizarlos en la planta en la cual se ha de expresar el constructo de ADN recombinante. Los métodos generales útiles para manipular moléculas de ADN para la preparación y uso de constructos de ADN recombinante y vectores de transformación de plantas son muy conocidos en la técnica y han sido descritos en detalle, por ejemplo, en textos y manuales de laboratorio incluyendo el de Sambrook y Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001. Los constructos de ADN recombinante de la invención pueden ser modificados por métodos conocidos en la técnica, ya sea completamente o en parte, por ejemplo, para mayor conveniencia de la manipulación de ADN (tales como sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o sitios de clonación basada en la recombinación) o para incluir secuencias preferidas para plantas (tales como el uso de codones de plantas o secuencias consensuales de Kozak) o para incluir secuencias útiles para el diseño de constructos de ADN recombinante (tales como secuencias espaciadoras o ligantes). En ciertas formas de realización, la secuencia de ADN del constructo de ADN recombinante incluye una secuencia de ADN cuyos codones se han optimizado para la planta en la cual se ha de expresar el constructo de ADN recombinante. Por ejemplo, se pueden

optimizar los codones de la totalidad o parte de la secuencia de una planta para la expresión en una planta por métodos conocidos en la técnica. Los constructos de ADN recombinante de la invención pueden ser apilados con otro ADN recombinante para impartir rasgos adicionales (por ej., en el caso de las plantas transformadas, rasgos que incluyen resistencia a los herbicidas, resistencia a las plagas, tolerancia a la germinación en frío, tolerancia al déficit de agua) por ejemplo, mediante la expresión o supresión de otros genes.

CÉLULAS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS Y PLANTAS TRANSGÉNICAS

Un aspecto de la invención incluye células de plantas transgénicas, tejido vegetal transgénico y plantas o semillas transgénicas que incluyen un constructo de ADN recombinante de la invención. Un aspecto adicional de la invención incluye cromosomas vegetales artificiales o recombinantes que incluyen un constructo de ADN recombinante de la invención. Los métodos adecuados para la transformación de células vegetales huéspedes para usar con la presente invención incluyen virtualmente cualquier método por el cual se pueda introducir ADN en una célula (por ej., donde un constructo de ADN recombinante está integrado de manera estable en un cromosoma vegetal) y son muy conocidos en la técnica. Un método ilustrativo y de uso generalizado para introducir un constructo de ADN recombinante en plantas es el sistema de transformación de *Agrobacterium*, que es muy conocido por las personas con capacitación en la técnica. Las plantas transgénicas se pueden regenerar a partir de una célula vegetal transformada por los métodos de cultivo de células vegetales. Se puede obtener una planta transgénica homocigota con respecto a un transgén mediante su apareamiento sexual (autofecundación) de una planta transgénica segregante independiente que contiene una única secuencia de gen exógeno consigo misma, por ejemplo una planta F0, para producir semillas F1. Un cuarto de la semilla F1 producida es homocigota con respecto al transgén. Las plantas cultivadas de semillas F1 en germinación pueden ser analizadas para determinar su heterocigosidad, por lo general utilizando un ensayo SNP o un ensayo de amplificación térmica que da lugar a la distinción entre heterocigotas y homocigotas (es decir, un ensayo de cigosidad).

La invención presenta una planta transgénica que tiene, en su genoma, un constructo de ADN recombinante de la invención, incluyendo, aunque no a modo de limitación, alfalfa, algodón, maíz, canola, arroz, soja y trigo, entre otras. La invención presenta además, células de planta transgénica, partes de planta y la progenie de dicha planta transgénica. En el presente contexto, la “progenie” incluye cualquier planta, semilla, célula vegetal y/o parte de una planta producida o regenerada a partir de una planta, semilla, célula vegetal y/o parte de una planta que incluía un constructo de ADN recombinante de la invención. Las plantas transgénicas, células, partes y semillas producidas de dichas plantas pueden ser homocigotas o heterocigotas para el constructo de ADN recombinante de la invención.

También se incluye en la presente invención realizaciones en las cuales el constructo de ADN recombinante se encuentra en un producto de consumo producido a partir de una planta, semilla o parte de planta transgénica de la presente invención; dichos productos de consumo incluyen, aunque no a modo de limitación, partes de una planta, granos o semillas triturados o enteros de una planta o cualquier producto alimenticio o no alimenticio que comprenda el constructo de ADN recombinante de la presente invención.

20 MÉTODOS PARA INDUCIR LA MACHO-ESTERILIDAD EN PLANTAS TRANSGÉNICAS Y PARA PRODUCIR SEMILLAS HÍBRIDAS

Otro aspecto de la invención incluye un método para inducir macho esterilidad en una planta transgénica que incluye aplicar una cantidad efectiva de un herbicida a una planta transgénica que incluye un constructo de ADN recombinante que incluye una secuencia codificadora de proteína que codifica una proteína recombinante que confiere a la planta transgénica tolerancia a los herbicidas operativamente ligada a una secuencia de ADN que incluye un elemento ARNsi-mts que confiere a la planta transgénica por lo menos tolerancia vegetativa a los herbicidas, donde la aplicación del herbicida se lleva a cabo durante el desarrollo del tejido reproductor masculino de la planta transgénica, para inducir así macho esterilidad en la planta transgénica.

En una forma de realización, la planta transgénica es una planta de maíz. En una forma de realización, la aplicación del herbicida previene por lo menos la diseminación del polen o la extrusión de las anteras. En una forma de realización, el desarrollo del tejido reproductor masculino es una etapa seleccionada del grupo
5 que consiste en la etapa V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 y V14 del desarrollo de la planta de maíz.

En una forma de realización, el herbicida es seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de la acetil coenzima A carboxilasa (ACCase), inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS), inhibidores del fotosistema II (PSII), inhibidores
10 de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO), inhibidores de la 4-hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD), inhibidores de la 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS), inhibidores de la glutamina sintetasa (GS) y auxinas sintéticas. En una forma de realización, el herbicida es glifosato y la proteína recombinante es una EPSPS tolerante al glifosato.

15 Un aspecto adicional de la invención incluye un método para producir semillas híbridas que incluye: (a) aplicación de herbicida a una planta transgénica que incluye un constructo de ADN recombinante que contiene una secuencia codificadora de proteína que codifica una proteína recombinante que confiere a la planta transgénica tolerancia a los herbicidas operativamente ligada a una
20 secuencia de ADN que incluye un elemento ARNsi-mts, donde la aplicación del herbicida se lleva a cabo durante el desarrollo del tejido reproductor masculino de la planta transgénica, para inducir así macho esterilidad en la planta transgénica; (b) la fertilización de la planta transgénica con el polen de una segunda planta y (c) la cosecha de la semilla híbrida de la planta transgénica. En una forma de
25 realización, la planta transgénica es de maíz. En una forma de realización, el herbicida es glifosato y la proteína recombinante es una EPSPS tolerante al glifosato. En una forma de realización, el glifosato es aplicado durante el desarrollo en una dosis efectiva de aproximadamente 0,125 libras de equivalente ácido por acre (0,14 kg/ha) a aproximadamente 8 libras de equivalente ácido por
30 acre (8,97 kg/ha).

Otro de los aspectos de la invención incluye semilla híbrida cosechada de una planta transgénica macho-estéril que ha sido fertilizada con el polen de una

segunda planta, donde la planta transgénica macho–estéril incluye un constructo de ADN recombinante que incluye una secuencia codificadora de proteína que codifica una proteína recombinante que confiere a la planta transgénica tolerancia a los herbicidas, operativamente ligada a una secuencia de ADN que incluye un elemento ARNsi–mts y donde se ha inducido la macho–esterilidad en la planta transgénica mediante la aplicación de una cantidad efectiva de herbicida durante el desarrollo del tejido reproductor masculino de la planta transgénica. En una forma de realización, la semilla híbrida es semilla híbrida de maíz transgénico. En una forma de realización, el herbicida es glifosato y la proteína recombinante es una EPSPS tolerante al glifosato. En una forma de realización, el glifosato es aplicado durante el desarrollo en una dosis efectiva de aproximadamente 0,125 libras de equivalente ácido por acre (0,14 kg/ha) a aproximadamente 8 libras de equivalente ácido por acre (8,97 kg/ha). En una forma de realización, la aplicación del herbicida previene por lo menos la diseminación del polen o la extrusión de las anteras. En una forma de realización, el desarrollo del tejido reproductor masculino es una etapa seleccionada del grupo que consiste en la etapa V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 y V14 del desarrollo de la planta de maíz.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la identificación de los elementos ARNsi–mts y los elementos ARNsi–mts. El análisis bioinformático de los datos de secuenciación de múltiples bibliotecas de pequeño ARN de maíz identificó un grupo de pequeños ARN (ARNs) que estaban enriquecidos o específicamente expresados en la panoja de maíz. La abundancia relativa de estos ARNsi–mts en las panojas de maíz oscilaba entre aproximadamente 50 y 631 transcritos por cuarto de millón de secuencias, que es la abundancia normalizada. Estos ARNs se identifican como ARNsi debido a su longitud (18–26 nucleótidos) y su probable origen de un precursor de ARNs. Debido a su patrón de expresión, se hace referencia a los ARNsi específicos de tejidos masculinos como “ARNsi–mts”. En el presente contexto, un “patrón de expresión” es cualquier patrón de expresión diferencial de ADN, ARN o proteína. Por ejemplo, un patrón de expresión específico de las panojas se refiere a una expresión específica o enriquecida de ADN, ARN o

proteína en un tejido y/o célula de la panoja. Los ejemplos de la correspondiente secuencia de ADN de los ARNsi-mts, a las que en la presente se hace referencia como “secuencias de ARNsi-mts”, llevan el título **SEC ID NO: 1–56 y 105–149**.

A continuación se compararon estas secuencias de ARNsi-mts con
5 colecciones de secuencias de ADNc. Una comparación de secuencias del ARNsi-
mts contra una colección de unigén de maíz (secuencias compiladas de ADNc)
utilizando BLAST arrojó el sorprendente resultado de que un gran número de
ARNsi-mts estaba acumulado e incluso superpuesto, dentro de una región del
ADN encontrada en varias secuencias estrechamente relacionadas, aunque
10 distintas, de ADNc. Todo el grupo de secuencias de ADNc contenía esa región, si
bien la secuencia de AND de la región variaba debido a las diferentes
combinaciones y ubicaciones de las secuencias individuales de ARNsi-mts y/o 1–
3 apareamientos erróneos de nucleótidos con las secuencias individuales de
ARNsi-mts. Esa región que se define por tener por lo menos una secuencia de
15 ARNsi-mts dentro de una ventana de secuencia nucleotídica, se denomina en la
presente “elemento ARNsi-mts”. En diversas formas de realización, la ventana de
la secuencia de nucleótidos incluye por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos
contiguos (nt) (*por ej.*, por lo menos 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nt), por lo menos
aproximadamente 25 nt, por lo menos aproximadamente 30 nt, por lo menos
20 aproximadamente 40 nt, por lo menos aproximadamente 50 nt, por lo menos
aproximadamente 100 nt o por lo menos aproximadamente 150 nt. En la presente
se exponen ejemplos de la secuencia de ADN correspondiente a los elementos
ARNsi-mts con el título **SEC ID NO: 57–94 y 96–104**. Un elemento ARNsi-mts
puede tener más de una secuencia de ARNsi-mts, por ejemplo, por lo menos dos,
25 por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco o más de cinco
secuencias de ARNsi-mts dentro de una determinada ventana de la secuencia de
nucleótidos. Dos o más secuencias de ARNsi-mts dentro de un elemento ARNsi-
mts dado se pueden superponer porque por lo menos una porción de sus
secuencias de nucleótidos es idéntica (remitirse a la **Tabla 5** para ver ejemplos de
30 ARNsi-mts con secuencias de nucleótidos superpuestas).

El análisis bioinformático indicó que se podían generar múltiples ARNsi-mts
a partir del mismo transcripto de ARN, por ejemplo un transcripto producido a

partir de una de las secuencias de ADNc descritas anteriormente que incluyen un elemento ARNsi-mts. También se encontraron que todos los ARNsi-mts tenían 1–3 malapareamientos en comparación con los elementos ARNsi-mts de todo el grupo de secuencias de ADNc estrechamente relacionadas. Se cree que esto indica que estos ARNsi-mts se generan a partir de múltiples transcritos estrechamente relacionados que dan lugar a un gran grupo estrechamente relacionados de ARNsi-mts. Por consiguiente, un transcrito de ARN producido a partir de un ADNc que incluye un elemento ARNsi-mts (que contiene múltiples secuencias de ARNsi-mts) sería complementario, y por lo menos capaz de hibridarse a múltiples ARNsi-mtss y/o sus complementos. Por consiguiente, un ARNsi-mts de origen natural tiene una secuencia de ARN que es un complemento perfecto o casi perfecto de una secuencia de ARNsi-mts (*por ej.*, donde el ARNsi-mts tiene una secuencia de ARN que no tiene más de aproximadamente 1–3 malapareamientos con respecto a la secuencia de ARNsi-mts); de ello se sigue que el mismo ARNsi-mts tiene una secuencia de ARN que es un complemento perfecto o casi perfecto de un segmento de un elemento ARNsi-mts.

Una búsqueda de similitud de secuencias de los ARNsi-mts en una base de datos de ADN genómico del maíz utilizando BLAST identificó múltiples loci con similitud significativa con el elemento ARNsi-mts. A continuación se analizaron estos loci para detectar marcos de lectura abiertos (ORFs), aunque no se encontró que los polipéptidos putativos identificados tuvieran homología significativa con ninguna proteína conocida. El análisis bioinformático de las secuencias de ADNc productoras de ARNsi-mts indicó que no había homología de secuencias significativa en el nivel nucleotídico con ningún gen vegetal. Estos datos sugieren que se podrían producir ARNsi-mts de dichos loci mediante el procesamiento del ARNds formado entre transcritos de polaridad opuesta o mediante el procesamiento de ARNds de transcritos aberrantes debido a la actividad de ARN polimerasa dependiente del ARN. También es posible el procesamiento de ARNsi-mts a partir de estructuras secundarias de ARNds que se pueden formar en algunos transcritos productores de ARNsi-mts.

La transcripción inversa de los ARNsi-mts produjo secuencias de ARNsi-mts que fueron mapeadas sobre uno de los elementos ARNsi-mts (**SEC ID NO:**

87). Esto está representado en la **Figura 1** donde el eje X representa la posición de los nucleótidos de la orientación 5' a 3' de izquierda a derecha en la parte superior y de derecha a izquierda en la parte inferior. La abundancia relativa de los ARNsi-mts está dada en términos de transcritos por cuarto de millón de secuencias (tpq) representadas en el eje Y. Como se puede apreciar en la **Figura 1**, algunos ARNsi-mts (rodeados por círculos) están altamente representados en la biblioteca de ARNs específico de las panojas (eje Y). Las secuencias de ARNsi-mts previstas también están distribuidas de manera no uniforme en todos los elementos ARNsi-mts (eje X).

10 Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra el análisis de expresión endógena de las panojas de los ARNsi-mtss. Los patrones de expresión nativa *in planta* de los ARNsi-mts fueron analizados utilizando varios métodos diferentes. Estos análisis confirmaron que los ARNs que se hibridan a elementos ARNsi-mts están enriquecidos y/o se expresan específicamente en las panojas de todos los germoplasmas de maíz (es decir, que los ARNsi-mts están enriquecidos y/o se expresan específicamente en las panojas) y que, en una forma de realización, un ARNsi-mts está enriquecido y/o se expresa específicamente en el grano de polen en la etapa de microesporas uninucleadas del desarrollo del polen.

20 Para demostrar la acumulación *in planta* específica de las panojas del ARNsi-mts, se utilizaron tres secuencias de ARNsi-mts representativas (**SEC ID NO: 26** (1372590), **SEC ID NO: 8** (648011), **SEC ID NO: 33** (410590)) para diseñar sondas para el análisis de northern blot de bajo peso molecular (LMW) de ARNs preparados del maíz o arroz. Para estos experimentos, se extrajo ARN total del tejido vegetal empleando el reactivo TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se desnaturalizó ARN (7,5 µg) de cada muestra a 95°C durante 5 minutos antes de la separación en un gel de PAGE al 17% que contenía urea 7 M en 0,5X buffer TBE (Allen *et al.* (2004) Nature Genetics 36:1282–1290). Después de la electroforesis, se transfirió el gel a una membrana Nytran SuPerCharge® (Whatman–Schleicher & Schuell, Florham Park, NJ) usando una Celda de Transferencia Electroforética Semi-seca Trans-Blot® SD (Bio-Rad, Hercules, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se entrecruzó la transferencia así obtenida a 1200 microjoules/cm²

x 100 en un Stratalinker® 1800 (Stratagene, Cedar Creek, TX). Para preparar las sondas, se generó una plantilla de sondas de ARN por PCR que contenía el promotor T7 en un extremo y una de las pequeñas secuencias de ARN en el extremo opuesto. Las secuencias de ARNs incorporadas a la plantilla de sondas de ARN incluían: [1] Gma-miR159a (número de acceso a miRBase.org MI0001773), que fue utilizada como control para la carga; [2] sR1372590 (**SEC ID NO: 26**); [3] sR648011 (**SEC ID NO: 8**) y [4] sR410590 (**SEC ID NO: 33**). Se transcribieron sondas de ARN utilizando ARN polimerasa T7 y se las marcó con digoxigenina (DIG) utilizando el DIG Northern Starter Kit (Roche, Indianapolis, IN), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se llevó a cabo la hibridación con 100 ng de la sonda marcada con DIG en el buffer de hibridación PerfectHyb™ (Sigma, St. Louis, MO) a 38°C por espacio de 16 h. Se realizó la detección con el DIG Northern Starter Kit de acuerdo con el protocolo del fabricante, antes de la exposición a película Kodak® Biomax™ XAR (Sigma, St. Louis, MO). Las muestras analizadas incluían todas o una subserie de las siguientes: hojas de maíz de plantas cultivadas bajo estrés de nitrógeno, brotes de maíz, raíz o endosperma de plantas cultivadas bajo estrés por frío, hojas y raíces de maíz de plantas cultivadas bajo estrés por sequía, estigmas de maíz, panojas jóvenes de maíz, panojas maduras de maíz, granos de maíz sin polinizar, embriones de maíz – 24 días después de la polinización (DAP); granos de maíz – 22 DAP; granos de maíz maduros; granos (secos maduros –embriones de maíz; endosperma de maíz – seco; granos de arroz y plántulas de arroz. Los resultados obtenidos con el análisis northern LMW utilizando por lo menos tres sondas diferentes de ARNsi-mts (sR1372590, sR648011 y sR410590) exhibieron señal sólo en las bandas correspondientes a las panojas jóvenes y bandas de panojas maduras, confirmando el análisis bioinformático y la conclusión de que la expresión de ARNsi-mts está muy enriquecida en el tejido de la panoja o es específica del mismo.

La especificidad tisular y la acumulación de ARNs que reconocería un elemento ARNsi-mts fue evaluada en todo un amplio espectro de germoplasmas de maíz utilizando el análisis northern LMW. Para este análisis se seleccionó un elemento ARNsi-mts (**SEC ID NO: 87**, que contiene múltiples secuencias de

ARNsi–mts). Este elemento ARNsi–mts incluye las tres secuencias de ARNsi–mts empleadas para diseñar las sondas de ARNsi sR1372590, sR648011 y sR410590, lo que habilita el uso de estas sondas para el análisis northern LMW de las muestras de germoplasma del maíz. Para estos experimentos, se preparó ARN de veinte líneas endogámicas diferentes de maíz con diversos antecedentes genéticos, por ejemplo con una madurez relativa clasificada de 83 a 120 (**Tabla 1**). En el caso de tres de estas líneas endogámicas (91DUA6, 01DKD2 y LH244), se recogió el tejido de panoja joven, panoja vieja, hoja, mazorca y raíz. La **Tabla 1** expone la correspondiente etapa V y el tamaño de las panojas en el momento de la recolección de las panojas jóvenes y las panojas viejas. Se extrajo ARN total utilizando la solución TRIzol®. Se aisló ARN LMW con el kit de aislamiento de ARNmi mirVana™ (No. cat. AM1560, Ambion, Austin, TX). El análisis northern LMW se realizó utilizando un gel de TBE al 15%–urea acrilamida Bio–Rad Criterion™ Precast (No. cat. 345–0092, BioRad, Hercules, CA). Se transfirió el gel a una membrana con carga positiva (No. cat. 11209272, Roche Applied Systems, Mannheim, Alemania). Las sondas fueron marcadas con (1) cebadores 32–P–aleatorios o (2) con DIG ADN utilizando el kit de marcación para PCR de Roche o (3) con la sonda de ARN DIG ante descripta. Todas las sondas empleadas para sondear los northern blots fueron el complemento inverso a la transcripción endógena o la secuencia de ADNc del elemento ARNsi–mts. La presencia de ARNs que se hibridó al elemento transgénico ARNsi–mts fue específica de la panoja; no se detectó señal para la hoja, mazorca o raíz de ninguno de los genotipos de maíz endogámico 91DUA6, 01DKD2 y LH244 (Figura 2).

Para determinar el patrón de expresión temporal durante el desarrollo de las panojas de los ARNs que reconocerían un elemento ARNsi–mts (**SEC ID NO: 87**), se realizó el análisis northern LMW. Se preparó ARN de panojas jóvenes y viejas de diferentes líneas endogámicas de maíz; ver la **Tabla 1**. La preparación del ARN y las técnicas de northern LMW fueron esencialmente las descriptas anteriormente.

Tabla 1: Germoplasma endogámico, clasificación de madurez y etapa de desarrollo de las panojas

		panoja joven		panoja vieja	
Endogámica	Clasificación	Etapas	Tamaño	Etapas	Tamaño

	de madurez		de las panojas (pulgadas) (cm)		de las panojas (pulgadas) (cm)
C3SUD402	108	V9	5 (12,7)	V12	10 (25,40)
HIQA202	113	V9–10	4,5 (11,43)	V13	13 (33,02)
BEBE788	83	V10–11	10 (25,40)	V13	7,5 (19,95)
BIQA207	103	V10	7 (17,78)	V11	9,5 (24,13)
DIDA404	112	V10	2,5 – 3 (6,35–7,62)	V11	9,5 (24,13)
5DA92	107	V10–11	5,7 (14,48)	V12	11 (27,94)
DIDA406	109	V10	6,5 (16,51)	V12	9 (22,86)
80DJD5	114	V10	6,5 (16,51)	V11	10 (25,40)
JEDO115	120	V9	2,5 (6,35)	V11– 12	10 (25,40)
FIDA240	116	V9–10	2,5 (6,35)	V12	11 (27,94)
BIQA347	99	V9–10	3,5 (8,89)	V11– 12	10,5 – 11 (26,67- 27,94)
HOQA203	105	V10–11	5,5 (13,97)	V12– 13	11 (27,94)
91DUA6	90	V10–11	10 (25,49)	V12– 13	10 (25,40)

BIDA345	95	V10	5 (12,70)	V12– 13	10 (25,40)
01DKD2	111	V9–10	5 (12,70)	V13	10,5 – 11 (26,67- 27,94)
DIDA403	108	V10	2,5 – 3 (6,35–7,62)	V12	10,5 – 11 (26,67- 27,94)
64DJD1	105	V9–10	2,5 – 3 (6,35–7,62)	V12	10,5 – 11 (26,67- 27,94)
DIQA423	108	V9–10	3 (7,62)	V12	9,5 (24,13)
BIQA208	102	V10	5,5 (13,97)	V13	9,5 (24,13)

LH244	111	V9-10	1 – 2,5 (2,45 – 6,35)	V13	10 (25,40)
-------	-----	-------	-----------------------------	-----	------------

Como se aprecia en la **Figura 4**, una sonda de ARN marcada con DIG que corresponde al complemento inverso de un elemento ARNsi-mts (**SEC ID NO: 87**) se hibridó al ARNs tanto en la panoja joven como en la vieja, con la excepción de la panoja joven de 2,5 pulgadas a 3 pulgadas(6,35-7,62 cm) de longitud: calles 5 (DIDA404 endogámica), 9 (JEDO115 endogámica), 10 (FIDA240 endogámica), 16 (DIDA403 endogámica), 17 (64DJD1 endogámica), 18 (DIQ423 endogámica) y 20 (LH244 endogámica). Además, este experimento confirmó la falta de detección de ARNs que se hibride al elemento ARNsi-mts de las muestras de hojas (calles 21 y 22) o las mazorcas (calles 23 y 24) de las endogámicas BIQA208 y LH244. En su conjunto, estos datos indican que los ARNs que se hibridan al elemento ARNsi-mts se expresan específicamente en la panoja de cada genotipo endogámico analizado cuando la panoja es de más de aproximadamente 3,5 pulgadas (8,89 cm).

Se realizó el análisis de hibridación *in situ* para investigar la expresión específica de las células de una secuencia de ARNsi-mts (sR648011, **SEC ID NO: 8**). En las anteras de maíz, se producen microesporas por medio de la meiosis y se desarrollan hasta formar polen maduro. La microesporogénesis del maíz se puede dividir, a grandes rasgos, en las siguientes etapas: meiosis de las células esporógenas, liberación de tétradas en forma de microesporas libres, mitosis de as microesporas uninucleadas para producir polen tricelular y granos de polen maduros. Para estos experimentos, se utilizó la panoja del maíz anterior a la antesis, obtenida de plantas de maíz cultivadas en condiciones standard en un invernadero. Se utilizaron sondas de ácido nucleico cerrado (LNA o Locked Nucleic Acid) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) como se indica más adelante, donde la posición de la LNA está indicada por un símbolo '+'. La sonda no codificadora estaba destinada a detectar el ARNsi-mts correspondiente a sR648011 (**SEC ID NO: 8**) (5'-Biotina-CAT+GCA+CTG+GTG+AGT+CAC+TGT-3'), en tanto que la sonda codificadora era el complemento inverso de la sonda no codificadora (5'-Biotina-ACA+GTG+ACT+CAC+CAG+TGC+ATG-3') para usar

como control negativo. Las sondas LNA permiten lavados de alta rigurosidad y, por lo tanto, garantizan la hibridación muy específica (Válóczi *et al.*, 2006; Nuovo *et al.*, 2009). Todas las sondas fueron marcadas con biotina. Se fijaron las muestras de panojas de maíz en paraformaldehído al 4% en 1×PBS a 4°C por espacio de 36 h y luego se las deshidrató a 4°C por medio de una serie graduada de etanol:H₂O. A continuación se colocaron las panojas en EtOH al 75% e Histoclear al 25% (National Diagnostics, Atlanta, GA) durante 1,5 h, EtOH al 50% e Histoclear al 50% por espacio de 1,5 h, EtOH al 25% e Histoclear al 75% durante 1,5 h e Histoclear al 100% durante 3×1,5 h, todo a 25°C. A continuación, se reemplazó gradualmente el Histoclear con paraplast fundido a 50°C y se transfirieron las panojas a moldes y se las almacenó a 4°C antes de seccionarlas. Se seccionaron las panojas embebidas en parafina en un micrótomos a un espesor de 8 µm. Se efectuó una serie de secciones de las mismas anteras y luego se utilizaron secciones adyacentes para sondear con la sonda en el sentido codificador y no codificador, respectivamente. Se llevó a cabo la prehibridación y la hibridación a 42°C y el lavado a 55°C. La detección de las sondas LNA marcadas con biotina reasociadas a los transcritos se realizó con una dilución de 1 a 400 de Fosfatasa Alcalina anti-biotina (AP) y Sustrato Purple AP BM (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Se capturaron imágenes de una cámara en un microscopio Olympus (Center Valley, PA). Se dividieron las secciones de las mismas anteras en dos grupos – uno fue utilizado para la sonda antisentido (Figura 5, panel izquierdo) y el otro para la sonda sentido (Figura 5, panel derecho). La señal de hibridación (violeta oscuro) fue detectada únicamente en las secciones que se hibridaron a la sonda antisentido, pero no en las incubadas con la sonda sentido (Figura 5). La fuerte señal obtenida con la sonda antisentido indica que este ARNsi-mts era abundante (altamente expresado) en el grano de polen en la etapa de microesporas uninucleadas del desarrollo del polen.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra constructos para la transformación de plantas y la producción de plantas transgénicas. Se incorporó un elemento ARNsi-mts en la 3'UTR de un cassette de expresión del transgén y se la utilizó para producir plantas de maíz transgénico para evaluar el efecto del elemento sobre la

expresión del transgén en las plantas transgénicas. Se insertó un elemento ARNsi-mts (**SEC ID NO: 87**) en la 3'UTR de un cassette de expresión del transgén CP4-EPSPS para la transformación del maíz. Este elemento ARNsi-mts fue elegido debido a su abundante contenido de secuencias de ARNsi-mts (Figura 3), incluyendo secuencias correspondientes a tres de las sondas de ARNsi (sR1372590, sR648011 y sR410590) utilizadas para el análisis northern LMW del **Ejemplo 2**. Este elemento ARNsi-mts también permitió evaluar el efecto de los malapareamientos de ARNsi-mts. El elemento ARNsi-mts aquí analizado (**SEC ID NO: 87**) tiene un cambio de ~~u~~T: nucleótido (C AAGCTATIGATTCCCTAAGTGCCA) en comparación con una de las secuencias de ARNsi-mts subyacentes (**SEC ID NO: 33**, utilizadas para diseñar la Sonda sR410590). El elemento ARNsi-mts fue insertado en el cassette del transgén en la orientación de complemento inversa con respecto a su posición en el ADN endógeno, aunque se cree que el elemento funciona de manera similar en ambas orientaciones, puesto que se puede encontrar complementariedad de las secuencias de ARNsi específico de las panojas con cualquiera de las hebras del elemento ARNsi-mts en la panoja del maíz (**Figuras 1 y 3**).

Se construyeron varios cassettes de expresión de CP4-EPSPS/elemento ARNsi-mts (**Tabla 2**) y se los utilizó para transformar plantas de maíz. Se analizaron diferentes combinaciones de elementos de expresión en los cassettes de expresión de CP4-EPSPS/ elemento ARNsi-mts. Los elementos de expresión tales como promotores, guías, intrones, péptidos de tránsito de cloroplastos y 3'UTR's necesarios para la expresión eficiente y estable de un transgén son muy conocidos en la técnica. Los cassettes de expresión de CP4-EPSPS/elemento ARNsi-mts fueron diseñados de manera que incluyeran uno de dos promotores individuales, operativamente ligado a un ADN de una de las dos guías individuales, operativamente ligado a un ADN de uno de los dos intrones; operativamente ligado a una de las dos moléculas de ADN que codifican el mismo péptido de transito de cloroplasto (CTP); operativamente ligado a una molécula de ADN derivada de un gen *aroA* de la cepa de *Agrobacterium* sp. CP4 y que codifica la proteína CP4-EPSPS; operativamente ligado un ADN que codifica un elemento ARNsi-mts; operativamente ligado a una de dos moléculas de ADN 3'UTR. El

constructo 4 contenía el gen CP4–EPSPS de tipo salvaje y todos los demás vectores contenían una versión con codones optimizados de una planta del gen CP4–EPSPS. Los constructos 3, 5 y 6 (**Tabla 2**) fueron diseñados para determinar si un elemento ARNsi–mts incorporado a la 3’–UTR produciría plantas con sensibilidad al glifosato específica de las panojas y tolerancia vegetativa al glifosato. Los constructos 4 y 7 son constructos control, que carecen de un elemento ARNsi–mts.

Tabla 2: Constructos para transformación de plantas

Constructo	Promotor	Guía	Intrón	CTP	Transgén	ARNsi–mts	3’UTR
3	A	A	A	A	CP4	SEC ID NO: 87	A
4	A	A	A	A	CP4	***	A
5	B	B	B	B	CP4	SEC ID NO: 87	A
6	B	B	B	B	CP4	SEC ID NO: 87	B
7	B	B	B	B	CP4	***	A

Se produjeron plantas transgénicas de maíz transformadas con uno de cada uno de los cinco cassettes utilizando métodos muy conocidos en la técnica. En pocas palabras, se transformaron células de maíz mediante transformación mediada por *Agrobacterium* con uno de cada uno de los constructos enumerados en la **Tabla 2** (individualmente) y se las regeneró para obtener plantas intactas de maíz. Se seleccionaron plantas individuales de la población de plantas que exhibían integridad del cassette de expresión del transgén y resistencia al glifosato. Las plantas enraizadas con características fenotípicas normales fueron seleccionadas y transferidas al suelo para su cultivo y posterior evaluación. Las plantas R0 fueron transferidas al suelo para su desarrollo, rociadas con 0,75 libras/acre (0,84 kg/ha) de glifosato en la V3–V4 seguidas por 0,75 libras/acre (0,84 kg/ha) de glifosato en la V7–V9 y luego se las sometió a polinización cruzada con el polen de plantas de maíz no transgénicas del mismo germoplasma (en el caso de los eventos de constructos 3, 5 y 6) o autopolinización (en el caso de eventos de los constructos 4 y 7) para producir semillas R1. Seguidamente las plantas fueron seleccionadas mediante una combinación de técnicas analíticas, incluyendo TaqMan, análisis de PCR y tolerancia vegetativa al rocío de herbicida y

fertilidad masculina reducida (conveniente) después del rocío del herbicida (glifosato).

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra métodos para analizar plantas transgénicas en un invernadero. Las plantas transgénicas transformadas con los cassettes de expresión de CP4–EPSPS/elemento ARNsi–mts fueron analizadas para evaluar la tolerancia vegetativa al glifosato y la macho esterilidad. Se encontró que las plantas transgénicas generadas por los constructos que contenían los cassettes de expresión de CP4–EPSPS/elemento ARNsi–mts tenían tolerancia vegetativa al glifosato e inducían macho esterilidad con la aplicación tardía de glifosato.

Se cultivaron plantas R0 por duplicado en el invernadero y se las dejó sin rociar o se las roció con 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) de glifosato en la etapa V6 (temprana) seguida por 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) de glifosato en la etapa V9 (tardía). (Figura 7 y Tabla 3) Los eventos R0 analizados fueron eventos de múltiples copias. Todas las plantas R0 que quedaron sin rociar tuvieron extrusión normal de las anteras y polen completamente fértil según se determinó por tinción de Alexander. Todas las plantas R0 que fueron rociadas tuvieron tolerancia vegetativa al glifosato. Las plantas R0 producidas por los constructos 4 y 7, que no contenían el elemento ARNsi–mts, no exhibieron sensibilidad de las panojas al glifosato ni macho esterilidad inducida. Las plantas R0 producidas por los constructos 3, 5 y 6, que sí contenían el elemento ARNsi–mts, exhibieron sensibilidad de las panojas al glifosato y macho esterilidad inducida; estas plantas no tuvieron o tuvieron muy escasa extrusión de las anteras y >99% del polen fue no viable, según se determinó por tinción de Alexander.

Tabla 3: Datos de rocío de glifosato

Constructo	Tolerancia Vegetativa al Rocío Temprano de Glifosato	Macho esterilidad Inducida por el Rocío Tardío de Glifosato
3	Sí	Sí
4	Sí	No
5	Sí	Sí
6	Sí	Sí
7	Sí	No

Estas observaciones demostraron que la presencia del elemento ARNsi-
mts en la 3'UTR de un cassette del transgén llevó al silenciamiento del transgén
específico de las panojas. La pérdida específica de las panojas del transcripto de
ARNm producido por el cassette de expresión de CP4-EPSPS/el ARNsi-mts dio
5 origen a panojas que eran sensibles al glifosato, produciendo una planta con
macho esterilidad inducida, en tanto que los demás tejidos de la planta eran
tolerantes al glifosato, produciendo tolerancia vegetativa al glifosato y buena
fertilidad femenina.

A continuación se utilizó la inmunolocalización para medir la proteína CP4-
10 EPSPS en los tejidos de la planta transgénica. Se obtuvieron panojas de plantas
transformadas con el constructo 3 o el constructo 4 u de maíz no transgénico
(LH198). Las plantas fueron cultivadas en un invernadero con 14 horas de luz a
80°F (26,6°C) y 8 horas de oscuridad a 70°F (21,1°C). Se plantó una semilla por
maceta. Las macetas fueron dispuestas al azar en el piso del invernadero. Se
15 regaron las plantas según la necesidad y se las fertilizó con una mezcla 20-20-20
de nitrógeno, potasio y fósforo, respectivamente. Las plantas procedentes del
constructo 3 o el constructo 4 fueron rociadas con glifosato a razón de 0.75
lb./acre (0,84 kg/ha) en la etapa V2 para confirmar la tolerancia vegetativa al
glifosato. Se cosecharon panojas jóvenes en la V10-V11 para obtener tejidos de
20 las anteras en las etapas de células madres de microesporas y microesporas
libres; las panojas maduras fueron cosechadas en la etapa T7, 1-2 días antes de
la diseminación del polen, para obtener tejidos de las anteras con polen
completamente desarrollado. Se extrajeron las anteras de las espiguillas de la
panoja utilizando pinzas de disección y se las fijó inmediatamente en formaldehído
25 al 3,7% en salina con buffer de fosfato (PBS) bajo vacío suave. Después de
lavarlos en PBS, se colocaron los tejidos en medio de incrustación y se los
congeló de inmediato. Se almacenaron los bloques de tejido congelados a -80°C
hasta seccionarlos en el micrótopo a -20°C y colectarlos en los portaobjetos
cargados.

30 Se bloquearon secciones de tejido con agente de bloqueo (suero de cabra
normal al 10%, seroalbúmina bovina al 5%, Triton X-100 al 0,1% en PBS) por
espacio de 2 horas. Se incubaron las secciones con anticuerpo anti-CP4-EPSPS

(1/500 en PBS). Después de lavar las secciones tres veces en PBS, se incubaron las secciones de tejido con el anticuerpo secundario, IgG de cabra anti-ratón con el fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen, Eugene, Oregon). Para incluir un control negativo, se omitió la incubación del anticuerpo CP4-EPSPS. Como control

5 positivo, se utilizó un anticuerpo para la α -tubulina (Sigma, St. Louis, MO), una proteína citoesquelética que se expresa en la mayoría de los tipos de células, en lugar del anticuerpo CP4-EPSPS en secciones separadas. Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios fueron incubados a temperatura ambiente por espacio de 2–4 horas y luego se los volvió a incubar de un día para otro a 4 °C.

10 Después del lavado, se tomaron imágenes de los tejidos con el Microscopio confocal de Barrido Láser Zeiss (LSM) 510 META utilizando un láser de 488 nm para la excitación y 500–550 nm para la serie de filtros de emisión. Se aplicó el mismo parámetro de captación de imágenes a todas las muestras, incluyendo los controles. Se barrieron imágenes de campo de luz fluorescente y brillante de cada

15 sección y se las fusionó utilizando el software LSM posteriormente para exhibir la información estructural. Se obtuvo una fuerte señal con el anticuerpo anti-CP4-EPSPS en el tejido de los filamentos (Figura **6A**, flecha corta) y el polen (Figura **6A**, flecha larga) en la panoja madura de las plantas generadas con el constructo 4 (Figura **6A**), que carecían del elemento ARNsi-mts. La planta de la **Figura 6A**

20 es homocigota para el cassette del transgén; por lo tanto, sólo aproximadamente 50% del polen exhibió la señal CP4-EPSPS positiva. Por el contrario, se obtuvo una fuerte señal con el anticuerpo anti-CP4-EPSPS sólo en el tejido filamentoso (Figura **6B**, flecha corta) y no se observó señal alguna en el polen (Figura **6B**, flecha larga) de la panoja madura de las plantas generadas con el constructo 3

25 que contenía el elemento ARNsi-mts (Figura **6B**). El anticuerpo control positivo (anti- α -tubulina) exhibió señal en el polen dentro de la panoja madura de las plantas generadas con el constructo 4 o el constructo 3. Los datos de los controles negativos arrojaron la esperada ausencia de señal. Los datos correspondientes al control no transgénico convencional exhibieron la esperada

30 ausencia de señal de la tinción con el anticuerpo anti-CP4-EPSPS y la señal positiva con la tinción con el anticuerpo anti- α -tubulina. Estos datos indican que ninguno o muy pocos de los transcritos del cassette de transformación que

contiene el elemento ARNsi–mts se traslada al polen, aunque el transcripto se trasladó al tejido filamentosos vegetativo. La pérdida de expresión de la proteína CP4–EPSPS en el polen se correlaciona con la sensibilidad al glifosato específica de las panojas observada en las plantas generadas con el constructo 3.

5 Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra pruebas del ensayo de campo para evaluar la fertilidad o esterilidad masculina. Trece eventos de plantas transgénicas confirmados de copia simple R1–R3 generados por la transformación con el cassette de expresión CP4–EPSPS/ elemento ARNsi–mts (constructo 3) fueron analizados en ensayos de campo para determinar la eficacia del cassette de expresión. En el primer año, se analizaron trece eventos en una ubicación en el campo. En el segundo año, se analizaron ocho eventos en cuatro ubicaciones de campo. En el tercer año, se analizaron cuatro eventos en cuatro ubicaciones de campo. Durante los tres años de los ensayos de campo, la tasa de fertilidad masculina (MFR) correspondiente a los eventos generados a partir del constructo 3 fue aproximada o inferior a la MFR 2, que se considera el standard de la industria para macho esterilidad.

Los datos correspondientes a un año de ensayos de campo de eficacia están presentados en la **Figura 8**, donde la MFR promedio producida bajo tres regímenes diferentes de tratamiento con fumigación de glifosato presentados en el gráfico (Figura **8A**) correspondientes a NK603 (CP4–EPSPS maíz transgénico), MON87427 (maíz transgénico CP4–EPSPS con macho–esterilidad inducible por glifosato) y dos eventos del constructo 3. Las fotos de las panojas de las plantas cultivadas durante este ensayo de eficacia en el campo en particular ilustran panojas fértiles cuando se rocían las plantas con glifosato a razón de 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) sólo en la V3 (Figura **8B**); y panojas estériles (sin o con escasa extrusión de las anteras) en las plantas rociadas con glifosato 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) en la V3 seguido por 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) en la V8 y luego 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) en la V10 (Figura **8C**). Para este ensayo de campo, los regímenes de fumigación fueron: el tratamiento 1 consistió en 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) glifosato en la V3 (control de malezas); tratamiento 2 consistió en 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) de glifosato en la V3 (control de malezas) seguido por 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) en la V8 y luego 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) en la V10; el

tratamiento 3 consistió en 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) de glifosato en la V3 (control de malezas) seguido por 1,25 lb./acre (1,40 kg/ha) en la V8 y luego 1,25 lb./acre (1,40 kg/ha) en la V10. Se hace referencia a las últimas dos fumigaciones (es decir, V8 y V10) como fumigaciones de esterilidad. Estos resultados indican que con el tratamiento 1 de fumigación de glifosato sólo para control de malezas, todas las plantas (NK603, MON87427 y eventos del constructo 3) fueron macho fértiles. Con el tratamiento 2 de fumigación con glifosato para esterilidad, las plantas NK603 tuvieron una MFR=5, las MON87427 fueron estériles con MFR=2 y los eventos 2 y 3 del constructo 3 fueron parcialmente macho fértiles con una MFR<3. Con el tratamiento 3 de fumigación para esterilidad con glifosato, las plantas NK603 tuvieron una MFR=5, las MON87427 fueron macho estériles con una MFR<2 y los eventos 2 y 3 del constructo 3 fueron macho estériles con una MFR aproximada o inferior a un puntaje de 2.

Si bien la MFR promedio fue aproximada o inferior a un puntaje de 2, se observó extrusión de las anteras en los eventos del constructo 3 tratados con glifosato en S90+3 y S90+6 (Figura 9). Para estos datos, se compararon cuatro eventos separados del constructo 3 con las plantas MON87427 y NK603 con respecto a dos regímenes de fumigación con glifosato: el tratamiento 2 consistió en 1,5 lb./acre (1,68 kg/ha) de glifosato en la V2/V3 (control de malezas) seguido por 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) de glifosato en las unidades de grado de crecimiento (GDU) 875 (~V8) y luego 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) de glifosato en la GDU 1025 (~V10) y el tratamiento 3 consistió en 1,5 lb./acre (1,68 kg/ha) de glifosato en la V2/V3 (control de malezas), seguido por 1,25 lb./acre (1,40 kg/ha) de glifosato en la GDU 875 (~V8) y luego 1,25 lb./acre (1,40 kg/ha) de glifosato en la GDU 1025 (~V10). Se asignó puntuación al número de plantas por lote (68 – 74 plantas/lote) que exhibían extrusión de las anteras en S90, S90+3 y S90+6, donde S90 es el día en que 90% de las plantas del campo exhiben filamentos; S90+3 es 3 días después de S90; y S90+6 es 6 días después de S90. Como se observa en la Figura 9, en S90 hubo 70(±15) plantas NK603 por lote que exhibían extrusión de las anteras en ambos regímenes de tratamiento con glifosato. Por el contrario, en el caso de MON87427 y los cuatro eventos del constructo 3, hubo 1(±12) planta por lote que exhibía extrusión de las anteras en S90 en ambos regímenes de

tratamiento con glifosato. En S90+3 y S90+6, hubo 30($\pm$ 12) a 70($\pm$ 12) plantas por lote correspondientes a los cuatro eventos del constructo 3 que exhibían extrusión de las anteras con cualquiera de estos regímenes de tratamiento con glifosato, aproximándose al observado en el caso de NK603. La extrusión de las anteras correspondiente al evento MON87427 se mantuvo en el nivel de S90 tanto en los puntos de tiempo S90+3 como S90+6 y por cada régimen de tratamiento con glifosato. A toda planta con ≥ 1 antera extruida se asignó una calificación positiva con respecto a la extrusión de las anteras. Esta extrusión tardía de las anteras, es decir, S90+3 y S90+6, se produce en un período del desarrollo del maíz en que hay una máxima altura de crecimiento de la panoja y hay suficiente distancia para permitir el corte a máquina de la panoja con mínimo daño ocasionado a las dos hojas superiores de la planta de maíz, y por ende un mínimo impacto sobre el rendimiento endogámico. Asimismo, se considera que la extrusión de las anteras en S90+3 o posterior tiene escaso impacto sobre la pureza de la semilla.

Se llevó a cabo el análisis de viabilidad del polen para determinar si la extrusión de las anteras de bajo nivel, aunque persistente observada en S90+3 a S90+6 era una indicación de rotura tardía de fertilidad masculina. **Las Figuras 10A y 10B** ilustran un ejemplo de extrusión de las anteras de rotura tardía en la panoja de un evento del constructo 3 rociado para esterilidad. El recuadro de la **Figura 10A** es la porción ampliada de la **Figura 10B**. Un ejemplo de extrusión de las anteras de rotura tardía está indicado con un círculo en la **Figura 10B**. Para determinar la viabilidad del polen, se recogió polen de anteras extruidas de rotura tardía y se las tiñó con tinción de Alexander, **Figura 10C**. También se recogió polen de eventos del constructo 3 no rociados el mismo día y se los tiñó con tinción de Alexander para comparar, **Figura 10D**. Los resultados de esta tinción de Alexander demuestran sólo polen no viable (granos de polen de forma irregular, azul celeste traslúcido) de las anteras de rotura tardía de los eventos del constructo 3 rociados (**Figura 10C**). El polen completamente viable aparece opaco, de color violeta oscuro y esférico con la tinción de Alexander (**Figura 10D**). Además de la tinción del polen recogido de anteras extruidas de rotura tardía individualmente aisladas, se colocaron bolsas de polinización en algunos eventos del constructo 3 rociados a fin de determinar la disseminación del polen. No se

diseminó polen en forma apreciable en estas bolsas de polinización, que no pudieron general semillas cuando se las utilizó para la polinización cruzada de mazorcas receptoras. Este resultado sugiere que no se diseminó polen de las anteras con extrusión tardía o que el polen que se pueda diseminar no es viable.

- 5 En su conjunto, estos datos indican que, si bien hay un bajo nivel de extrusión de las anteras en los eventos del constructo 3 rociados para la esterilidad, estas anteras extruidas no esparcen polen viable.

Ejemplo 6

- Este ejemplo ilustra ensayos de campo con plantas transgénicas para
10 evaluar el rendimiento. Las plantas R2 del constructo 3 fueron analizadas para evaluar el rendimiento de endogámicas e híbridas. En el caso del rendimiento endogámico, se analizaron las plantas R2 del constructo 3 en cuatro ubicaciones de campo para determinar el rendimiento, la tolerancia vegetativa a la fumigación con glifosato y la macho esterilidad con la fumigación con glifosato. Para estas
15 pruebas de campo, se plantaron cuatro eventos del constructo 3 en lotes de 68–74 plantas/lote. Los tratamientos de fumigación fueron: el tratamiento 1 consistió en 1,5 lb./acre (1,68 kg/ha) de glifosato en la V3 (control de malezas); el tratamiento 2 consistió en 1,5 lb./acre (1,68 kg/ha) de glifosato en la V3 seguido por 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) en la V8 y luego 0,75 lb./acre (0,84 kg/ha) en la V11; el tratamiento 3
20 consistió en 1,5 lb./acre (1,68 kg/ha) de glifosato en la V3 seguido por 1,25 lb./acre (1,40 kg/ha) en la V8 y luego 1,25 lb./acre (1,40 kg/ha) en la V11. Como se puede apreciar en la **Figura 11**, los eventos del constructo 3 en los tres regímenes de tratamiento con glifosato exhibieron buena tolerancia vegetativa (barras blancas) medida por la altura de las plantas, y buen rendimiento endogámico (barras
25 negras) medido en términos de bushels (Bu)/acre. Estos mismos eventos fueron completamente macho fértiles cuando se los trató con el régimen de tratamiento con glifosato sólo para control de malezas (tratamiento 1), pero resultaron macho estériles con una puntuación de MFR igual o inferior a 2 (barras grises) cuando se las trató con los regímenes de tratamiento con glifosato 2 o 3. La barra horizontal
30 de la **Figura 11** indica el standard de la industria correspondiente a esterilidad, MFR 2. Se presenta la NK603 con fines comparativos. Las medidas de rendimiento del grano endogámico correspondiente a los eventos del constructo 3

y NK603 con fumigación con glifosato están consignadas en la **Tabla 4**, donde MST = % de humedad del grano, TWT = peso analítico (una puntuación de densidad, por lo general en libras por bushel) y S50D es el número de días hasta la aparición de 50% de filamentos de las mazorcas en el lote. No hubo diferencia significativa (nd) medida en rendimiento correspondiente a ninguno de los cuatro eventos del constructo 3 analizados con alguno de los tratamientos 2 o 3 con glifosato, en comparación con el control NK603.

Tabla 4: Medidas de rendimiento de los granos endogámicos

	Comparación de los Tratamientos 2 y 3 con el Tratamiento 1		
Eventos	MST	TWT	S50D
cNK603	nd	nd	nd
Evento 1	nd	nd	nd
Evento 2	nd	nd	nd
Evento 4	nd	nd	nd
Evento 3	nd	nd	nd

En cuanto al rendimiento de los granos híbridos F1, los eventos del constructo 3 R3 fueron analizados en cuatro ubicaciones de campo. Para estos ensayos de rendimiento de híbridas, se efectuó la polinización cruzada de una línea endogámica hembra no transgénica (Nula) MON87427 y tres eventos del constructo 3, todas con los mismos antecedentes genéticos, con una línea de prueba macho MON810/MON88017 para generar semillas híbridas F1. Se plantó la semilla híbrida F1 generada de cada una de estas cruzas en lotes standard de 68 – 74 plantas/lote. Los tratamientos de fumigación consistieron en el tratamiento 1 sin fumigación con glifosato; el tratamiento 2 de 2,25 lb./acre (2,5 kg/ha) de glifosato en la V4 seguido por 2,25 lb./acre (2,5 kg/ha) en la V7; el tratamiento 3 de 2,25 lb./acre (2,5 kg/ha) de glifosato en la V4 seguido por 2,25 lb./acre (2,5 kg/ha) en la V7 seguido por 2,25 lb./acre (2,5 kg/ha) en la V10. Las plantas F1 fueron sometidas a polinización abierta para generar grano F2, que es el rendimiento medido en bushels/acre (Bu/acre). Los tres eventos del constructo 3 exhibieron rendimiento equivalente del grano híbrido F1 en todos los regímenes de

tratamiento con glifosato en comparación con las cruzas control de NuloxMON810/MON88017 y MON87427xMON810/MON88017 (Figura 12).

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra el restablecimiento de la fertilidad masculina en plantas híbridas F1. Las plantas híbridas F1 generadas por una craza de eventos del constructo 3 como progenitora femenina fueron analizadas para evaluar la fertilidad masculina. Se establecieron tres cruzas híbridas F1 diferentes: hembra no transgénica x macho MON88017; hembra MON87427 x macho MON88017; y hembra del evento del constructo 3 x macho MON88017. Se cosechó la semilla híbrida F1 de cada una de las tres cruzas, se la plantó en un campo y se la roció con glifosato a razón de 1,125 lb./acre (1,26 kg/ha) en la V4 seguido por 1,125 lb./acre (1,26 kg/ha) en la V10. Se evaluó la fertilidad masculina en F1 por cálculo de tasa de fertilidad masculina (MFR) y mediante tinción de viabilidad de Alexander del polen. Por cada una de las cruzas, la MFR de las plantas híbridas F1 fue de 5 o completamente fértil. La tinción de viabilidad de Alexander demostró que 50% del polen producido por la híbrida F1 de cada una de las cruzas era viable, como se esperaba. (Figura 13) Estos datos indican que se puede restablecer funcionalmente la fertilidad masculina en las plantas híbridas F1 producidas a partir de plantas transgénicas con macho esterilidad inducible por glifosato transformadas con un cassette de expresión CP4–EPSPS/elemento ARNsi–mts.

Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra la construcción de elementos ARNsi–mts variantes y quiméricos. Se mapearon ARNsi–mts individuales sobre un elemento ARNsi–mts presentado en la **Figura 3**; el eje X indica la posición de los nucleótidos de la orientación 5' a 3' de izquierda a derecha en la parte superior y de derecha a izquierda en la parte inferior y el eje Y indica que la abundancia relativa de los ARNsi–mts está indicada en términos de transcritos por cuarto de millón de secuencias (tpq). Los ARNsi–mts también fueron distribuidos en forma no uniforme por todos los ARNsi–mts (Eje X).

Usando esta información, se diseñaron variantes de un elemento ARNsi–mts y/o quimeras producidas utilizando uno o más elementos ARNsi–mts de

manera que contuvieran más (o menos) secuencias totales de ARNsi-mts (opcionalmente, o por otro lado, se agrega (o suprime) una o más secuencias de ARNsi-mts, para dar lugar a un mayor (o menor) silenciamiento de una secuencia codificadora de proteína operativamente ligada. Dichas variantes o elementos ARNsi-mts quiméricos son útiles para aumentar o reducir la supresión selectiva de la expresión de una proteína recombinante en un tejido reproductor masculino de una planta transgénica.

Se construyeron ejemplos de variantes y quimeras de elementos ARNsi-mts empleando fragmentos de **SEC ID NO: 87**. La primera variante (**SEC ID NO: 88**) fue construida empleando un fragmento de 104 nucleótidos del extremo 5' de **SEC ID NO: 87**. La segunda variante (**SEC ID NO: 89**) fue construida empleando un fragmento de 80 nucleótidos de la mitad 3' de **SEC ID NO: 87**. Se construyeron elementos ARNsi-mts quiméricos uniendo un fragmento (**SEC ID NO: 88**) a otro fragmento (**SEC ID NO: 89**) para formar nuevos elementos ARNsi-mts quiméricos (**SEC ID NO: 90** y **SEC ID NO: 91**). Se construyeron elementos ARNsi-mts quiméricos adicionales reuniendo tres ARNsi-mts individuales contenidos dentro de **SEC ID NO: 87**: una primera quimera (**SEC ID NO: 92**) fue construida uniendo las secuencias de ARNsi-mts **SEC ID NO: 26, 27** y **8**; una segunda quimera (**SEC ID NO: 93**) fue construida uniendo las secuencias de ARNsi-mts **SEC ID NO: 10, 33** y **5**; una tercera quimera (**SEC ID NO: 94**) fue construida uniendo las secuencias de ARNsi-mts **SEC ID NO: 26, 10** y **33**. Estas variantes y quimeras pueden estar operativamente ligadas a una secuencia codificadora de proteínas para producir constructos de ADN recombinante (ver la **Figura 14**) que pueden ser analizados en plantas y células vegetales para detectar la supresión selectiva de una proteína recombinante codificada por la secuencia codificadora de proteína en un tejido reproductor masculino de una planta transgénica.

Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra el diseño de elementos ARNsi-mts variantes y quiméricos. Se diseñaron elementos ARNsi-mts variantes y quiméricos sobre la base de un elemento ARNsi-mts de 300 nucleótidos (nt) de longitud que tiene la **SEC ID NO: 81**, que es similar a los elemento ARNsi-mts de 300 nucleótidos que

5 tienen las **SEC ID NO: 82 y 87**. Una secuencia consensual altamente conservada respecto de los elementos ARNsi–mts **SEC ID NO: 81, 82 y 87** es aportada por la **SEC ID NO: 96**. Individualmente, cada una de estas es útil asimismo como elemento ARNsi–mts o como base para el diseño de elementos ARNsi–mts variantes o quiméricos, por ej., mediante la selección de fragmentos de un elemento ARNsi–mts identificado de la secuencia genómica o ADNc, como por ejemplo fragmentos que incluyen por lo menos una secuencia de ARNsi–mts y la combinación o concatenación de dichos fragmentos.

10 Se seleccionaron dos fragmentos de **SEC ID NO: 81**; el fragmento A (**SEC ID NO: 97**) contenía 104 nucleótidos contiguos de la región 5' (posiciones 1 – 104) de **SEC ID NO: 81** y el fragmento B (**SEC ID NO: 98**) contenía 80 nucleótidos contiguos de la región 3' (posiciones 215 – 294) de **SEC ID NO: 81**; es evidente que tanto el fragmento A (**SEC ID NO: 97**) como el fragmento B (**SEC ID NO: 98**) individualmente, son elementos ARNsi–mts que contienen por lo
15 menos una secuencia de ARNsi–mts. La ubicación de los fragmentos A y B (indicada por el texto subrayado) está expuesta en la siguiente secuencia completa de **SEC ID NO: 81**, que también indica la ubicación de las secuencias de ARNsi–mts (indicada por el texto en letra cursiva; los segmentos en letra cursiva de más de 18 nucleótidos contiguos pueden incluir más de una secuencia
20 de ARNsi–mts superpuesta) que demostró

mapearse contra este elemento ARNsi–mts:

GGACAACAAGCACCTTCTTGCCCTTGCAAGGCCTCCCTTCCCTATGGTAGCCA
CTTGAGTGGATGACTTCACCTTAAAGCTATCGATTCCCTAAGTGCCAGACATA
ATAGGCTATACATTCTCTCTGGTGGCAACAATGAGTCATTTTGGTTGGTGTGG
25 TAGTCTATTATTGAGTTTGTGGTGGCACCCTACTCCCATGGAGAGTACAAGAC
AAACTCTTCACCGTTGTAGTCGTTGATGGTATTGGTGGTGACGACATCCTTGG
TGTGCATGCACTGGTGAGTCACTGTTGTACTCGGCG (**SEC ID NO: 81**). Se
diseñaron elementos ARNsi–mts variantes empleando los fragmentos “A” y “B”,
que incluían el elemento ARNsi–mts “A+B” (**SEC ID NO: 99**) y un elemento
30 ARNsi–mts “B+A” (**SEC ID NO: 100**). Se diseñó un elemento quimérico (**SEC ID NO: 101**) de manera que incluyera las secuencias de mts de ARNsi–mts (que

aparecen en el texto en cursiva anterior de la **SEC ID NO: 81**) y se encontró que se mapeaban contra el elemento ARNsi–mts (**SEC ID NO: 81**).

Del mismo modo, se identificó un elemento ARNsi–mts de 251 nt de longitud (**SEC ID NO: 102**) y se identificó un elemento ARNsi–mts de 121–nt de longitud (**SEC ID NO: 103**, un fragmento de **SEC ID NO: 102**, es decir, el segmento contiguo situado en las posiciones de nucleótidos 47 – 167 de **SEC ID NO: 102**) de la secuencia genómica del maíz (Zm_B73_CR10::Segment{75361491..75361742}) como específicos de las panojas y correspondientes a los ARNsi–mts de las panojas jóvenes (maíz LH244, biblioteca 347; los ARNsi–mtss identificados individualmente en algunos casos se superponen en gran parte de su secuencia y varían sólo en pocos nucleótidos; ver la **Tabla 5**). Basándose en **SEC ID NO: 102** y **103**, se diseñó un elemento quimérico ARNsi–mts (**SEC ID NO: 104**).

Tabla 5: ARNsi–mts mapeados contra la SEC ID NO: 103

ID bibl.	ID ARNs (específico de cada biblioteca)	inicio mapeo	fin mapeo	hebra	expresión (tpq en caso de lib9, recuentos gruesos en otros casos)	SEC ID NO:	Secuencia (en términos de equivalente de ADN)
347	710618	48	72	–1	1	105	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCCTA
347	325	49	72	–1	667	106	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
9	75221	49	72	–1	14,0375	107	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
9	79587	49	70	–1	1,7547	108	CAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
347	1443964	49	70	–1	1	109	CAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
347	1798947	50	72	–1	1	110	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCC
9	993198	51	74	1	5,264	111	GGCTAAGTATTGCGGCTTTGGTAG
346	2511625	56	79	–1	1	112	GACAACTACCAAAGCCGCAATACT
347	1978935	62	84	–1	1	113	GATATGACAACTACCAAAGCCGC
347	955660	63	86	–1	1	114	TAGATATGACAACTACCAAAGCCG
347	1183103	64	84	–1	1	115	GATATGACAACTACCAAAGCC
347	36752	73	96	–1	12	116	ATCAAAAGTTTATGATATGACAACT
347	151532	75	98	1	4	117	TTGTCATATCTAAACTTTTGATAG
347	1372	97	120	–1	197	118	ACGAGTACTCTAACATATAAGACT
347	316040	97	117	–1	2	119	AGTACTCTAACATATAAGACT
347	1310155	98	121	1	1	120	GTCTTATATGTTAGAGTACTCGTT
347	26503	99	122	1	15	121	TCTTATATGTTAGAGTACTCGTTA
347	490490	109	132	–1	2	122	ATCAAAACCCTAACGAGTACTCTA
347	1125767	114	137	–1	1	123	AGACAATCAAAACCCTAACGAGTA
347	442804	115	138	–1	2	124	GAGACAATCAAAACCCTAACGAGT
347	965720	118	141	–1	1	125	CAGGAGACAATCAAAACCCTAACG
345	1549424	119	142	–1	1	126	ACAGGAGACAATCAAAACCCTAAC
347	311196	120	143	–1	2	127	CACAGGAGACAATCAAAACCCTAA
347	190	121	144	–1	1018	128	ACACAGGAGACAATCAAAACCCTA
346	591709	121	144	–1	2	129	ACACAGGAGACAATCAAAACCCTA
347	363241	121	143	–1	2	130	CACAGGAGACAATCAAAACCCTA
347	1603891	121	141	–1	1	131	CAGGAGACAATCAAAACCCTA
347	135176	122	144	–1	4	132	ACACAGGAGACAATCAAAACCCT
347	48157	123	146	1	9	133	GGGTTTTGATTGTCTCCTGTGTAT
347	1866298	123	144	–1	1	134	ACACAGGAGACAATCAAAACCC
347	1707358	124	147	–1	1	135	AATACACAGGAGACAATCAAAACC
347	1788406	129	146	1	1	136	TGATTGTCTCCTGTGTAT
347	519539	130	153	1	2	137	GATTGTCTCCTGTGTATTTACCCT
347	383791	133	156	–1	2	138	GAGAGGGTAAATACACAGGAGACA
347	273115	135	158	1	2	139	TCTCCTGTGTATTTACCCTCTCGC
345	1244664	135	157	–1	1	140	CGAGAGGGTAAATACACAGGAGA
346	1460995	135	157	–1	1	141	CGAGAGGGTAAATACACAGGAGA
347	697148	135	157	1	1	142	TCTCCTGTGTATTTACCCTCTCG
347	1716970	136	159	1	1	143	CTCCTGTGTATTTACCCTCTCGCA
347	839648	137	157	–1	1	144	CGAGAGGGTAAATACACAGGA
347	8578	145	168	–1	38	145	TACAATAAGTGCGAGAGGGTAAAT

9	519321	145	168	-1	8,7734	146	TACAATAAGTGCGAGAGGGTAAAT
347	423280	145	167	-1	2	147	ACAATAAGTGCGAGAGGGTAAAT
347	377787	146	168	-1	2	148	TACAATAAGTGCGAGAGGGTAAA
9	444803	146	167	-1	1,7547	149	ACAATAAGTGCGAGAGGGTAAA

*posición de los nucleótidos dentro de **SEC ID NO: 103**

Ejemplo 10

Este ejemplo ilustra vectores y células, tejidos y plantas transgénicas que contienen constructos de ADN recombinante que incluyen una secuencia
5 codificadora de proteína que codifica una proteína recombinante y un elemento ARNsi-mts operativamente ligado a la secuencia codificadora de proteína.

Se utiliza un vector de transformación de plantas que comprende un constructo de ADN recombinante para la transformación mediada por *Agrobacterium* de células de maíz. Este vector de transformación incluye ADN
10 para la transferencia mediada por *Agrobacterium* de ADN-T, un cassette de expresión (promotor operativamente ligado a una secuencia de ADN de interés), un cassette de expresión de marcador seleccionable (para la selección conveniente de las células o plantas de maíz transformadas) y ADN para el mantenimiento del vector en *E. coli* (*por ej.*, una secuencia de origen de replicación de *E. coli*). En una forma de realización, el vector de transformación
15 incluye un cassette de expresión que comprende un constructo de ADN recombinante flanqueado por secuencias de borde derecha e izquierda de *Agrobacterium*, donde el constructo de ADN recombinante incluye el transgén de tolerancia a los herbicidas CR-AGRtu.aroA-CP4.nat (presentado como **SEC ID NO: 95**) como secuencia codificadora de ADN que codifica una proteína recombinante. El transgén de tolerancia a los herbicidas CR-AGRtu.aroA-CP4.nat está operativamente ligado al mt-siRNA presentado como **SEC ID NO: 81** como secuencia de ADN que codifica un elemento ARNsi-mts.

Se construyen vectores de transformación para expresar diferentes
25 constructos de ADN recombinante mediante la inserción de un polinucleótido que incluye un elemento ARNsi-mts (*por ej.*, **SEC ID NO: 57-94 o 97-104**) en el vector de transformación de plantas. Se inserta el elemento ARNsi-mts adyacente a la secuencia de ADN que codifica una proteína recombinante o dentro de la región 3' sin traducir de la secuencia de ADN que codifica una

proteína recombinante. Esos vectores de transformación de plantas son ventajosos para generar plantas transgénicas en las que se puede inducir la macho–esterilidad mediante la aplicación de herbicida.

Los métodos para la transformación de plantas son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se cultivan plantas de maíz de una línea transformable en el invernadero y se cosechan las mazorcas cuando los embriones tienen una longitud de 1,5 a 2,0 mm. Se esteriliza la superficie de las mazorcas con etanol al 80%, seguido por secado al aire. Se aíslan los embriones inmaduros de los granos individuales de las mazorcas esterilizadas. Antes de la inoculación de las células de maíz, se mantienen cultivos individuales de *Agrobacterium*, cada uno de los cuales contiene un vector de transformación para expresar por lo menos uno de los constructos de ADN recombinante de la presente invención de un día para otro a temperatura ambiente. Se inoculan los cultivos de células embrionarias de maíz con *Agrobacterium*, se los incuba a temperatura ambiente con *Agrobacterium* por espacio de 5 a 20 minutos, se los co–cultiva con *Agrobacterium* durante 1 a 3 días a 23 grados Celsius en la oscuridad, se los transfiere a un medio de selección y se los cultiva durante aproximadamente 2 semanas para dar lugar al desarrollo del callo embriogénico. Se transfiere el callo embriogénico a un medio de cultivo que contiene 100 mg/l de paromomicina y se lo subcultiva a intervalos de aproximadamente dos semanas. Se recuperan múltiples eventos de células vegetales transformadas 6 a 8 semanas más tarde, una vez iniciada la selección.

Se regeneran plantas transgénicas de maíz del callo de células vegetales transgénicas por cada uno de los eventos transgénicos que se producen como resultado de la transformación y selección, colocando callo transgénico de cada evento en un medio para iniciar los brotes y el desarrollo de las raíces en las plántulas que son transferidas al suelo para macetas para el desarrollo inicial en una cámara de cultivo a 26 grados centígrados, seguido por el cultivo en un banco de fumigación antes de transplantarlos a macetas donde las plantas son cultivadas hasta su madurez. Las plantas regeneradas son autofecundadas. Se cosecha la primera generación de semillas (“R1”). Las plantas cultivadas a partir de semillas R1 (plantas “R2”) son utilizadas para producir la progenie.

Ejemplo 11

Este ejemplo ilustra métodos para seleccionar secuencias de ARNsi-mts y elementos ARNsi-mts para usar en los constructos de ADN recombinante que incluyen una secuencia codificadora de proteína que codifica una proteína recombinante y un elemento ARNsi-mts operativamente ligado a la secuencia
5 codificadora de proteína.

Un método para verificar la eficacia de un elemento ARNsi-mts para suprimir selectivamente la expresión de una proteína recombinante en un tejido reproductor masculino de una planta transgénica conlleva el uso de un ensayo de protoplastos en el cual los protoplastos de las células vegetales son co-
10 transformados con: (a) un vector que contiene un constructo de ADN recombinante que incluye una secuencia codificadora de proteína y un elemento ARNsi-mts operativamente ligado a la secuencia codificadora de proteína y (b) ARN(s) que tienen la secuencia del o los ARNsi(s) que corresponde al elemento o los elementos ARNsi-mts (o, por otro lado, la secuencia o secuencias de ARNsi-
15 mts), donde se estima que el nivel de expresión de la proteína recombinante ha de ser inversamente proporcional al grado en el cual el elemento ARNsi-mts es escindido por el o los ARN(s).

Esto se ilustra mediante el siguiente ejemplo no limitante. El ensayo se llevó a cabo en dos secuencias de ARNsi-mts (que corresponden a dos ARNsi que
20 demostraron expresarse profusamente en la panoja del maíz). En pocas palabras, se cotransforman protoplastos foliares de maíz con: (a) un plásmido (3 microgramos/320.000 células) que contiene un constructo de ADN recombinante que incluye una secuencia codificadora de proteína que codifica una proteína recombinante (CP4-EPSPS, **SEC ID NO: 95**) y un elemento ARNsi-mts (**SEC ID**
25 **NO: 81**) y (b) un primer ARNs en el cual una primera hebra tiene la secuencia **SEC ID NO: 150** en la dirección 5' a 3' y una segunda hebra que es el complemento de la primera y un segundo ARNs en el cual una primera hebra tiene la secuencia **SEC ID NO: 151** en la dirección 5' a 3' y una segunda hebra que es el complemento de la primera. Los ARNs (de Integrated DNA
30 Technologies, Inc., Coralville, Iowa) fueron analizados a razón de 0, 5, 25 o 50 nanogramos/320.000 células, ajustándose el ARN total utilizado en cada ensayo de cotransformación con un ARN "de relleno" que consistía en miRNA395 (en

forma de 21–mero maduro, provisto en forma de ARNds) o bien en ARNt de levadura hasta 50 nanogramos/320.000 células. Se determinó el nivel de proteína CP4–EPSPS por ELISA y se lo utilizó para evaluar la capacidad de los ARNds analizados para suprimir la expresión de la proteína recombinante. Los resultados
5 están consignados en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Nivel de proteína CP4–EPSPS

ARNds analizado	ARNds (ng)	ARN relleno (ng)	Proteína CP4–EPSPS (ng/mg de proteína total)
ninguno (control)	0	50	317
SEC ID NO: 150	5	45	294
	25	25	167*
	50	0	114*
SEC ID NO: 151	5	45	315
	25	25	223*
	50	0	91*

*estadísticamente significativo con respecto al control

10 Cada uno de los ARNds (**SEC ID NO: 150 y 151**) suprimió vigorosamente la expresión de CP4–EPSPS (indicada por la acumulación reducida de proteína CP4–EPSPS) cuando se los cotransformó con el plásmido que contenía el constructo de ADN recombinante que incluye la secuencia codificadora de proteína CP4–EPSPS y el elemento ARNsi–mts. La supresión observada de
15 CP4–EPSPS fue dependiente de la dosis de la cantidad de ARNds e independiente del tipo de ARN de relleno. No se observó la supresión de CP4–EPSPS en las muestras control cotransformadas con el ARN de relleno en lugar de los ARNds del ensayo.

20

Ejemplo 12

Este ejemplo ilustra constructos de ADN recombinante, vectores y plantas transformadas de la invención. Se utilizaron vectores y métodos de transformación similares a los descritos en el **Ejemplo 10** para producir plantas
25 de maíz establemente transformadas que contenían, en su genoma, un constructo

de ADN recombinante que incluye una secuencia codificadora de proteína operativamente ligada a una secuencia de ADN que comprende un elemento ARNsi-*mts*. Se analizaron seis combinaciones de diseño del constructo/elemento ARNsi-*mts* (ver la **Tabla 7**). Se rociaron las plantas dos veces (en la V5 y V8) con 0,75 lb. ae/A (0,84 kg/ha) de Roundup WeatherMAX®. Los resultados están consignados en la **Tabla 7**. Por cada diseño de la combinación constructo/elemento ARNsi-*mts*, se dejaron aproximadamente 20 plantas sin rociar para compararlas con las plantas rociadas con glifosato. Todas las plantas sin rociar esparcieron polen y exhibieron buena fertilidad masculina (no se presentan datos). Las plantas de maíz transformadas con el diseño del constructo B exhibieron macho esterilidad más pronunciada que las plantas de maíz transformadas con el diseño del constructo A. Los constructos diseñados (5' a 3', de izquierda a derecha) fueron: el Constructo A que es promotor A/intrón A/péptido de tránsito A/CP4-EPSPS (SEC ID NO: 95)/elemento ARNsi-*mts* /3'UTR y el Constructo B es el promotor B/intrón B/péptido de tránsito B/CP4-EPSPS/elemento ARNsi-*mts* /3'UTR. En el contexto siguiente, "n.m." significa no se midió. La escala de cálculo de tasa de fertilidad masculina (MFR) es: 5 = la emergencia de las anteras es normal, el volumen de polen es igual al de los lotes no fumigados pero puede o no esparcir polen; 4 = la emergencia de las anteras es 50% de la normal, pero esparcen escasamente o no esparcen cantidades normales de polen; 3 = la panoja parece normal aunque hay una esporádica extrusión de las anteras (>10 anteras por panoja) y no se esparce o se esparce escaso polen; 2,5 = no se esparce polen, la antesis se reduce considerablemente (<10 anteras por panoja) o es muy tardía (1 semana) con respecto al final de la formación de filamentos; 2 = no se esparce polen, no hay antesis o es muy tardía (1 semana) con respecto al final de la formación de filamentos; y 1 = no se esparce polen, la panoja tiene un fenotipo de tallo anormal o la antesis se demora dos o más semanas después de la aparición de los filamentos. S90 es cuando 90% de las plantas tienen filamentos listos para la polinización y S90+3 es 3 días después de S90.

Tabla 7: Diseño del constructo/datos de rocío con el elemento ARNsi-*mts*

Diseño del constructo*	elemento ARNsims, SEC ID NO	Daño vegetativo	Diseminación de polen a S90	MFR de S90 a S90+2	% de polen anormal
A	97	No	No	5	100%
A	97	No	No	2,5	100%
A	97	No	No	2	100%
A	98	No	Sí	5	n.m.
A	98	No	No	3	60%
A	98	No	No	5	70%
A	98	No	No	2,5	100%
A	104	No	No	4	n.m.
A	104	No	No	2	50%
A	104	No	No	2,5	100%
B	101	No	No	2	n.m.
B	101	No	No	2,5	100%
B	101	No	No	4	n.m.
B	101	No	No	2	n.m.
B	101	No	No	2,5	n.m.
B	101	No	No	2,5	100%
B	101	No	No	2	100%
B	101	No	No	2,5	100%
B	101	No	No	2,2	n.m.
B	101	No	No	3	20%
B	101	No	No	2	100%
B	97	No	No	2,5	n.m.
B	97	No	No	2	100%
B	97	No	No	2,5	100%
B	97	No	No	4	100%
B	97	No	No	2	n.m.
B	98	No	No	2	100%
B	98	No	No	2,5	100%
B	98	No	No	2	n.m.
B	98	No	No	2,5	n.m.

Todos los materiales y métodos descritos y reivindicados en la presente se pueden preparar y utilizar sin indebida experimentación, según las indicaciones de la descripción que antecede. Los ejemplos expuestos se incluyen para demostrar las realizaciones de la invención. Las personas con capacitación en la técnica han de apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos representan técnicas que el inventor ha comprobado que dan buen resultado para poner en práctica la invención y, por consiguiente, se los puede considerar modalidades preferidas para ponerla en práctica. Sin embargo, las personas con capacitación en la

técnica deben apreciar, a la luz de la presente descripción, que se pueden efectuar numerosos cambios a las realizaciones específicas que se presentan y obtener de todos modos un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Todas dichas sustituciones similares y modificaciones

5 evidentes para una persona con capacitación normal en la técnica se consideran incluidas en el espíritu, alcance y concepto de la invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia codificadora de proteína operativamente ligada a una secuencia de ADN que
5 comprende un elemento ARNsi-mts.
2. El constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual dicho elemento ARNsi-mts comprende por lo menos una secuencia de ARNsi-mts.
3. El constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, en el
10 cual dicha secuencia de ARNsi-mts es seleccionada del grupo que consiste en **SEC ID NO: 1-56 y 105-149**.
4. El constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual dicho elemento ARNsi-mts es seleccionado del grupo que consiste en **SEC ID NO: 57-94 y 96-104**.
- 15 5. El constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la expresión de dicha secuencia codificadora de proteína en una planta transgénica confiere a dicha planta por lo menos tolerancia vegetativa a los herbicidas.
6. El constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, en el
20 cual dicha secuencia codificadora de proteína codifica una EPSPS tolerante al glifosato.
7. Un método para generar un constructo de ADN recombinante que comprende identificar un elemento ARNsi-mts que comprende por lo menos una secuencia de ARNsi-mts y ligar operativamente dicho elemento ARNsi-mts a una
25 secuencia codificadora de proteína.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el cual dicha por lo menos una secuencia de ARNsi-mts es por lo menos una seleccionada del grupo que consiste en **SEC ID NO: 1-56 y 105-149** o dicho elemento ARNsi-mts es seleccionado del grupo que consiste en **SEC ID NO: 57-94 y 96-104**.
- 30 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el cual dicho elemento ARNsi-mts es específico de las panojas.

10. Una planta transgénica que tiene, en su genoma, el constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1.
11. Una semilla, progenie o parte de la planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 10.
- 5 12. La planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha planta transgénica es una planta monocotiledónea.
13. La planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha planta transgénica es una planta de maíz.
14. Un método para suprimir selectivamente la expresión de una proteína recombinante en un tejido reproductor masculino de una planta transgénica que
10 comprende expresar en dicha planta transgénica un constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual dicho tejido reproductor masculino es una panoja de una planta de maíz.
- 15 16. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual dicho elemento ARNsi-mts comprende por lo menos tres secuencias de ARNsi-mts.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual dicho elemento ARNsi-mts comprende por lo menos una secuencia de ARNsi-mts seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 1-56 y 105-149.
- 20 18. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual dicho elemento ARNsi-mts es seleccionado del grupo que consiste en SEC ID NO: 57-94 y 96-104.
19. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual la expresión de dicha proteína recombinante en una planta transgénica confiere a dicha planta por lo
25 menos tolerancia vegetativa a los herbicidas.
20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en el cual de dicha proteína recombinante es una EPSPS tolerante al glifosato.
21. Un método para inducir la macho esterilidad en una planta transgénica que comprende aplicar una cantidad efectiva de un herbicida a una planta
30 transgénica que comprende un constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual dicha aplicación de herbicida se lleva a cabo durante el desarrollo del tejido reproductor masculino de dicha planta

transgénica para inducir de esa manera la macho–esterilidad en dicha planta transgénica.

22.El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el cual dicha planta transgénica es una planta de maíz.

5 23.El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el cual dicha aplicación de herbicida previene por lo menos la diseminación de polen o la extrusión de las anteras.

24.El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el cual dicho desarrollo del tejido reproductor masculino es en una etapa seleccionada del grupo que
10 consiste en las etapas V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 y V14 del desarrollo de una planta de maíz.

25.El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el cual dicho herbicida es seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de la acetil coenzima A carboxilasa (ACCase), inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS), inhibidores
15 del fotosistema II (PSII), inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO), inhibidores de la 4–hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD), inhibidores de la 5–enolpiruvil shikimato 3–fosfato sintasa (EPSPS), inhibidores de la glutamina sintetasa (GS) y auxinas sintéticas.

26.El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el cual dicho herbicida es
20 glifosato y dicha proteína recombinante es una EPSPS tolerante al glifosato.

27.Un método para producir semillas híbridas que comprende:

a. aplicar una cantidad efectiva de herbicida a una planta transgénica que comprende un constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual dicha aplicación de herbicida se lleva a cabo
25 durante el desarrollo del tejido reproductor masculino de dicha planta transgénica, induciendo de esa manera la macho–esterilidad en dicha planta transgénica;

b. fertilizar dicha planta transgénica con polen de una segunda planta y

c. cosechar semillas híbridas de dicha planta transgénica.

30 28.El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el cual dicha planta transgénica es de maíz.

- 29.El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el cual dicho herbicida es glifosato y dicha proteína recombinante es una EPSPS tolerante al glifosato.
- 30.El método de acuerdo con la reivindicación 29, en el cual dicho glifosato es aplicado durante dicho desarrollo en una dosis efectiva de aproximadamente 0,125 libras de equivalente ácido por acre (0,14 kg/ha) a aproximadamente 8 libras de equivalente ácido por acre (8,97 kg/ha).
- 31.Semilla híbrida cosechada de una I que ha sido fertilizada con polen de una segunda planta, donde dicha planta transgénica macho–estéril comprende un constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 y se le ha inducido la macho–esterilidad mediante la aplicación de una cantidad efectiva de herbicida durante el desarrollo del tejido reproductor masculino de dicha planta transgénica.