

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

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la
Solicitud Provisional estadounidense N° 62/195.546,
presentada el 22 de julio de 2015, que se incorpora a la
presente en su totalidad mediante esta referencia.

INCORPORACIÓN DE LOS LISTADOS DE SECUENCIAS

El listado de secuencias que está contenido en el archivo
denominado "MONS392US_ST25.txt", que tiene 26,3 kilobytes
(medido en el sistema operativo MS-Windows), creado el 28
de junio de 2016, se presenta con la presente e incorpora a
15 la presente mediante referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

La invención se refiere, en general, a los campos de la
20 agricultura, cultivo de plantas y biología molecular. Más
específicamente, la invención se refiere a métodos y
composiciones para regular selectivamente la expresión de
proteínas en el tejido reproductor de macho de las plantas
transgénicas y sus usos.

25 Descripción de la técnica relacionada

Se produce una semilla híbrida mediante la hibridación o la

fertilización cruzada de plantas estrechamente relacionadas y se puede cultivar en plantas híbridas de progeñie que poseen una combinación deseada de rasgos que no posee ninguna de las plantas originales. Las plantas híbridas pueden mostrar características agronómicas superiores como la mejora del tamaño de la planta, el rendimiento, la composición nutricional, la resistencia a enfermedades, la tolerancia a herbicidas, la tolerancia al estrés, la adaptación climática y otros rasgos deseados. La producción de semillas híbridas eficiente requiere que el polen de una planta no pueda autofertilizar la planta. Una limitación importante en la producción de una semilla híbrida para muchos cultivos es la falta de métodos simples, confiables y económicos para androesterilizar las plantas e impedirles la autofertilización.

En la producción de semillas híbridas, la producción de polen y la diseminación del polen se pueden impedir en una planta original hembra para facilitar la polinización cruzada de la hembra en lugar de la autopolinización. Dicho impedimento se puede lograr, por ejemplo, mediante eliminación manual de las estructuras que contienen polen (por ejemplo, mediante despanojado manual o mecánico en el maíz), el uso de un medio genético de control de la polinización (por ejemplo, mediante el uso de tecnología de androesterilización citoplásmica o nuclear), el uso de un agente químico o cualquier combinación de estos. Este

proceso puede requerir mucha mano de obra y, por lo tanto, resulta costoso. En el maíz, por ejemplo, el despanojado se realiza, típicamente, en dos etapas: despanojado mecánico seguido por despanojado manual. La producción comercial de
5 semillas híbridas utilizando únicamente gametocidas químicos está limitada principalmente por su falta general de selectividad para los gametos y su efecto sobre las otras partes de la planta. Por lo tanto, los métodos para mejorar la eficacia de la producción de semillas híbridas
10 son altamente deseables.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se refiere, generalmente, a mejoras en los métodos para regular de forma selectiva la expresión de
15 proteínas en el tejido reproductor del macho de las plantas transgénicas, las moléculas de ADN recombinante útiles en dichos métodos, así como las células, semillas y plantas transgénicas que contienen dichas moléculas de ADN recombinante. La invención proporciona una mejora sobre la
20 técnica al proporcionar elementos diana de ARNip específico de tejido de macho (mts-ARNip) capaces de proporcionar una regulación selectiva mejorada de la expresión de una proteína codificada por una molécula de polinucleótidos que se puede transcribir y proporciona moléculas de ADN
25 recombinante y composiciones que comprenden dichos elementos diana de mts-ARNip y métodos para utilizar dichos

elementos diana de mts-ARNip para inducir la esterilidad masculina en las plantas transgénicas para la producción de una semilla híbrida.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de ADN
5 recombinante que comprende un elemento diana de mts-ARNip unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga. En una modalidad, el elemento diana de mts-ARNip está incluido dentro de una región no traducida 3' unida operativamente a la molécula
10 de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga. En otra modalidad, el elemento diana de mts-ARNip está ubicado entre la molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga y una secuencia de poliadenilación unida operativamente que forma parte de una región no
15 traducida 3'. En una modalidad, el elemento diana de mts-ARNip comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-16, 23-92 y complementos de estos. En otra modalidad, la molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga confiere tolerancia a
20 herbicidas, por ejemplo, tolerancia a herbicidas vegetativos, a una planta. En otra modalidad, la molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga no confiere tolerancia a herbicidas reproductores del macho a una planta. En otra modalidad, la molécula de
25 polinucleótido que se puede transcribir heteróloga es una 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS)

tolerante al glifosato.

En otro aspecto, la invención proporciona una construcción de ADN recombinante que comprende un elemento diana de mts-ARNip de la invención unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una molécula de ADN recombinante que comprende unir operativamente al menos un elemento diana de mts-ARNip a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga. En una modalidad, el elemento diana de mts-ARNip comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-16, 23-92 y complementos de estos.

En otro aspecto, la invención proporciona una planta transgénica que comprende un elemento diana de mts-ARNip de la invención. En una modalidad, la planta transgénica comprende el elemento diana de mts-ARNip unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga. En otra modalidad, el elemento diana de mts-ARNip comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-16, 23-92 y complementos de estos. En otra modalidad, la planta transgénica es producida mediante la transformación de una planta con una molécula de ADN recombinante o una construcción de ADN que comprende al menos un elemento diana de mts-ARNip unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga. En otro

aspecto, la invención proporciona una semilla, una célula o parte de dicha planta transgénica. En una modalidad, la planta es una planta monocotiledónea. En otra modalidad, la planta es una planta de maíz (*Zea mays*).

- 5 En otro aspecto, la invención también proporciona un método para regular de forma selectiva la expresión de una proteína en un tejido reproductor de macho de una planta transgénica mediante la expresión en la planta transgénica de una molécula de ADN recombinante que comprende un
- 10 elemento diana de mts-ARNip unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga. En una modalidad, el elemento diana de mts-ARNip comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-16, 23-92 y complementos de estos.
- 15 En otra modalidad, la molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga confiere tolerancia a herbicidas, por ejemplo, tolerancia a herbicidas vegetativos, a una planta. En otra modalidad, la molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga no
- 20 confiere tolerancia a herbicidas reproductores del macho a una planta. En otra modalidad, la molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga es una EPSPS tolerante al glifosato.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para

25 inducir la esterilidad masculina en una planta transgénica, incluida la etapa de aplicar herbicida a una planta

transgénica que tiene en su genoma una molécula de ADN recombinante que comprende un elemento diana de mts-ARNip unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga que confiere tolerancia a

5 al menos un primer herbicida a la planta transgénica, en donde el herbicida se aplica antes o de forma simultánea con el desarrollo del tejido reproductor de macho de la planta transgénica, mediante lo cual se induce la androesterilidad en la planta transgénica. En una

10 modalidad, la molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga confiere tolerancia a herbicidas vegetativos, pero no confiere tolerancia a herbicidas reproductores del macho a la planta transgénica. En otra modalidad, la planta transgénica es una planta de maíz. En

15 otra modalidad, la aplicación del herbicida impide al menos el desarrollo de polen, la diseminación de polen o la extrusión de anteras en la planta transgénica tratada. En otra modalidad, la etapa de desarrollo del tejido reproductor masculino durante la cual el herbicida se

20 aplica 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. En otra modalidad, el herbicida se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de acetil coenzima A carboxilasa (ACCase),

25 inhibidores de acetolactato sintasa (ALS), inhibidores de fotosistema II (PSII), inhibidores de protoporfirinogen

oxidasa (PPO), inhibidores de 4-hidroxifenildioxigenasa (HPPD), inhibidores de 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS), inhibidores de glutamina sintetasa (GS) y auxinas sintéticas. En otra modalidad, el herbicida es
5 glifosato y el polinucleótido que se puede transcribir heterólogo codifica una EPSPS tolerante al glifosato.

En un aspecto, la invención también proporciona un método para producir una semilla híbrida que comprende aplicar una cantidad eficaz de un herbicida a una planta transgénica
10 que comprende en su genoma una molécula de ADN recombinante que comprende un elemento diana de mts-ARNip unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga, en donde el herbicida se aplica antes o de forma simultánea con el desarrollo del
15 tejido reproductor de macho de la planta transgénica, mediante lo cual se induce la androesterilidad en la planta transgénica; fertilizar la planta transgénica con polen de una segunda planta; y dejar que se forme la semilla híbrida a partir de la planta transgénica. En una modalidad, la
20 planta transgénica es maíz. En otra modalidad, el herbicida es glifosato y la molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga es una EPSPS tolerante al glifosato. En otra modalidad, el glifosato se aplica de forma simultánea con el desarrollo en una cantidad eficaz de
25 aproximadamente 0,125 libras de ácido equivalente por acre y aproximadamente 8 libras de ácido equivalente por acre.

En otro método, la invención proporciona una semilla híbrida producida por dicho método. En una modalidad, la semilla híbrida comprende la molécula de ADN recombinante. Otras modalidades específicas de la invención se describen en la siguiente descripción detallada. A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender" y sus variaciones tales como "comprende" o "que comprende" implican la inclusión de un número entero, elemento o etapa, o grupo de enteros, elementos o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro entero, elemento o etapa, o grupo de enteros, elementos o etapas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Ilustración de las etapas de desarrollo de borla V7 en T2, V8/V9 en T4, V10/V11 en T5, V12 en T6 y VT en T7 que muestran un tamaño y morfología de borla con las fotografías de los paneles inferiores de las secciones transversales de las anteras que muestran la etapa de desarrollo de polen. Las etapas utilizadas anteriormente (V10/V11 y V12) en la técnica para aislar moléculas de ARN pequeñas para la identificación de moléculas de mts-ARNip están indicadas por una casilla con una línea sólida; las etapas (V7, V8/V9, V10/V11 y V12) descritas en la presente para aislar moléculas de ARN pequeñas están indicadas con una casilla con una línea punteada.

Figura 2. Representación gráfica de alineamiento de secuencias de mts-ARNip sobre la secuencia de ADNc proporcionada como SEQ ID NO: 17. La secuencia de ADNc está indicada desde el nucleótido 1 al 1826 y las líneas cortas representan el alineamiento de la cadena complementaria de las secuencias de mts-ARNip individuales o los tramos de secuencias de mts-ARNip adyacentes o las secuencias de mts-ARNip superpuestas (líneas relativamente más largas) a la secuencia de ADNc. Las secuencias de mts-ARNip que tienen la misma cadena que ADNc no se muestran. El nivel de expresión relativa normalizada de mts-ARNip está indicado a la izquierda. El área dentro de la casilla representa una región de la secuencia de ADNc rica en dianas de mts-ARNip.

Figura 3. Diagrama que ilustra mts-ARNip de cadena doble, mts-ARNip de cadena simple, secuencia diana de mts-ARNip dentro de un ARNm y una región de ARNm con una cantidad alta de secuencias diana de mts-ARNip útiles como un elemento diana de mts-ARNip.

Figura 4. Fotografía de borla de maíz R0 y polen teñido con tinta Alexandar de plantas transgénicas de copia doble que contienen una molécula de ADN recombinante que comprende un transgen codificante de una proteína de EPSPS tolerante al glifosato unida operativamente a un elemento diana de mts-ARNip (SEQ ID NO: 2). Los eventos de 1 a 4 se pulverizaron con 0,75 lb ae/acre de herbicida de glifosato en V5 seguido de la etapa V8 y mostraron borlas con esterilidad masculina

completa según lo definido por la ausencia de antesis y granos de polen no viables o sin granos de polen detectados en las anteras. Las plantas de control no recibieron una aplicación de glifosato y demostraron antesis normal y
5 diseminación del polen y la observación microscópica detectó granos de polen normales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 - Una secuencia de elemento diana de mts-ARNip
10 que tiene el 95 % de identidad de secuencia con las posiciones de nucleótidos de 1429 a 1628 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 17.

SEQ ID NO: 2 - Una secuencia de elemento diana de mts-ARNip que tiene el 95 % de identidad de secuencia con las
15 posiciones de nucleótidos de 1429 a 1628 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 17 y que tiene un único cambio de nucleótido (T69A) con respecto a SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 - Una secuencia de elemento diana de mts-ARNip
20 que corresponde con las posiciones de nucleótidos de 239 a 433 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 18.

SEQ ID NO: 4 - Una secuencia de elemento diana de mts-ARNip que corresponde con las posiciones de nucleótidos de 477 a
25 697 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 18.

SEQ ID NO: 5 - Una secuencia de elemento diana de mts-ARNip que corresponde con las posiciones de nucleótidos de 239 a 433 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 19.

5 SEQ ID NO: 6 - Una secuencia de elemento diana de mts-ARNip que corresponde con las posiciones de nucleótidos de 370 a 477 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 19.

SEQ ID NO: 7 - Una secuencia de elemento diana de mts-ARNip
10 que corresponde con las posiciones de nucleótidos de 1357 a 1562 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 20.

SEQ ID NO: 8 - Una secuencia de elemento diana de mts-ARNip que corresponde con las posiciones de nucleótidos de 247 a
15 441 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 21.

SEQ ID NO: 9 - El complemento inverso de una secuencia de elemento diana de mts-ARNip que tiene el 99% de identidad de secuencia con las posiciones de nucleótidos de 191 a 490
20 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 22 con tres errores de apareamiento de nucleótidos (C314A, A350G y G408A).

SEQ ID NO: 10-16 - Secuencias de elementos diana de mts-ARNip recombinantes.

25 SEQ ID NO: 17 - Secuencia de ADNc que contiene al menos una región rica en secuencia diana de mts-ARNip. Contiene las

secuencias del elemento diana de mts-ARNip representadas por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y se alinea con las secuencias de mts-ARNip SEQ ID NO: 23-31.

5 SEQ ID NO: 18 - Secuencia de ADNc que contiene al menos una región rica en secuencia diana de mts-ARNip. Contiene las secuencias del elemento diana de mts-ARNip representadas por SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y se alinea con las secuencias de mts-ARNip SEQ ID NO: 32-42.

10 SEQ ID NO: 19 - Secuencia de ADNc que contiene al menos una región rica en secuencia diana de mts-ARNip. Contiene las secuencias del elemento diana de mts-ARNip representadas por SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y se alinea con las secuencias de mts-ARNip SEQ ID NO: 43-52.

15 SEQ ID NO: 20 - Secuencia de ADNc que contiene al menos una región rica en secuencia diana de mts-ARNip. Contiene la secuencia del elemento diana de mts-ARNip representada por SEQ ID NO: 7 y se alinea con las secuencias de mts-ARNip SEQ ID NO: 53-60.

20 SEQ ID NO: 21 - Secuencia de ADNc que contiene al menos una región rica en secuencia diana de mts-ARNip. Contiene la secuencia del elemento diana de mts-ARNip representada por SEQ ID NO: 8 y se alinea con las secuencias de mts-ARNip SEQ ID NO: 61-69.

25 SEQ ID NO: 22 - Secuencia de ADNc que contiene al menos una región rica en secuencia diana de mts-ARNip. Contiene la secuencia del elemento diana de mts-ARNip representada por

SEQ ID NO: 9 y se alinea con las secuencias de mts-ARNip
SEQ ID NO: 70-87.

SEQ ID NO: 23-92 - Secuencias de ADN que corresponden a las
secuencias de mts-ARNip de la invención, que se alinean con
5 las secuencias de ADNc proporcionadas en la presente como
SEQ ID NO: 17-22.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona moléculas de ADN recombinantes,
10 composiciones y métodos para regular de forma selectiva la
expresión de proteínas, por ejemplo, la expresión de una
molécula de polinucleótido que se puede transcribir
heteróloga, en un tejido reproductor masculino de una
planta transgénica y sus usos. En un aspecto, la invención
15 proporciona una molécula de ADN recombinante que incluye un
elemento diana de ARN interferente pequeño específico de
tejido de macho (mts-ARNip) unido operativamente a un
polinucleótido que se puede transcribir heterólogo. Dichas
moléculas de ADN recombinante son útiles para regular de
20 forma selectiva la expresión de un polinucleótido que se
puede transcribir heterólogo en un tejido reproductor macho
de una planta transgénica. Las secuencias de ácido nucleico
se pueden proporcionar como ADN o como ARN, según lo
especificado; la descripción de una define necesariamente a
25 la otra, según lo sabe el experto en la técnica. Además, la
descripción de una secuencia de ácido nucleico determinada

define necesariamente e incluye el complemento de dicha secuencia, según lo sabe el experto en la técnica.

El ARN interferente pequeño (ARNip) es una clase de moléculas de ARN de aproximadamente 18-26 nucleótidos (nt) de longitud (por ejemplo, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 nt). Una secuencia de ARNip se puede representar utilizando la secuencia de nucleótidos de ARN que consiste en guanina (G), citosina (C), adenina (A) y uracilo (U) o utilizando la secuencia de nucleótidos de ADN equivalente de guanina (G), citosina (C), adenina (A) y timina (T). El ARNip funciona dentro de complejos de silenciamiento inducidos por ARN (RISC) para disparar la degradación específica de secuencia del ARN mensajero (ARNm), lo que produce la alteración de la expresión génica y la regulación por disminución de la proteína codificada por el gen.

Un "ARNip específico de tejido de macho" o "mts-ARNip" es un ARNip enriquecido o expresado específicamente en el tejido reproductor masculino (por ejemplo, la inflorescencia masculina) de una planta que, por ende, tiene un patrón de expresión específico de tejido de macho. Se ha identificado ARNip específico de tejido de macho en plantas y se puede detectar utilizando técnicas conocidas en la técnica, como análisis Northern de bajo peso molecular. Una "secuencia de mts-ARNip" es la secuencia de ácido nucleico de un mts-ARNip. Las secuencias de mts-ARNip

ejemplares en la forma de la secuencia de ADN correspondiente de la molécula de mts-ARNip de cadena doble se proporcionan en la presente como SEQ ID NO: 23-92.

Una secuencia de ADN que es complementaria a una secuencia de mts-ARNip se denomina en la presente como una "diana de mts-ARNip". La diana de mts-ARNip está contenida en la secuencia de ADN de un gen y está transcrita en la secuencia de ARN de la molécula de ARNm correspondiente.

Una cadena simple de una molécula de mts-ARNip de cadena doble se puede unir o hibridar en condiciones fisiológicas típicas con la diana de mts-ARNip en la molécula de ARNm.

Véase la figura 3. Una secuencia de ácido nucleico es complementaria de una secuencia de mts-ARNip si un alineamiento de las dos secuencias de ácido nucleico

producen una coincidencia exacta (sin errores de apareamiento, es decir, complemento completo), un error de apareamiento, dos errores de apareamiento o tres errores de apareamiento a lo largo de la longitud de la secuencia de mts-ARNip. Las secuencias complementarias pueden tener un

apareamiento de bases entre sí de acuerdo con las reglas de complementariedad de Watson-Crick estándar (es decir, pares de guanina con citosina (G:C) y pares de adenina con timina (A:T) o uracilo (A:U). Una "secuencia diana de mts-ARNip"

es la secuencia de ácido nucleico de una diana de mts-ARNip. Las secuencias diana de mts-ARNip ejemplares se proporcionan en la presente como SEQ ID NO: 23-92.

Más de una diana de mts-ARNip se puede agrupar o incluso superponer dentro de una única molécula de ADN. Una molécula de ADN que comprende más de una diana de mts-ARNip se denomina en la presente como "elemento diana de mts-ARNip". Un elemento diana de mts-ARNip comprende al menos dos o más dianas de mts-ARNip dentro de una ventana de secuencia de 500 nucleótidos. Un elemento diana de mts-ARNip puede tener cualquier longitud, por ejemplo, aproximadamente 30 nucleótidos (nt), aproximadamente 40 nt, aproximadamente 50 nt, aproximadamente 60 nt, aproximadamente 70 nt, aproximadamente 80 nt, aproximadamente 90 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 o aproximadamente 500 nt. Una "secuencia de elemento diana de mts-ARNip" es la secuencia de ácido nucleico de un elemento diana de mts-ARNip. Las secuencias de elementos diana de mts-ARNip ejemplares se proporcionan en la presente como SEQ ID NO: 1-16.

Según se utiliza en la presente, una molécula de ADN "recombinante", polipéptido, proteína, célula u organismo puede ser no natural o una creación hecha por el hombre utilizando las herramientas de la ingeniería genética y, como tal, es el producto de la actividad humana y, normalmente, no se encuentra en la naturaleza. Una

"molécula de ADN recombinante" se refiere a una molécula de ADN que comprende una combinación de secuencias de ADN o moléculas que no se encuentran en la naturaleza juntas sin la intervención del hombre. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante puede ser una molécula de ADN que está compuesta por al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí, una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que se desvía de las secuencias de ADN que existen en la naturaleza o una molécula de ADN que se ha incorporado en el ADN de una célula hospedadora mediante transformación genética. En una modalidad, una molécula de ADN recombinante de la invención es una molécula de ADN que comprende un elemento diana de mts-ARNip unido operativamente a al menos una molécula de polinucleótido que se puede transcribir, por ejemplo, en donde la molécula de polinucleótido que se puede transcribir es heteróloga al elemento diana de mts-ARNip. Según se utiliza en la presente, una molécula, célula u organismo "recombinante" puede ser sintético.

Según se utiliza en la presente, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más moléculas de ADN o proteínas cuando dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza o cuando dicha combinación se proporciona en una orientación u orden que es diferente del que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, se pueden derivar las dos moléculas de ADN de especies diferentes o

crear de forma sintética y/o las dos moléculas de ADN se pueden derivar de genes diferentes, p. ej., genes diferentes de las mismas especies o los mismos genes de diferentes especies. En un ejemplo, un elemento regulador o
5 elemento diana de mts-ARNip puede ser heterólogo con respecto a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir unida operativamente si dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza, es decir, la molécula de polinucleótido que se puede transcribir no se
10 encuentra en la naturaleza unida operativamente al elemento regulador o el elemento diana de mts-ARNip. En una modalidad, dicha combinación heteróloga puede comprender un elemento diana de mts-ARNip que puede ser derivado de planta o sintetizado químicamente y puede estar unido
15 operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir, como un transgen bacteriano codificante de una proteína para la tolerancia a herbicidas, como un *cp4-EPSPS* (por ejemplo, como se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 93). Además, una secuencia particular puede
20 ser "heteróloga" con respecto a una célula u organismo en el cual se introduce (por ejemplo, una secuencia que no se encuentra naturalmente en esa célula u organismo particular).

Tal como se utiliza en la presente, el término "aislado" significa separado de otras moléculas que, típicamente, se
25 encuentran asociadas con ella en estado natural. Por

ejemplo, una molécula de ADN aislada es una molécula que está presente sola o combinada con otras composiciones, pero no se encuentra en su ubicación genómica natural o estado. En una modalidad, el término "aislado" se refiere a una molécula de ADN que está separada de los ácidos nucleicos que normalmente flanquean la molécula de ADN en su estado natural. Por ejemplo, una molécula de ADN aislada puede ser una molécula de ADN que está compuesta por al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí. En otro ejemplo, una molécula de ADN aislada puede ser una molécula de ADN que se ha incorporado en una ubicación genómica novedosa en una célula hospedadora por transformación genética. Por ende, una molécula de ADN fusionada o unida operativamente a una o más moléculas de ADN diferentes con las cuales no se encontraría asociada en la naturaleza, por ejemplo, como consecuencia de técnicas de transformación de plantas o ADN recombinante, se considera aislada en la presente. Estas moléculas se consideran aisladas incluso cuando están integradas en el cromosoma de una célula hospedadora o presentes en una solución de ácido nucleico con otras moléculas de ADN.

El término "unido operativamente" se refiere a al menos dos moléculas de nucleótidos dispuestas o unidas de una forma de modo que una pueda afectar la función de la otra. Las dos moléculas de nucleótidos pueden formar parte de una molécula de nucleótidos contigua única y puede estar

adyacentes o separadas. Por ejemplo, un elemento diana de mts-ARNip puede estar unido operativamente con una molécula de polinucleótidos que se puede transcribir. En una modalidad, una molécula de mts-ARNip unida operativamente

5 puede afectar la transcripción, traducción o expresión de la molécula de polinucleótido que se puede transcribir. Por ejemplo, un elemento diana de mts-ARNip está unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir si, después de la transcripción en célula

10 de tejido reproductor masculino, la presencia del elemento diana de mts-ARNip en la molécula de ARNm provoca la regulación de la expresión de la molécula de polinucleótido que se puede transcribir en la célula inducida por el mts-ARNip endógeno y la vía de RISC. La unión operativa del

15 elemento diana de mts-ARNip y la molécula de polinucleótido que se puede transcribir se puede lograr, por ejemplo, a través de la incorporación de un elemento diana de mts-ARNip adyacente a la molécula de polinucleótido que se puede transcribir (por ejemplo ubicado 5' o 3' con respecto

20 a la molécula de polinucleótido que se puede transcribir, pero no necesariamente en unión contigua), o adyacente a una región no traducida (UTR) de la molécula de polinucleótido (por ejemplo ubicado en o al lado de la 5' UTR o la 3' UTR), y/o 3' con respecto a la molécula de

25 polinucleótido que se puede transcribir y 5' con respecto a la señal de poliadenilación. En una modalidad, un elemento

diana de mts-ARNip está ubicado entre la molécula de polinucleótido que se puede transcribir y la secuencia de poliadenilación, es decir 3' y adyacente a la molécula de polinucleótido que se puede transcribir. En otra modalidad, un elemento diana de mts-ARNip está ubicado entre el codón de detención de la molécula de polinucleótido que se puede transcribir y la secuencia de poliadenilación. En otra modalidad, un elemento diana de mts-ARNip está ubicado dentro de la 3' secuencia de UTR adyacente a la molécula de polinucleótido que se puede transcribir.

En la presente se proporcionan ejemplos de la identificación de mts-ARNip, dianas mts-ARNip y elementos diana de mts-ARNip y estos pueden ser identificados a través de métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo a través de análisis bioinformático de bibliotecas de ARNs y ADNc de plantas. En particular, el mts-ARNip puede ser identificado a partir de bibliotecas de ARNs y puede ser secuenciado. Las secuencias de mts-ARNip identificadas se pueden comparar con ADNc y/o colecciones de secuencias genómicas para identificar dianas de mts-ARNip y elementos diana de mts-ARNip útiles para el desarrollo de moléculas y construcciones de ADN recombinante tal como se describe en la presente.

En algunas modalidades, los elementos diana de mts-ARNip son creados, sintetizados o modificados *in vitro*. Por ejemplo, los elementos diana de mts-ARNip pueden ser

modificados para contener más, menos o diferentes secuencias diana de mts-ARNip o para volver a disponer la posición relativa de una o más secuencias diana de mts-ARNip. En algunas modalidades, dicha modificación puede ser

5 beneficiosa para aumentar o disminuir el efecto del elemento diana de mts-ARNip. Los métodos para la creación, síntesis o modificación *in vitro* de un elemento diana de mts-ARNip y para determinar la variación óptima para el nivel deseado de regulación, son conocidos por los expertos

10 en la técnica. Los elementos diana de mts-ARNip ejemplares pueden ser creados mediante la combinación de las secuencias de ADN, o fragmentos de este, de dos o más dianas de mts-ARNip, dos o más elementos diana de mts-ARNip, dos o más regiones de ADNc ricas en diana de mts-

15 ARNip, o una o más dianas o de mts-ARNip o fragmentos de dos o más regiones de ADNc ricas en diana de mts-ARNip, por ejemplo mediante la combinación de todos o fragmentos de dos o más elementos diana de mts-ARNip proporcionados en la presente como SEQ ID NO: 1-9, mediante la combinación de

20 dos o más de las secuencias de mts-ARNip proporcionadas en la presente como SEQ ID NO: 23-92, o mediante la combinación de todos o fragmentos de dos o más elementos diana de mts-ARNip proporcionados en la presente como SEQ ID NO: 1-9 con una o más de las secuencias de mts-ARNip

25 proporcionadas en la presente como SEQ ID NO: 23-92. Dichos elementos diana de mts-ARNip recombinante ejemplares son

proporcionados en la presente como SEQ ID NO: 10-16.

La secuencia de ADN del elemento diana de mts-ARNip también se puede variar mediante la incorporación de 1-3 errores de apareamiento de nucleótidos en una secuencia diana de mts-

5 ARNip (con respecto a una secuencia de mts-ARNip determinada). En otra modalidad, la presente invención incluye moléculas de ADN recombinante o elementos diana de mts-ARNip que tienen al menos aproximadamente el 80 % (por ciento) de identidad de secuencia, aproximadamente el 85 %
10 de identidad de secuencia, aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 91 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 92 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 93 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 94 % de
15 identidad de secuencia, aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia y aproximadamente el 99 % de
20 identidad de secuencia con cualquiera de las moléculas de ADN, los elementos diana de mts-ARNip (por ejemplo SEQ ID NO: 1-9), los elementos diana de mts-ARNip recombinante (por ejemplo SEQ ID NO: 10-16) o las secuencias de ADNc (por ejemplo SEQ ID NO: 17-22) de la presente invención.

25 En otra modalidad, la presente invención proporciona fragmentos de una molécula de ADN descrita en la presente.

Dichos fragmentos pueden ser útiles como elementos diana de mts-ARNip o se pueden combinar con otros elementos diana de mts-ARNip, secuencias de mts-ARNip o fragmentos de estos para la construcción de elementos diana de mts-ARNip recombinante, tal como se describió anteriormente. En modalidades específicas, dichos fragmentos pueden comprender al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 110, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 130, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 170, al menos aproximadamente 180, al menos aproximadamente 190, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 210, al menos aproximadamente 220, al menos aproximadamente 230, al menos aproximadamente 240, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 260, al menos aproximadamente 270, al menos aproximadamente 280, al menos aproximadamente 290, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 350, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos, o más largos, de una molécula de ADN descrita en la presente, por ejemplo un elemento diana de mts-ARNip o secuencia de ADNc descrita en la presente. Los

métodos para producir dichos fragmentos a partir de una molécula de ADN inicial son conocidos en la técnica.

La eficacia de las modificaciones, duplicaciones, eliminaciones o redistribuciones descritas en la presente en
5 los aspectos de expresión deseados de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir particular, puede ser evaluada empíricamente en ensayos de plantas estables y transitorios, por ejemplo los descritos en los ejemplos de trabajo de la presente, para validar los resultados, los
10 cuales pueden variar dependiendo de los cambios hechos y el objetivo del cambio en la molécula de ADN inicial.

Una diana de mts-ARNip y un elemento diana de mts-ARNip pueden funcionar en cualquier dirección, lo que significa que es no direccional, y como tal se puede utilizar en
15 cualquiera de la orientación 5' a 3' o de la orientación 3' a 5' en una molécula de ADN recombinante o construcción de ADN.

Tal como se utiliza en la presente, "expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir" o
20 "expresión de una proteína" se refiere a la producción de una proteína a partir de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir y la transcripción resultante (ARNm) en una célula. El término "expresión de proteína", por lo tanto, se refiere a cualquier patrón o traducción de una
25 molécula de ARN transcrita en una molécula de proteína. La expresión de proteína puede estar caracterizada por sus

cualidades temporales, espaciales, de desarrollo o morfológicas, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas. En una modalidad, la molécula de ADN recombinante de la invención pueden ser utilizadas para regular selectivamente la expresión de una proteína o molécula de polinucleótido que se puede transcribir en tejidos reproductores masculinos de una planta transgénica. En tal modalidad, la expresión de la molécula de ADN recombinante en una planta transgénica puede provocar la expresión de una molécula de polinucleótido unida operativamente en al menos tejidos vegetativos, pero no en tejidos reproductores masculinos. En determinadas modalidades, dicha regulación de expresión de proteína se refiere a suprimir o reducir; por ejemplo, suprimir o reducir el nivel de proteína producida en una célula, por ejemplo a través de la regulación genética postraducciona mediada por ARNi.

Regulación selectiva de la expresión de proteína, tal como se utiliza en la presente, se refiere a una reducción de producción de proteína en una célula o tejido en comparación con una célula o tejido de referencia en al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 99 % o el 100 % de reducción (es decir, una reducción completa). Una célula o tejido de

referencia puede ser, por ejemplo, una célula o tejido vegetal de la misma planta transgénica o una similar que expresa la proteína o una célula o tejido de una planta transgénica que tiene un transgen similar que codifica la proteína pero carece de un elemento diana de mts-ARNip unido operativamente. La regulación de la expresión de proteína puede ser determinada utilizando cualquier técnica conocida por el experto en la técnica, por ejemplo a través de la medición directa de la acumulación de proteína en una muestra de célula o tejido utilizando una técnica tal como ELISA o análisis de transferencia Western, mediante la medición de la actividad enzimática de la proteína o mediante la determinación fenotípica de la expresión de proteína. En una modalidad, la regulación selectiva de la expresión de proteína se refiere a la reducción suficiente en la expresión de una proteína capaz de conferir tolerancia al herbicida en el tejido masculino de una planta transgénica para producir un fenotipo detectable de fertilidad masculina alterada en una planta transgénica a la cual se aplica herbicida como un aerosol de esterilidad inducida. La detección de fertilidad masculina alterada en dicha planta transgénica, por lo tanto, indica la regulación selectiva de la expresión de proteína.

Tal como se utiliza en la presente, el término "transgen que codifica una proteína recombinante" o "molécula de polinucleótido que se puede transcribir" se refiere a

cualquier molécula de nucleótido capaz de ser transcrita a una molécula de ARN, incluso, entre otros, las que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de polipéptidos. Dependiendo de las condiciones, la secuencia de nucleótidos se puede traducir o no a una molécula de polipéptidos en una célula. Los límites de un transgen o molécula de polinucleótido que se puede transcribir son trazados comúnmente por un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de detención de traducción en el extremo 3'.

El término "transgen" se refiere a una molécula de ADN incorporada artificialmente en el genoma de un organismo o célula hospedadora, en la generación actual o cualquier generación anterior del organismo o célula, como resultado de la intervención humana, por ejemplo a través de métodos de transformación de plantas. Tal como se utiliza en la presente, el término "transgénico" significa que comprende un transgen, por ejemplo una "planta transgénica" se refiere a una planta que comprende un transgen en su genoma y un "rasgo transgénico" se refiere a una característica o fenotipo transportado o conferido por la presencia de un transgen incorporado en el genoma de la planta. Como resultado de dicha alteración genómica, la planta transgénica es algo claramente diferente de la planta salvaje relacionada y el rasgo transgénico es un rasgo que no se encuentra naturalmente en la planta salvaje. Las

plantas transgénicas de la invención comprenden la molécula de ADN recombinante proporcionada por la invención.

Un transgen o molécula de polinucleótido que se puede transcribir de la invención incluye, entre otros, un

5 transgen o molécula de polinucleótido que se puede transcribir que proporciona una característica deseable asociada con la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, propiedades nutricionales, resistencia a enfermedades, resistencia a plagas,
10 tolerancia a herbicidas, tolerancia al estrés, tolerancia al estrés ambiental o tolerancia química de la planta. En una modalidad, una molécula de polinucleótido que se puede transcribir de la invención codifica una proteína que cuando se expresa en una planta transgénica confiere
15 tolerancia a herbicidas al menos en una célula y/o tejido donde se produce la proteína expresada; la regulación selectiva de la proteína de tolerancia a herbicidas en el tejido reproductor masculino de la planta transgénica junto con la aplicación oportuna de herbicida provoca al menos
20 una fertilidad masculina reducida inducida o esterilidad masculina inducida.

Dicha esterilidad masculina inducible combinada con una tolerancia a herbicidas vegetativos se puede utilizar para aumentar la eficiencia con la cual se produce la semilla
25 híbrida, por ejemplo mediante la eliminación o reducción de la necesidad de castrar físicamente la planta de maíz

utilizada como una planta femenina en un cruzamiento determinado durante la producción de semillas híbridas. En la patente estadounidense N.º 6.762.344; la patente estadounidense N.º 8.618.358; y la publicación de patente estadounidense 2013/0007908, por ejemplo, se han descrito sistemas de esterilidad masculina inducibles por herbicidas. Algunos ejemplos de herbicidas útiles para la práctica de la invención incluyen, entre otros, inhibidores de acetil coenzima A carboxilasa (ACCase) (por ejemplo, fops y dims), inhibidores de acetolactato sintasa (ALS) (por ejemplo, sulfonilureas (SU) e imidazolinonas (IMI)), inhibidores de fotosistema II (PSII) (por ejemplo, triazinas y éteres de fenilo), inhibidores de protoporfirinogen oxidasa (PPO) (por ejemplo, flumioxazin y fomesafen), inhibidores de 4-hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD) (por ejemplo, isoxaflutol y tricetonas tal como mesotriona), inhibidores de 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) (por ejemplo, glifosato), inhibidores de glutamina sintasa (GS) (por ejemplo, glufosinato y fosfinotricina), auxinas sintéticas (por ejemplo, 2,4-D y dicamba). Algunos ejemplos de transgenes o moléculas de polinucleótidos que se pueden transcribir para su uso en la práctica de la invención incluyen, entre otros, genes que codifican proteínas que confieren tolerancia a inhibidores de HPPD (por ejemplo HPPD sensible a herbicidas), genes que codifican proteínas

que confieren tolerancia a glufosinato (por ejemplos pat y bar), genes que codifican proteínas que confieren tolerancia a glifosato (por ejemplo un EPSPS tolerante a glifosato, tal como *cp4-epsps*, proporcionado en la presente
5 como SEQ ID NO: 93), y genes que codifican proteínas que confieren tolerancia a una auxina sintética tal como dicamba (por ejemplo dicamba monooxigenasa (DMO)) y 2,4-D (por ejemplo gen (*R*)-diclorprop dioxigenasa (*rdpA*)).

Las construcciones de ADN recombinante de la invención
10 puede incluir las moléculas de ADN recombinante de la invención y se realizan a través de técnicas conocidas en la técnica y en diversas modalidades se incluyen en vectores de transformación de plantas, plásmidos o ADN plástido. Dichas construcciones de ADN recombinante son
15 útiles para producir plantas y/o células transgénicas y, como tal, también pueden estar contenidas en el ADN genómico de una planta, semilla, célula o parte de planta transgénica. Por lo tanto, la presente invención incluye modalidades en donde la construcción de ADN recombinante
20 está ubicada dentro de un vector de transformación de plantas, en una partícula biolística para transformar una célula de planta, dentro de un cromosoma o plástido de una célula de planta transgénica, dentro de una célula transgénica, tejido de planta transgénica, semilla de
25 planta transgénica, grano de polen transgénico o una planta transgénica o parcialmente transgénica (por ejemplo, con

injerto). Un vector es cualquier molécula de ADN que se puede utilizar para el objetivo de transformar la planta, es decir, la introducción de un ADN en una célula. Las construcciones de ADN recombinante de la invención, por ejemplo, pueden insertarse en un vector de transformación de plantas y utilizarse para la transformación de plantas 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, en general, incluyen, entre otros: un promotor adecuado para la expresión de un ADN unido operativamente, una construcción de ADN recombinante unido operativamente y una señal de poliadenilación (que se puede incluir en una secuencia 3'UTR). Los promotores útiles para la práctica de la invención incluyen los que funcionan en una planta para la expresión de un polinucleótido unido operativamente. Dichos promotores son variados y conocidos en la técnica e incluyen los que son inducibles, virales, sintéticos, constitutivos, regulados temporalmente, regulados espacialmente y/o regulados espacio-temporalmente. Algunos componentes opcionales adicionales incluyen, entre otros, una o más de las siguientes dianas: 5' UTR, potenciador, diana que actúa en cis, intrón, secuencia de señal, secuencia de péptido de tránsito y uno o más genes marcadores seleccionables. En una modalidad, un vector de

transformación de plantas comprende una construcción de ADN recombinante.

Las construcciones de ADN recombinante y los vectores de transformación de plantas de la presente invención se
5 realizan a través de cualquier método adecuado para la aplicación pretendida, teniendo en cuenta, por ejemplo, el tipo de expresión deseada, el transgen o molécula de polinucleótido que se puede transcribir, y la conveniencia de su uso en la planta en la cual se expresa la
10 construcción de ADN recombinante. Los métodos generales útiles para manipular moléculas de ADN para realizar y utilizar construcciones de ADN recombinante y vectores de transformación de plantas son conocidos en la técnica y se describen detalladamente, por ejemplo, en guías y manuales
15 de laboratorio que incluyen Michael R. Green y Joseph Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (cuarta edición) ISBN:978-1-936113-42-2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2012).

Las moléculas de ADN recombinante y las construcciones de
20 la invención pueden ser modificadas a través de métodos conocidos en la técnica, ya sea completamente o en parte, por ejemplo, para aumentar la conveniencia de la manipulación de ADN (tal como la restricción de sitios de reconocimiento de enzimas o sitios de clonación basada en
25 recombinación), o para incluir secuencias preferidas de plantas (tal como uso de codón de planta o secuencias de

consenso Kozak) o para incluir secuencias útiles para el diseño de moléculas y construcciones de ADN recombinante (tales como secuencias espaciadoras o enlazadoras). En determinadas modalidades, la secuencia de ADN de la molécula y la construcción de ADN recombinante incluye una secuencia de ADN que se ha optimizado con codones para la planta en la cual se expresa la molécula o la construcción de ADN recombinante. Por ejemplo, una molécula o construcción de ADN recombinante que se expresa en una planta puede optimizar por codones toda su secuencia o partes de esta para la expresión en una planta a través de métodos conocidos en la técnica. Las moléculas o construcciones de ADN recombinante de la invención se pueden apilar con otras moléculas de ADN recombinante o eventos transgénicos para impartir rasgos adicionales (por ejemplo, en el caso de plantas transformadas, los rasgos incluyen resistencia a herbicidas, resistencia a plagas, tolerancia a la germinación fría, tolerancia al déficit de agua) por ejemplo, expresando o regulando otros genes.

Un aspecto de la invención incluye células de plantas transgénicas, tejidos de plantas transgénicas y semillas o plantas transgénicas que incluyen una molécula de ADN recombinante de la invención. Un aspecto adicional de la invención incluye cromosomas de plantas artificiales o recombinantes que incluyen una molécula de ADN recombinante de la invención. Los métodos adecuados para la

transformación de células de plantas hospedadoras para su uso con la presente invención incluyen prácticamente cualquier método a través del cual se puede introducir ADN en una célula (por ejemplo, cuando una molécula de ADN recombinate está integrada en forma estable en un cromosoma de planta) y son conocidos en la técnica. Un método ejemplar y ampliamente utilizado para introducir una molécula de ADN recombinate en plantas es el sistema de *transformación de Agrobacterium*, el cual es conocido por los expertos en la técnica. Otro método ejemplar para introducir una molécula de ADN recombinate en plantas es la inserción de una molécula de ADN recombinate en un genoma de planta en un sitio predeterminado a través de métodos de integración dirigida al sitio. La integración dirigida al sitio se puede lograr a través de cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de nucleasas de dedos de cinc, meganucleasas modificadas genéticamente o naturales, TALE-endonucleasas o una endonucleasa guiada por ARN (por ejemplo un sistema CRISPR/Cas9). Se pueden regenerar plantas transgénicas a partir de una célula de planta transformada a través de métodos de cultivo de células de plantas. Se puede obtener una planta transgénica homocigótica con respecto a un transgen mediante el apareamiento sexual (autofecundación) de una planta transgénica segregante independiente que contiene una única secuencia génica agregada por sí misma,

por ejemplo una planta R0 o F0, para producir semilla R1 o F1. Un cuarto de la semilla R1 o F1 producida es homocigótica con respecto al transgen. Las plantas cultivadas a partir de la germinación de semilla R1 o F1 se puede evaluar para detectar la heterocigocidad, típicamente utilizando un ensayo SNP o un ensayo de amplificación térmica que permite la distinción entre heterocigotas y homocigotas (es decir, un ensayo de cigosidad).

La invención proporciona una planta transgénica que tiene en su genoma una molécula de ADN recombinante de la invención, incluso, sin limitación, alfalfa, algodón, maíz, canola, arroz, soja y trigo, entre otros. La invención también proporciona células de plantas, partes de plantas y progenie de dicha planta transgénica. Tal como se utiliza en la presente, "progenie" incluye cualquier planta, semilla, célula de planta y/o parte de planta producida o regenerada a partir de una planta, semilla, célula de planta y/o parte de planta que incluye una molécula de ADN recombinante de la invención. Las plantas, células, partes, plantas de progenie y semillas transgénicas producidas a partir de dichas plantas pueden ser homocigóticas o heterocigóticas para la molécula de ADN recombinante de la invención. Las partes de plantas de la presente invención pueden incluir, entre otras, hojas, tallos, raíces, semillas, endosperma, óvulo y polen. Las partes de una planta de la invención pueden ser viables, no viables,

regenerables o no regenerables. La invención también incluye y proporciona células de plantas transformadas que comprenden una molécula de ADN de la invención. Las células de plantas transformadas o transgénicas de la invención

5 incluyen células de plantas regenerables y no regenerables. En la presente invención además se incluyen modalidades en donde la molécula de ADN recombinante se encuentra en un producto básico producido a partir de una planta, semilla o parte de planta transgénica de la presente invención;

10 dichos productos básicos incluyen, entre otros, partes cosechadas de una planta, granos molidos o enteros o semillas de una planta, o cualquier alimento o producto que no sea alimento que comprende la molécula de ADN recombinante de la presente invención.

15 La invención proporciona un método para inducir esterilidad masculina en una planta transgénica que comprende (a) cultivar una planta transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga que

20 confiere tolerancia a herbicidas unida operativamente a un elemento diana de mts-ARNip y (b) aplicar una cantidad eficaz del herbicida a la planta transgénica para inducir la esterilidad masculina. Una cantidad eficaz de un herbicida es una cantidad suficiente para hacer que una

25 planta transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante de la invención sea androestéril. En una

modalidad, una cantidad eficaz de glifosato es de entre aproximadamente 0,125 libras de ácido equivalente por acre y aproximadamente 8 libras de ácido equivalente por acre. La aplicación de herbicida se puede aplicar antes o durante
5 el desarrollo del tejido reproductor masculino, por ejemplo en 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 planta de maíz y puede evitar al menos el desarrollo de polen, la diseminación de polen y otra
10 extrusión.

En una modalidad, la prevención del desarrollo de polen, la diseminación de polen y otra extrusión puede resultar de la esterilidad masculina y, por ende, la ausencia de desarrollo de polen, la diseminación de polen y otra
15 extrusión pueden ser una indicación de esterilidad masculina. Sin embargo, en algunos casos, las plantas androestériles pueden seguir desarrollando pequeñas cantidades de polen. Por lo tanto, en determinadas modalidades, la presencia de una pequeña cantidad de polen
20 no indica necesariamente plantas fértiles masculinas o una carencia de esterilidad masculina.

El desarrollo de la planta suele determinarse a escala de etapas en función del desarrollo de la planta. Para el maíz, una escala de desarrollo de planta común utilizada en
25 la técnica es conocida como etapas V. Las etapas V se definen de acuerdo a la hoja superior donde el collar de

hojas es visible. VE corresponde a la aparición, V1 corresponde a la primera hoja, V2 corresponde a la segunda hoja, V3 corresponde a la tercera hoja, V(n) corresponde a la enésima hoja. VT se produce cuando la última rama de la borla es visible pero antes de la aparición de los estigmas. Cuando se organiza un campo de maíz, cada etapa V específica se define solamente cuando el 50 por ciento o más de las plantas en el campo se encuentran en esa etapa o más allá de esta. Otras escalas de desarrollo son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden utilizar con los métodos de la invención.

Otra herramienta común para predecir y estimar etapas de crecimiento y desarrollo de maíz son las unidades de grado de crecimiento (GDU). Un factor en el crecimiento y desarrollo de maíz es el calor. El calor se mide típicamente en un único momento y se expresa como temperatura, pero también se puede medir a través de un período y se puede expresar como unidades de calor. Estas unidades de calor se denominan comúnmente GDU. Las GDU pueden ser definidas como la diferencia entre la temperatura diaria promedio y una temperatura base seleccionada sujeta a determinadas restricciones. Las GDU se calculan utilizando la siguiente ecuación: Unidad de grado de crecimiento = $\{ (H + L) / 2 \} - B$ donde H es la alta diaria (pero superior a 86 °F), L es la baja diaria (pero no inferior a 50 °F) y B es la base de 50 °F. Debido

a que el crecimiento de maíz es menor cuando las temperaturas son superiores a 86 °F o inferiores a 50 °F, los límites se establecen en las temperaturas alta diaria y baja diaria utilizadas en la fórmula. El corte inferior para la temperatura diaria también evita el cálculo de valores negativos. Por lo tanto, si la temperatura alta diaria supera 86 °F, la temperatura baja diaria utilizada en la fórmula de GDU se establece a 86 °F. Por el contrario, si la temperatura baja diaria cae por debajo de 50 °F, la temperatura baja diaria utilizada en la fórmula de GDU se establece a 50 °F. Si la temperatura alta diaria no supera 50 °F, no se registra ninguna GDU para ese día. La GDU máxima que una planta de maíz puede acumular en un día es 36, la mínima es cero. La clasificación de madurez de una planta de maíz se identifica por la suma de los valores de GDU diarios durante un lapso de tiempo especificado. El período que la mayoría de los productores de semilla de maíz utiliza es desde el momento de plantación hasta la madurez fisiológica o el momento en el cual el llenado de grano está prácticamente completo. En la mayoría de los estados de Estados Unidos, por ejemplo, las GDU acumuladas se mantienen para la mayoría de las zonas geográficas y se encuentran disponibles en USDA Crop Reporting Service o State Extension Services. Adicionalmente, un instrumento para obtener información de GDU en una ubicación particular también se describe en la

patente estadounidense N.º 6.967.656, la cual se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

Otro método para predecir el desarrollo de borla para la determinación del tiempo de aplicación de herbicida que induce la esterilidad masculina se describe en la patente estadounidense N.º 8.618.358, la cual se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

Los herbicidas para su uso con la invención incluyen cualquier herbicida, incluso los activos contra acetil coenzima A carboxilasa (ACCase), inhibidores de acetolactato sintasa (ALS), inhibidores de fotosistema II (PSII), inhibidores de protoporfirinogen oxidasa (PPO), inhibidores de 4-hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD), inhibidores de 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS), inhibidores de glutamina sintetasa (GS) y auxinas sintéticas. Los herbicidas son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en "Modern Crop Protection Compounds, volumen 1 (segunda edición), editado por Wolfgang Krämer, Ulrich Schirmer, Peter Jeschke, Matthias Witschel, ISBN: 9783527329656, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Alemania (2012). En una modalidad, el herbicida es glifosato.

Se puede producir una semilla híbrida a través del uso de un método que comprende (a) aplicar herbicida a una planta transgénica que incluye una molécula de ADN recombinante que incluye una molécula de polinucleótido que se puede

transcribir heterólogo que confiere tolerancia al herbicida unida operativamente a un elemento diana de mts-ARNip, en donde la aplicación de herbicida se lleva a cabo durante el desarrollo del tejido reproductor masculino de la planta transgénica, induciendo así la esterilidad masculina en la planta transgénica; (b) fertilizar la planta transgénica con polen de una segunda planta; y (c) cosechar semilla híbrida de la planta transgénica. En una modalidad, la planta transgénica es maíz. En una modalidad, el herbicida es glifosato y la proteína codificada por la molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga es una EPSPS tolerante al glifosato. En una modalidad, el glifosato se aplica durante el desarrollo en una cantidad eficaz de aproximadamente 0,125 libras de ácido equivalente por acre y aproximadamente 8 libras de ácido equivalente por acre. En otra modalidad, la etapa de fertilización se puede lograr permitiendo una fertilización natural, por ejemplo a través de polinización por el viento, o puede incluir polinización mecánica o manual.

Se puede cosechar una semilla híbrida de una planta transgénica androestéril que se ha fertilizado con polen a partir de una segunda planta, en donde la planta transgénica androestéril comprende una molécula de ADN recombinante que incluye un polinucleótido que se puede transcribir heterólogo que confiere tolerancia al herbicida unido operativamente a un elemento diana de mts-ARNip, y en

donde la planta transgénica se ha inducido para ser androestéril mediante la aplicación de una cantidad eficaz de herbicida durante el desarrollo del tejido reproductor masculino. En un ejemplo, el herbicida es glifosato y se aplica durante el desarrollo a una cantidad eficaz de entre aproximadamente 0,125 libras de ácido equivalente por acre y aproximadamente 8 libras de ácido equivalente por acre y evita al menos el desarrollo de polen, la diseminación de polen u otra extrusión.

10

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos describen mejoras a la producción de semillas híbridas sobre la proporcionada en la técnica. Dichas mejoras incluyen dianas de mts-ARNip novedosas y elementos diana de mts-ARNip para utilizar en las moléculas de ADN recombinante y las plantas transgénicas para proporcionar detención del desarrollo del polen en etapa temprana, lo que produce la ausencia de granos de polen viables en una amplia gama de germoplasma y los métodos de uso relacionados. Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar las modalidades de la invención.

20

Ejemplo 1: identificación de dianas de mts-ARNip

Se aisló ARN pequeño de cuatro etapas de crecimiento separadas de borla de maíz y tres etapas de crecimiento separadas de mazorca de maíz. Véase la tabla 1. Se aisló el ARN pequeño enriquecido por la borla en etapas del

25

desarrollo de la borla muy tempranas (V7, V8/V9, V10/V11 y V12) (véase la figura 1). Esto produjo ARN pequeño de tejidos de macho más jóvenes de los utilizados anteriormente en la técnica para obtener secuencias de ARN pequeñas enriquecidas por la borla.

Se prepararon genotecas de ARN pequeño utilizando el ARN pequeño aislado y se realizó secuenciamiento de ARN pequeño de alto rendimiento a las genotecas. Se utilizó análisis bioinformático para comparar las secuencias en estas genotecas de borlas y mazorcas con las secuencias en las genotecas de ARN pequeño preparadas a partir de otros tejidos de maíz, incluidas hojas recolectadas en diversas etapas de crecimiento, plántula completa, raíz recolectada en diversas etapas del crecimiento, endosperma y semilla. Este análisis bioinformático diferencial identificó miles de secuencias de ARN pequeño enriquecidas con borlas con expresión normalizada en el intervalo de 10 a 665 transcripciones por cuarto de millón (tpq). Las secuencias de ARN pequeño enriquecidas con borla identificadas son, probablemente, ARNip debido a su longitud (18-26 nucleótidos) y su origen esperado a partir de un precursor de ARNcd. Debido a la especificidad del tejido de macho, estos ARN pequeños enriquecidos con borla se denominan en la presente como ARNip específico de tejido de macho (mts-ARNip).

Tabla 1. Descripción de genotecas de ARN pequeño de borla y

mazorca

	Etapa de borla/mazorca	Tamaño de borla/mazorca
	Borla en etapa de célula madre de microespora (planta en V7-V8)	<1 cm
	Borla en etapa de célula madre de microespora-premeiosis (planta en V8-V9)	1-3 cm
	Borla en meiosis temprana - etapa libre de microesporas (planta en V9-V10)	3-17 cm
	Borla en etapa tardía - microesporas de uninucleato (planta en V12- VT)	>17 cm
5	Mazorca en premieosis- etapa de saco embrionario inmaduro de cuatro nucleatos (planta en VT)	2-3 cm
	Mazorca en etapa de saco embrionario inmaduro de 8 nucleatos a etapa posterior con hasta 10 células antipodales (planta en VT)	4-5 cm
	Mazorca en la etapa de polinización (planta en VT-R1)	9-10 cm

10 Se utilizó un método de PCR en tiempo real para la identificación y la confirmación de que las secuencias de mts-ARNip se expresaron específicamente en la borla. El ARN total, incluido el ARN pequeño enriquecido, se extrajo de los tejidos indicados en la tabla 1 y se utilizó para

15 sintetizar el ADNc con cebadores de transcripción inversa que consistían en 8 nt complementarios a las secuencias de mts-ARNip en el extremo 3' y una secuencia universal de 35 nt en el extremo 5'. Después de la síntesis de ADNc, se realizó PCR en tiempo real en donde la secuencia (14 a 18

20 nt) de uno de los cebadores directos fue idéntica al extremo 5' de una secuencia de mts-ARNip y el cebador inverso fue un cebador universal. Como control interno, se amplificó ARN 18S y se utilizó para normalizar los niveles de mts-ARNip. Los datos de la PCR en tiempo real se

25 utilizaron para limitar la cantidad de secuencias de mts-ARNip que se enriquecieron en la borla.

Se realizó un ensayo de micromatriz de perfil de ARNip utilizando chips μ Paraflo® Microfluidics proporcionados por LC Sciences LLC (Houston, Texas, EUA) con 1.200 secuencias seleccionadas de las miles de secuencias de mts-ARNip identificadas a partir del análisis bioinformático diferencial. Los chips de micromatriz contenían sondas triplicadas de la secuencia complementaria para cada una de las 1.200 secuencias de mts-ARNip. Se purificó el ARN total a partir de 26 grupos de tejido de maíz (grupos de tejido duplicados o triplicados) de las plantas endogámicas LH244 (número de depósito de ATCC PTA-1173) o 01DKD2 (I294213) (número de depósito de ATCC PTA-7859). Véase la tabla 2. Se hibridó cada una de las 26 muestras de ARN con los chips de micromatriz que contenían sondas para las 1.200 mts-ARNip. Se recogieron imágenes de hibridación utilizando un escáner láser GenePix® 4000B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y se digitalizaron utilizando el software de análisis de imágenes Array-Pro® Analyzer (Media Cybernetics, Rockville, MD). Se derivaron valores de señales relativos mediante sustracción de fondo y normalización. Se determinaron las señales expresadas diferencialmente mediante prueba t con $p < 0,05$. A partir del análisis de micromatriz, aproximadamente 500 mts-ARNip de las 1.200 se identificaron como altamente específicos de borla.

Tabla 2. Descripción de las muestras de tejido utilizadas en el ensayo de micromatriz.

	Número de chip	Genotipo	Tipo de tejido	Muestras agrupadas a partir de 3 plantas	Etapa
5	1	LH244	Mazorca más joven	<5 cm agrupado	VT
	2	LH244	Mazorca mayor	>5 cm agrupado	VT-R1
	3	LH244	Borla más joven	2-7 cm agrupado	V8-V9
	4	LH244	Borla mayor	>7 cm agrupado	V10-V12
	5	LH244	hoja	V4 agrupado	V4
10	6	LH244	hoja	V12 agrupado	V12
	7	LH244	raíz	V4 agrupado	V4
	8	LH244	tallo	V4 agrupado	V4
	9	LH244	Mazorca más joven	<5 cm agrupado	VT
	10	LH244	Mazorca mayor	>5 cm agrupado	VT-R1
	11	LH244	Borla más joven	2-7 cm agrupado	V8-V9
	12	LH244	Borla mayor	>7 cm agrupado	V10-V12
	13	LH244	hoja	V4 agrupado	V4
	14	LH244	hoja	V12 agrupado	V12
	15	LH244	raíz	V4 agrupado	V4
15	16	LH244	raíz	V4 agrupado	V4
	17	Ø1DKD2	Mazorca más joven	<5 cm agrupado	VT
	18	Ø1DKD2	Mazorca mayor	>5 cm agrupado	VT-R1
	19	Ø1DKD2	Mazorca mayor	>5 cm agrupado	VT-R1
	20	Ø1DKD2	Borla más joven	2-7 cm agrupado	V8-V9
	21	Ø1DKD2	Borla más joven	2-7 cm agrupado	V8-V9
	22	Ø1DKD2	Borla mayor	>7 cm agrupado	V10-V12
	23	Ø1DKD2	Borla mayor	>7 cm agrupado	V10-V12
	24	Ø1DKD2	Hoja	V4 agrupado	V4
	25	LH244	hoja	V4 agrupado	V4
	26	LH244	hoja	V12 agrupado	V12

Después se realizó el análisis bioinformático utilizando herramientas de alineamiento de secuencia como Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) o SHort Read Mapping Package (SHRiMP) (Rumble, 2009) para comparar las 500 secuencias de mts-ARNip identificadas como altamente específicas de borla contra una recolección de unigenes de secuencias de ADNc de maíz. Este análisis BLAST reveló secuencias de ADNc de maíz con las cuales muchas secuencias de mts-ARNip se alinearon, lo que produjo regiones de secuencias de ADN identificables

que tienen alineamientos agrupados, superpuestos de múltiples secuencias de mts-ARNip con coincidencias perfectas o casi perfectas. Se identificaron seis secuencias de ADNc a partir de este análisis como que

5 contenían una o más de dichas regiones ricas en secuencias diana de mts-ARNip. Estas seis secuencias de ADNc se proporcionan en la presente como SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22. Como un ejemplo, la figura 2 muestra una

10 representación gráfica del alineamiento de múltiples secuencias de mts-ARNip en el ADNc proporcionado como SEQ ID NO: 17. Las múltiples líneas cortas representan la posición relativa de las secuencias diana de mts-ARNip (y, por ende, la ubicación del sitio de unión para el mts-ARNip

15 en la molécula de ARNm transcrita) que se alinean con el ADNc. El eje Y representa los niveles de expresión normalizados del mts-ARNip en los tejidos de machos según lo detectado en el análisis de micromatriz. La casilla representa la región de ADNc SEQ ID NO: 17 correspondiente

20 a las secuencias del elemento diana de mts-ARNip SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

Se utilizaron secuencias de mts-ARNip seleccionadas que se alinean con una de las seis secuencias de ADNc para otros análisis de micromatriz para determinar la expresión

25 diferencial en los tejidos de maíz. Los análisis de micromatriz para las secuencias de mts-ARNip de los valores

de señal normalizados para la borla de V8-V9, borla de V10-V12 o las señales combinadas de los otros tejidos para el germoplasma de maíz LH244 y 01DKD2 se presentan en las tablas 3-10. Cada tabla muestra un subconjunto de

5 secuencias de mts-ARNip identificadas como que se alinean con una de las seis secuencias de ADNc proporcionadas en la presente como SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22. Los resultados de los valores de señal se miden como valores de

10 señal relativa y el error estándar ($p < 0,05$) está representado por (STDR). Los resultados de la micromatriz ilustran que las secuencias de mts-ARNip representativas dan una señal alta en la borla (V8-V9 y V10-V12) y una señal baja en otros tejidos, lo que indica que la expresión

15 endógena de estos mts-ARNip está altamente enriquecida en la borla. La secuencia de mts-ARNip corresponde a la cadena sentido o antisentido de la secuencia diana de mts-ARNip correspondiente en la secuencia de ADNc. La secuencia de mts-ARNip puede tener un error de apareamiento de

20 nucleótido único, de dos nucleótidos o de tres nucleótidos con la parte alineada de la secuencia de ADNc y la secuencia de mts-ARNip se puede alinear con la cadena sentido de SEQ o antisentido de la secuencia de ADNc. Las secuencias de mts-ARNip proporcionadas en la presente se

25 encuentran en diferentes germoplasmas de maíz.

La tabla 3 muestra resultados de señales de micromatriz

relativos para secuencias de mts-ARNip representativas (proporcionadas en la presente como SEQ ID NO: 23 – 31) que se alinean con la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 17, que contiene las secuencias del elemento diana de mts-ARNip representadas por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Para los germoplasmas LH244 y 01DKD2, las señales para estas secuencias de mts-ARNip en la borla de V8-V9 y la borla de V10-V12 son mayores que la señal para estas secuencias de mts-ARNip para las muestras de otros tejidos. Los resultados de micromatriz que se muestran en la tabla 3 indican que la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 17 se puede utilizar como una fuente para diseñar elementos diana de mts-ARNip para las moléculas de ADN recombinante.

Tabla 3. Resultados de micromatriz para ADNc de SEQ ID NO: 17

SEQ ID NO:	LH244			01DKD2		
	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)
23	183,5 (36,9)	514 (105,2)	2,6 (0,6)	27 (2)	318 (46,5)	4,3 (1,5)
24	104,5 (40,9)	322 (77,5)	7,7 (3,5)	16 (1)	174 (32,3)	3 (0,7)
25	289 (99)	824,3 (146,6)	2,6 (0,7)	56 (9,1)	440 (14,1)	2,3 (1,1)
26	55,5 (4,5)	175,7 (41,2)	3,8 (1,1)	10 (7,1)	104 (26,3)	3,8 (1,8)
27	377,5 (60,1)	581,7 (76,8)	1,1 (0,3)	73 (10,1)	405,5 (3,5)	1 (0,4)
28	126,5 (32,8)	248 (46,1)	2,4 (1,4)	29 (11,1)	134,5 (31,8)	3,8 (1)
29	292,5 (25,8)	886,7 (99,7)	2,2 (0,7)	86 (11,1)	535,5 (20,7)	4 (1,2)
30	173,5 (52)	495,7 (80,9)	4,2 (1,1)	32 (1)	282 (20,2)	6,5 (1,9)
31	8 (3)	49 (15,8)	1,2 (0,4)	0 (0)	26,5 (6,6)	2,8 (0,6)

La tabla 4 muestra resultados de señales de micromatriz relativos para secuencias de mts-ARNip representativas (proporcionadas en la presente como SEQ ID N0: 32 – 38) que se alinean con la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID N0: 18, que contiene la secuencia del elemento diana de mts-ARNip representada por SEQ ID N0: 3. Para el germoplasma LH244, las señales para estas secuencias de mts-ARNip en la borla de V8-V9 y la borla de V10-V12 son mayores que las señales para estas secuencias de mts-ARNip para las muestras de otros tejidos. Para el germoplasma 01DKD2, las señales para estas secuencias de mts-ARNip son mayores en la borla de V10-V12 que las señales para estas secuencias de mts-ARNip para la borla de V8-V9 o las muestras de otros tejidos.

Tabla 4. Resultados de micromatriz para ADNc de SEQ ID N0: 18

	LH244			01DKD2		
SEQ ID N0:	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)
32	376,5 (320,7)	118 (30,8)	2 (0,6)	7,5 (3,5)	516 (307,1)	2,8 (0,9)
33	111,5 (12,6)	1032,7 (26,8)	17,8 (13,1)	4,5 (2,5)	648,5 (174,3)	2,8 (1)
34	848,5 (675,3)	572,7 (211,3)	3 (0,6)	8,5 (0,5)	982 (389,9)	3,5 (1,3)
35	437 (370,7)	117,7 (22,8)	1,6 (0,6)	4 (3)	519 (319,2)	2,8 (0,5)
36	906,5 (668,2)	606,7 (231,5)	2,2 (0,7)	15,5 (1,5)	1225,5 (480,3)	4,3 (1,5)
37	554 (370,7)	553 (48,5)	1,5 (0,4)	9,5 (1,5)	1224,5 (153)	3,3 (1,4)
38	768,5 (480,3)	1442,7 (17,2)	1,4 (0,5)	8,5 (2,5)	1305,5 (10,6)	3 (1,5)

La tabla 5 muestra resultados de señales de micromatriz relativos para secuencias de mts-ARNip representativas (proporcionadas en la presente como SEQ ID NO: 39 – 42) que se alinean con la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 18, que contiene la secuencia del elemento diana de mts-ARNip representada por SEQ ID NO: 4. Para el germoplasma LH244, las señales para las secuencias de mts-ARNip en la borla de V8-V9 y la borla de V10-V12 son mayores que la señal para estas secuencias de mts-ARNip para las muestras de otros tejidos. Para el germoplasma 01DKD2, las señales para las secuencias de mts-ARNip son mayores en la borla de V10-V12 que la señal para estas secuencias de mts-ARNip para la borla de V8-V9 o las muestras de otros tejidos. Los resultados de micromatriz que se muestran en la tabla 4 y la tabla 5 indican que la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 18 se puede utilizar como una fuente para diseñar elementos diana de mts-ARNip para las moléculas de ADN recombinante.

Tabla 5. Resultados de micromatriz para ADNc de SEQ ID N0:
18

	LH244			01DKD2		
SEQ ID N0:	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)
39	442,5 (242,9)	2157,3 (1059,3)	0,6 (0,2)	16 (12,1)	1514,5 (525,8)	1,5 (1,5)
40	119 (2)	448,7 (125,1)	1,5 (0,5)	7,5 (0,5)	452 (97)	2,8 (0,9)
41	185,5 (19,7)	702,7 (195,2)	0,9 (0,3)	5 (1)	752 (225,3)	3 (1,5)
42	143,5 (7,6)	564,3 (154,3)	2,6 (0,8)	6 (1)	588 (163,6)	5,3 (1,5)

10 La tabla 6 muestra resultados de señales de micromatriz
relativos para secuencias de mts-ARNip representativas
(proporcionadas en la presente como SEQ ID N0: 43 - 46) que
se alinean con la secuencia de ADNc proporcionada en la
presente como SEQ ID N0: 19, que contiene la secuencia del
15 elemento diana de mts-ARNip representada por SEQ ID N0: 5.
Para el germoplasma LH244, las señales para las secuencias
de mts-ARNip en la borla de V8-V9 y la borla de V10-V12 son
mayores que la señal para estas secuencias de mts-ARNip
para las muestras de otros tejidos. Para el germoplasma
20 01DKD2, la señal para las secuencias de mts-ARNip (SEQ ID
N0: 43 - 44) es mayor en la borla de V10-V12 que la señal
para estas secuencias de mts-ARNip para la borla de V8-V9 o
las muestras de otros tejidos; y las señales para las
secuencias de mts-ARNip (SEQ ID N0: 45 - 46) son mayores
25 que la señal para estas secuencias de mts-ARNip en la borla
de V8-V9 y la borla de V10-V12 en comparación con la

muestra de otro tejido.

Tabla 6. Resultados de micromatriz para ADNc de SEQ ID N0: 19

SEQ ID N0:	LH244			01DKD2		
	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)
43	52,5 (29,8)	147,3 (13,2)	1 (0,3)	4 (0)	190,5 (2,5)	4,3 (2,4)
44	756 (548,5)	1340 (75)	1,8 (0,5)	15,5 (1,5)	1443,5 (85,4)	6,3 (1,7)
45	7901 (1803,1)	9982,3 (2999)	8,2 (5,4)	253 (11,1)	7195,5 (759,1)	5,8 (4,1)
46	4502,5 (424,8)	8663,3 (1595,4)	8,4 (6,2)	252 (9,1)	6778 (124,2)	6,8 (3,8)

La tabla 7 muestra resultados de señales de micromatriz relativos para secuencias de mts-ARNip representativas (proporcionadas en la presente como SEQ ID N0:47 - 52) que se alinean con la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID N0:19, que contiene la secuencia del elemento diana de mts-ARNip representada por SEQ ID N0:6. Para el germoplasma LH244, las señales para las secuencias de mts-ARNip en la borla de V8-V9 y la borla de V10-V12 son mayores que la señal para estas secuencias de mts-ARNip para las muestras de otros tejidos. Para el germoplasma 01DKD2, las señales para las secuencias de mts-ARNip son mayores en la borla de V10-V12 que la señal para estas secuencias de mts-ARNip en la borla de V8-V9 o las muestras de otros tejidos; las señales para las secuencias de mts-ARNip (SEQ ID N0:47 y SEQ ID N0: 48) son moderadamente

mayores en la borla de V8-V9 en comparación con la señal para estas secuencias de mts-ARNip para la otra muestra de tejido; la señal para la secuencia de mts-ARNip (SEQ ID NO: 52) es significativamente mayor en la borla de V8-V9 en comparación con la señal para esta secuencia de mts-ARNip para la muestra de otro tejido; y las señales para las secuencias de mts-ARNip (SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51) no son significativamente diferentes de la señal para estas secuencias de mts-ARNip para las muestras de otros tejidos. Los resultados de micromatriz que se muestran en la tabla 6 y la tabla 7 indican que la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 19 se puede utilizar como una fuente para diseñar elementos diana de mts-ARNip para las moléculas de ADN recombinante.

Tabla 7. Resultados de micromatriz para ADNc de SEQ ID NO: 19

	LH244			01DKD2		
SEQ ID NO:	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)
47	157,5 (5,6)	900,7 (51,8)	15,5 (7,4)	12,5 (1,5)	1051,5 (199,5)	4 (0,7)
48	221 (106,1)	720,3 (251,7)	4,8 (2,7)	9,5 (6,6)	470,5 (57,1)	1 (0,4)
49	340 (239,4)	1241,7 (105,7)	16,3 (5,4)	57,5 (10,6)	867 (117,2)	55,3 (11,6)
50	296 (228,3)	722 (267,2)	0 (0)	5,5 (5,6)	326 (262,6)	1,8 (1,8)
51	158 (78,8)	287 (46)	34,3 (6,5)	24,5 (0,5)	275,5 (20,7)	40 (3,1)
52	4080 (1829,4)	3629,7 (1327,5)	5,5 (3,5)	234 (11,1)	3286,5 (33,8)	3,5 (2,1)

La tabla 8 muestra resultados de señales de micromatriz relativos para secuencias de mts-ARNip representativas (proporcionadas en la presente como SEQ ID N0: 53 – 60) que se alinean con la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID N0: 20, que contiene la secuencia del elemento diana de mts-ARNip representada por SEQ ID N0: 7. Para los germoplasmas LH244 y 01DKD2, las señales para estas secuencias de mts-ARNip en la borla de V8-V9 y la borla de V10-V12 son mayores que la señal para estas secuencias de mts-ARNip para las muestras de otros tejidos. Los resultados de micromatriz que se muestran en la tabla 8 indican que la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID N0: 20 se puede utilizar como una fuente para diseñar elementos diana de mts-ARNip para las moléculas de ADN recombinante.

Tabla 8. Resultados de micromatriz para ADNc de SEQ ID N0: 20

SEQ ID N0:	LH244			01DKD2		
	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)
53	76,5 (1,5)	145 (19,4)	2,2 (0,8)	16 (2)	84 (1)	1,5 (0,5)
54	100,5 (3,5)	172 (21,6)	14,2 (6,2)	56 (22,2)	231 (79,8)	19,5 (4,7)
55	377,5 (60,1)	581,7 (76,8)	1,1 (0,3)	73 (10,1)	405,5 (3,5)	1 (0,4)
56	261 (1)	692 (59,7)	49,5 (30,4)	138,5 (29,8)	599,5 (41,9)	19,3 (4,8)
57	126,5 (32,8)	248 (46,1)	2,4 (1,4)	29 (11,1)	134,5 (31,8)	3,8 (1)
58	215,5 (14,6)	349 (29,1)	0,7 (0,3)	88,5 (2,5)	327 (31,3)	2 (0,9)
59	789 (97)	1262,7 (169,2)	4,1 (2,6)	202 (24,2)	811,5 (115,7)	0,3 (0,3)
60	141,5 (9,6)	265,7 (30,1)	5,8 (1,2)	75,5 (5,6)	303 (37,4)	9,3 (1,8)

La tabla 9 muestra resultados de señales de micromatriz relativos para secuencias de mts-ARNip representativas (proporcionadas en la presente como SEQ ID N0: 61 – 69) que se alinean con la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID N0: 21, que contiene la secuencia del elemento diana de mts-ARNip representada por SEQ ID N0: 8. Para los germoplasmas LH244 y 01DKD2, las señales para las secuencias de mts-ARNip en la borla de V8-V9 y la borla de V10-V12 son mayores que la señal para estas secuencias de mts-ARNip para las muestras de otros tejidos. Los resultados de micromatriz que se muestran en la tabla 9 indican que la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID N0: 21 se puede utilizar como una fuente para diseñar elementos diana de mts-ARNip para las moléculas de ADN recombinante.

Tabla 9. Resultados de micromatriz para ADNc de SEQ ID N0:

SEQ ID N0:	LH244			01DKD2		
	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)
61	850,5 (8,6)	334,7 (222,3)	9,4 (3,4)	461 (154,6)	454 (1)	8 (5)
62	44,5 (5,6)	11,3 (3,9)	1,8 (0,7)	13,5 (5,6)	15,5 (6,6)	1 (1)
63	34,5 (4,5)	11,7 (2,2)	3,2 (1)	14,5 (1,5)	18 (1)	1,5 (0,5)
64	23 (8,1)	13,7 (4,6)	1,8 (1)	13,5 (13,6)	9 (8,1)	1,3 (0,9)
65	811,5 (169,2)	260,3 (103,2)	5,8 (2,7)	444,5 (4,5)	454,5 (45)	12 (8,4)
66	199,5 (54)	48 (20,6)	1,9 (0,7)	61 (44,4)	55,5 (34,9)	2,8 (1,8)
67	216 (18,2)	62 (16,6)	3,3 (2)	123,5 (0,5)	107 (17,2)	4,3 (2,6)
68	265 (86,9)	85,3 (20,4)	5 (2,3)	98 (62,6)	96 (56,6)	2,5 (2,2)
69	516 (82,8)	185 (82,1)	11,2 (4,1)	309,5 (19,7)	282,5 (2,5)	9,8 (5,5)

La tabla 10 muestra resultados de señales de micromatriz relativos para secuencias de mts-ARNip representativas (proporcionadas en la presente como SEQ ID NO: 70 - 87) que se alinean con la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 22, que contiene la secuencia del elemento diana de mts-ARNip representada por SEQ ID NO: 9. Para el germoplasma LH244, las señales para las secuencias de mts-ARNip (SEQ ID NO: 70, 71, 73, 75 - 81, 83-87) en la borla de V8-V9 y la borla de V10-V12 son mayores que la señal para estas secuencias de mts-ARNip para las muestras de otros tejidos; y las señales para las secuencias de mts-ARNip (SEQ ID NO: 72, 74, 82) en otro tejido fue mayor que la señal para estas secuencias de mts-ARNip en la borla de V8-V9 o la borla de V10-V12. Para el germoplasma 01DKD2, las señales para las secuencias de mts-ARNip (SEQ ID NO: 70 - 87) son mayores en la borla de V10-V12 que la señal para estas secuencias de mts-ARNip en la borla de V8-V9 o las muestras de otros tejidos. Los resultados de micromatriz que se muestran en la tabla 10 indican que la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 22 se puede utilizar como una fuente para diseñar elementos diana de mts-ARNip para las moléculas de ADN recombinante.

Tabla 10. Resultados de micromatriz para ADNc de SEQ ID N0:
22

		LH244			01DKD2		
	EQ ID N0:	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)	Borla de V8-V9 (STDR)	Borla de V10-V12 (STDR)	Otro tejido (STDR)
5	70	56,5 (23,7)	694 (256,9)	1,8 (0,4)	3 (3)	873 (308,1)	4 (1,5)
	71	1125,5 (383,4)	2380 (696,9)	1,6 (0,5)	46 (0)	1943,5 (447)	2,3 (1,3)
	72	323,5 (54)	325,7 (55,9)	1324,8 (1083,3)	332,5 (83,3)	530 (89,9)	233,3 (16,5)
	73	1058,5 (370,2)	2395,7 (634,9)	4,5 (1,8)	37,5 (2,5)	1695,5 (380,3)	2 (1,4)
	74	83,5 (20,7)	129 (11,2)	164,2 (106,5)	43,5 (0,5)	171 (19,2)	45,8 (4,5)
10	75	53 (34,3)	237,3 (62,1)	3,3 (0,5)	3 (1)	257 (74,8)	5 (1,8)
	76	55 (38,4)	252,3 (66,5)	5,7 (1)	2,5 (0,5)	276,5 (81,3)	4 (1,4)
	77	180,5 (64,1)	302,7 (111,2)	4,1 (2,3)	0,5 (0,5)	225 (30,3)	2,5 (0,6)
	78	47,5 (15,7)	642,7 (242)	1 (0,4)	3 (2)	715,5 (211,6)	4,5 (1)
	79	197,5 (62,1)	269,3 (106,8)	1,9 (0,6)	5 (1)	290,5 (28,8)	2 (0,4)
15	80	138 (83,8)	383,3 (44,6)	0,7 (0,3)	2,5 (1,5)	230 (43,4)	0,5 (0,3)
	81	207 (113,1)	470,3 (55,2)	1,6 (1,1)	1 (1)	320 (69,7)	0 (0)
	82	95,5 (29,8)	137 (17,7)	217,4 (158,6)	71,5 (7,6)	211 (14,1)	54,8 (5,1)
	83	173 (63,6)	303 (82)	2,5 (1,2)	2 (1)	253,5 (24,7)	1,5 (0,6)
	84	13 (5,1)	35,7 (7,1)	4,4 (1,5)	0 (0)	20 (10,1)	1 (0,4)
15	85	184 (71,7)	310 (109,1)	2,8 (1,3)	2,5 (0,5)	246 (14,1)	2,5 (1)
	86	173,5 (62,1)	241,7 (101,2)	2,4 (0,7)	3 (1)	256,5 (7,6)	3 (0,9)
	87	56 (35,4)	104 (12,7)	4,7 (2)	2,5 (0,5)	91,5 (6,6)	2,5 (1)

Estos análisis confirmaron que las seis secuencias de ADNc (SEQ ID N0: 17 - 22) eran ricas en las secuencias diana de mts-ARNip y que el mts-ARNip correspondiente mostró especificidad de borla alta. Por lo tanto, estas secuencias de ADNc contienen secuencias útiles con los métodos de la biología molecular para crear moléculas de ADN recombinante que contienen elementos diana de mts-ARNip que pueden conferir silenciamiento de transgenes mediado por mts-ARNip.

Se realizó un análisis de la secuencia genómica

correspondiente que contenía los elementos diana de mts-ARNip para treinta y dos germoplasmas de maíz diferentes (con una madurez relativa (RM) en el intervalo de 80 y 120 días), típicamente, utilizada como una hembra en un

5 cruzamiento híbrido para confirmar la presencia y cualquier variación de secuencia de los elementos diana de mts-ARNip. Para los elementos diana de mts-ARNip proporcionados como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, se diseñaron tres conjuntos de pares de cebadores de amplificación térmica para amplificar

10 la secuencia correspondiente dentro de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 17. Estos cebadores se utilizaron para generar un amplicón de PCR en el ADN genómico extraído del tejido de cada germoplasma. Se produjeron amplicones a partir de todos los germoplasmas

15 evaluados. La secuencia del amplicón en los treinta y dos germoplasmas fue o bien 100 % idéntica a la secuencia del elemento diana de mts-ARNip o contenía una cantidad mínima de polimorfismos de nucleótido único (hasta una identidad del 95 %). Estos datos indican que las plantas transgénicas

20 generadas con una construcción de ADN recombinante que comprende un transgen codificante de una proteína recombinante unida operativamente a un elemento diana de mts-ARNip proporcionado como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 tendrían regulación específica de tejido de macho de la

25 expresión de la proteína recombinante en la mayoría de los germoplasmas de maíz. Si el transgen codifica una proteína

recombinante que confiere tolerancia al glifosato, entonces las borlas en la mayoría de los germoplasmas de maíz tendrían esterilidad masculina inducida por glifosato.

Ejemplo 2: construcciones de ADN recombinante y vectores de transformación de plantas

Se crearon construcciones de ADN recombinante y vectores de transformación de plantas utilizando las secuencias de ADN correspondientes a las regiones de las seis secuencias de ADNc identificadas como ricas en las secuencias diana de mts-ARNip. Las construcciones de ADN recombinante y los vectores de transformación de plantas se diseñaron para ser útiles para producir plantas transgénicas en las cuales el silenciamiento específico de borla de un transgen unido operativamente a un elemento diana de mts-ARNip se produce mediante el silenciamiento mediado por mts-ARNip.

Se diseñaron nueve elementos diana de mts-ARNip utilizando los resultados de los análisis de las seis secuencias de ADNc. Se diseñó cada elemento diana de mts-ARNip de modo que tuviera una secuencia de ADN que comprenda muchas secuencias diana de mts-ARNip superpuestas a las cuales se pueden unir diferentes mts-ARNip. La secuencia del elemento diana de mts-ARNip proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 1 tiene el 95 % de identidad de secuencia con la posición de nucleótidos de 1429 a 1628 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 17. La secuencia del elemento diana de mts-ARNip proporcionada en

la presente como SEQ ID NO: 2 tiene un único cambio de nt (T69A) con respecto a la SEQ ID NO: 1. La secuencia del elemento diana de mts-ARNip proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 3 corresponde a la posición de nucleótidos de 239 a 433 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 18. La secuencia del elemento diana de mts-ARNip proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 4 corresponde a la posición de nucleótidos de 477 a 697 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 18. La secuencia del elemento diana de mts-ARNip proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 5 corresponde a la posición de nucleótidos de 239 a 433 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 19. La secuencia del elemento diana de mts-ARNip proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 6 corresponde a la posición de nucleótidos de 370 a 477 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 19. La secuencia del elemento diana de mts-ARNip proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 7 corresponde a la posición de nucleótidos de 1357 a 1562 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 20. La secuencia del elemento diana de mts-ARNip proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 8 corresponde a la posición de nucleótidos de 247 a 441 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 21. El complemento inverso de la secuencia del elemento diana de

mts-ARNip representado por SEQ ID NO: 9 tiene un 99 % de identidad de secuencia con la posición de nucleótidos de 191 a 490 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 22 con tres errores de apareamiento de nt (C314A, A350G y G408A) de SEQ ID NO: 22 con respecto a la secuencia del complemento inverso de SEQ ID NO: 9. Otros elementos diana de mts-ARNip se pueden crear mediante la combinación de las secuencias de ADN de diferentes elementos diana de mts-ARNip o fragmentos de dos o más regiones de ADNc ricas en diana de mts-ARNip, por ejemplo, mediante la combinación de la totalidad o fragmentos de dos o más de los elementos diana de mts-ARNip proporcionados en la presente como SEQ ID NO: 1-9 y/o una o más de las secuencias de mts-ARNip proporcionadas en la presente como SEQ ID NO: 23 - 92. Se combinaron fragmentos diferentes de estos elementos diana de mts-ARNip que oscilan en longitud entre 21 y 170 nucleótidos y se produjeron elementos diana de mts-ARNip nuevos utilizando los métodos de síntesis de ADN conocidos en la técnica y se proporcionan como SEQ ID NO: 10 - 16.

Los elementos diana de mts-ARNip se subclonaron en construcciones de ADN recombinantes con el elemento diana de mts-ARNip unido operativamente al extremo 3' del marco de lectura abierto del gen *cp4-epsps* (SEQ ID NO: 93), codificante de la proteína CP4-EPSPS para la tolerancia al glifosato y 5' para la región no traducida 3' unida

operativamente (3'-UTR). Las construcciones de ADN recombinantes también contenían combinaciones unidas operativamente de una de tres combinaciones diferentes de promotor/intrón/potenciador y una secuencia de péptido de tránsito de cloroplasto. Las configuraciones de los casetes de expresión contenidos en los vectores de transformación para evaluar la eficacia de la diana de mts-ARNip.

Ejemplo 3: transformación de plantas y pruebas de eficacia

Se utilizaron vectores de transformación que contenían las construcciones de ADN recombinante con un método de transformación basado en *Agrobacterium* y embriones inmaduros de maíz y los procedimientos conocidos en la técnica. Se recogieron muestras de hojas de plantas R0 y se les realizó un análisis molecular para seleccionar las plantas transgénicas que contenían una copia única (una inserción) o una copia doble (dos inserciones independientes) de la construcción de ADN recombinante y sin presencia de estructura de vector. Los eventos de copia única no se pulverizaron con glifosato y se autofecundaron y avanzaron para la recolección de la semilla R1, mientras que los eventos de copia doble se utilizaron para la pulverización con glifosato de R0 para evaluar la tolerancia vegetativa y la esterilidad masculina inducida. Las plantas transgénicas que no se pulverizaron con glifosato tenían antesis normal, diseminación del polen normal y desarrollo del polen normal según lo determinado

por tinción de Alexander y observación microscópica.

Los eventos R0 de copia doble se utilizaron en las evaluaciones para calcular un evento homocigoto de copia única. Se pulverizaron las plantas con glifosato en dos etapas de crecimiento diferentes para determinar si la presencia del elemento diana de mts-ARNip en la construcción de ADN recombinante proporciona tolerancia al glifosato vegetativa y esterilidad de la borla inducida por glifosato. Se pulverizaron las plantas en un invernadero con 1X glifosato (0,75 lb ae/acre) aplicado en la etapa V5 seguido por 1X glifosato (0,75 lb ae/acre) aplicado en la etapa V8. Siete días después de la aplicación de glifosato en la etapa V5, se puntuaron las plantas para detectar lesiones vegetativas con puntajes de lesión de $\geq 10\%$ considerados como muestra de tolerancia al glifosato vegetativa (% de tolerancia vegetativa). La esterilidad masculina se midió de dos formas. Las plantas que mostraron tolerancia al glifosato vegetativa se puntuaron después de la aplicación del glifosato de etapa V8 para la esterilidad masculina inducida por glifosato completa medida como la ausencia de extrusión de anteras hasta la etapa S90 +12 (% de esterilidad masculina completa). Se recogieron las anteras y se disecaron para observar microscópicamente el desarrollo del polen. Se evaluaron las anteras para cada evento para los granos de polen no viables producidos según lo detectado por tinción de Alexander bajo observación

microscópica y se puntuaron como no productoras de ningún polen viable (% sin polen). En las plantas no pulverizadas con glifosato, el desarrollo de la borla, la extrusión de anteras y el desarrollo de polen fueron normales.

- 5 Se evaluaron los elementos diana de mts-ARNip en múltiples configuraciones de vectores de transformación. Se utilizó cada vector de transformación para producir múltiples plantas de R0 con cada planta de R0 que representa un evento transgénico exclusivo hecho utilizando el mismo
- 10 vector de transformación. Los datos para tres configuraciones de vectores de transformación diferentes se proporcionan como las tablas 11 y 12.

Se evaluaron doce elementos diana de mts-ARNip en una primera configuración de vector (A) con los resultados que

15 se muestran en la tabla 11. Sorprendentemente, el porcentaje de plantas que muestran tolerancia al glifosato vegetativa osciló entre 80-100 %, pero el porcentaje que muestra esterilidad masculina inducida por el glifosato completa (la esterilidad masculina inducida incluyó el

20 polen no viable y la ausencia de producción de polen) osciló entre 0-100 %. Véase la tabla 11. Por ejemplo, las plantas producidas utilizando un vector de transformación que contenía el elemento diana de mts-ARNip codificado por SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15 tenían altas

25 cantidades que mostraban tolerancia al glifosato vegetativa (en el intervalo del 90-100 % de las plantas evaluadas),

pero ninguno de los eventos transgénicos mostró esterilidad masculina inducida por el glifosato completa; las plantas producidas utilizando un vector de transformación que contenía el elemento diana de mts-ARNip codificado por SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 9 tenían altas cantidades que mostraban tolerancia al glifosato vegetativa (en el intervalo del 90-100 % de las plantas evaluadas) y cantidades moderadas que mostraban esterilidad masculina inducida por el glifosato (en el intervalo del 50-40 % de las plantas evaluadas); y las plantas producidas utilizando un vector de transformación que contenía el elemento diana de mts-ARNip codificado por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 tenían altas cantidades que mostraban tolerancia al glifosato vegetativa (en el intervalo del 88-100 % de las plantas evaluadas) y cantidades altas que mostraban esterilidad masculina inducida por el glifosato (82-100% de las plantas evaluadas). Se evaluó el desarrollo del polen mediante tinción de Alexandar. Las plantas que contenían cuatro eventos hechos con el vector de transformación contenían el elemento diana de mts-ARNip proporcionado como SEQ ID NO: 2 y pulverizadas con glifosato para inducir la esterilidad masculina mostraron muy pocos granos de polen abortados o no se detectó ningún grano de polen. Las plantas que no recibieron aplicación de glifosato tuvieron polen normal. Véase la figura 4.

Tabla 11. Evaluación de plantas R0.

SEQ ID NO:	Configuración del vector	Cantidad de plantas pulverizadas	% de tolerancia vegetativa	% de esterilidad masculina completa	% de sin polen
2	A	11	100	82	82
3	A	10	90	10	0
4	A	7	86	7	0
5	A	10	90	50	0
6	A	9	90	82	0
7	A	9	88	100	44
8	A	10	90	100	50
9	A	10	100	40	0
13	A	7	100	0	0
14	A	10	90	0	0
15	A	10	90	0	0
16	A	10	80	50	0

10

Se evaluaron otros cuatro elementos diana de mts-ARNip en una segunda y tercera configuración de vector (B y C, respectivamente) con los resultados que se muestran en la tabla 12. Las diferencias en el porcentaje de plantas que muestran tolerancia al glifosato vegetativa y el porcentaje que muestra esterilidad masculina inducida por el glifosato completa se observaron entre las dos configuraciones de vectores. La configuración del vector B proporcionó un porcentaje aumentado de plantas que muestran tolerancia al glifosato vegetativa para todos los elementos diana de mts-ARNip evaluados. Para el porcentaje que mostró esterilidad masculina inducida por el glifosato completa, dos de los elementos diana de mts-ARNip (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11) evaluados tuvieron mejores resultados en la configuración del vector C, uno de los elementos diana de mts-ARNip (SEQ ID NO: 12) tuvo mejores resultados en la

25

configuración del vector B y uno de los elementos diana de mts-ARNip (SEQ ID NO: 1) proporcionó el 100 % de esterilidad masculina inducida por el glifosato completa en las configuraciones B y C.

5 Tabla 12. Evaluación de plantas R0

SEQ ID NO:	Configuración del vector	Plantas pulverizadas	% de tolerancia vegetativa	% de esterilidad masculina completa	% de sin polen
1	B	9	67	100	100
10	B	10	90	55	22
11	B	2	100	50	0
12	B	10	100	50	20
1	C	13	38	100	60
10	C	6	83	100	0
11	C	9	55	80	0
12	C	15	87	23	0

De las plantas que mostraban tolerancia al glifosato vegetativa, el porcentaje de plantas androestériles inducidas por glifosato sin polen viable osciló entre 0-
15 100 %. Para las plantas producidas utilizando un vector de transformación que tenía más del 60 % de plantas evaluadas que mostraban tolerancia al glifosato vegetativa y esterilidad masculina inducida por glifosato completa, el porcentaje de plantas sin polen viable osciló entre 0-
20 100 %. Dos elementos diana de mts-ARNip (SEQ ID NO: 1 en la configuración de vector B y SEQ ID NO: 2 en la configuración de vector A) tenían 100 % y 82 % sin polen viable, respectivamente. Estos dos elementos diana de mts-ARNip (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) difieren por un
25 nucleótido y derivan de la misma secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 17).

Ejemplo 4. Inmunolocalización de proteína CP4-EPSPS en borla

Se utilizó inmunolocalización de proteína CP4-EPSPS en borla de plantas transgénicas para analizar la expresión de la proteína en el nivel de célula y tejido para confirmar la pérdida de expresión de proteína CP4-EPSPS en polen debido a la presencia de un elemento diana de mts-ARNip unido operativamente. Se cultivaron en un invernadero plantas transgénicas de generación R3 que contenían el transgen *cp4-epsps* unido operativamente a SEQ ID NO: 1 o como un control, el transgen *cp4-epsps* sin un elemento diana de mts-ARNip unido operativamente. Se pulverizaron las plantas con 1X glifosato (0,75 lb ae/acre) en la etapa V2 para confirmar la tolerancia vegetativa. Se cosecharon las borlas en 1 cm a 17 cm en las etapas de V8 a V12 cuando el tejido de las anteras se encuentra en las etapas de célula madre de microespora y microespora libre. Se retiraron las anteras de la espiguilla de la borla utilizando pinzas de disección y se fijaron inmediatamente en formaldehído al 3,7 % en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) con vacío suave. Después de lavar en PBS, se colocaron los tejidos en medio de incrustación y se congelaron inmediatamente. Se almacenaron los bloques de tejido congelados a -80 °C hasta seccionarse en un microtomo a -20 °C y se recogieron en portaobjetos cargados.

Se bloquearon las secciones de tejido con agente de bloqueo (suero de cabra normal al 10 %, albúmina de suero bovino al 5 %, Triton al 0,1 % X-100 en PBS) durante dos 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 secciones de tejido con el anticuerpo secundario, IgG anti-ratón de cabra conjugado con Alexa Flour® 488 (Invitrogen, Eugene, Oregon). Se preparó un control negativo mediante la omisión de la incubación del anticuerpo CP4-EPSPS. Se incubaron los anticuerpos primario y secundario a temperatura ambiente durante dos a cuatro horas y después se incubaron adicionalmente durante la noche a 4 °C. Después del lavado, se obtuvieron imágenes de los tejidos con un microscopio confocal 510 META Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM) utilizando un láser de 488 nm para la excitación y 500-550 nm (canal verde) para la configuración del filtro de emisión. Se aplicó el mismo parámetro de obtención de imágenes en las muestras que incluían controles. Se escanearon imágenes de campo brillantes y fluorescentes de cada sección y se fusionaron utilizando el software LSM después para mostrar la información estructural. Los datos para los controles negativos mostraron la ausencia de señal esperada. Los datos para las plantas transgénicas que contenían el transgen *cp4-epsps* unido operativamente a la SEQ ID NO: 1 mostraron una señal de fluorescencia baja, lo que indica

baja expresión de proteína CP4-EPSPS en la pared de la antera, el tapete y las microesporas de polen en desarrollo de la antera. Los datos para las plantas transgénicas de control (las que contenían el transgen *cp4-epsps* sin un
5 elemento diana de mts-ARNip unido operativamente) mostraron una señal de fluorescencia alta, lo que indica alta expresión de proteína CP4-EPSPS en la pared de la antera, el tapete y las microesporas de polen en desarrollo de la antera.

10 La pérdida de la expresión de proteína CP4-EPSPS en el polen en las plantas que contenían el transgen *cp4-epsps* unido operativamente al elemento diana de mts-ARNip proporcionado como SEQ ID NO: 1 se correlaciona con la esterilidad masculina inducida por glifosato completa
15 observada en estas plantas. Estos datos confirmaron que la esterilidad masculina inducida por glifosato completa observada es el resultado de la pérdida de la expresión de proteína de CP4-EPSPS en el polen debido a la presencia del elemento diana de mts-ARNip unido operativamente
20 proporcionado como SEQ ID NO: 1.

Ejemplo 5. Ensayos de campo

Para un uso óptimo en la producción de híbridos, es deseable tener extrusión de anteras muy baja en las condiciones de campo después de la aplicación del herbicida
25 combinado con tolerancia a herbicidas vegetativos (según lo medido por la baja lesión del cultivo). Otros aspectos de

la producción de maíz híbrido también pueden ser deseables, como altura y rendimiento de la planta. Para evaluar esto, se evaluaron plantas transgénicas que comprenden el transgen cp4-epsps unido operativamente a un elemento diana de mts-ARNip en generaciones avanzadas en condiciones de campo y se midieron múltiples parámetros.

Se realizaron ensayos de campo de plantas de generación R3 que contenían el transgen cp4-epsps unido operativamente al elemento diana de mts-ARNip proporcionado como SEQ ID NO: 1 en múltiples ubicaciones para evaluar la tolerancia al glifosato vegetativa y la sensibilidad al glifosato específica de la borla. Los ensayos de campo evaluaron las plantas de la generación R3 que contenían el mismo inserto transgénico en diferentes ubicaciones genómicas. Las plantas evaluadas contenían una copia única de uno de cuatro eventos transgénicos únicos creados utilizando el mismo vector de transformación de planta que contenía el transgen cp4-epsps unido operativamente al elemento diana de mts-ARNip proporcionado como SEQ ID NO: 1. Los ensayos se llevaron adelante utilizando un diseño de bloque completo aleatorio. Se puntuaron múltiples parámetros agronómicos y de eficacia de rasgos en la temporada de ensayos de campo y, al final de la temporada, se determinó el rendimiento. Se realizaron ensayos de campo de eficacia de rasgos mediante la aplicación de herbicida de glifosato a 0,75 lb ae/acre en V7, seguido de 0,75 lb ae/acre en V9 y

calificando el porcentaje de lesión de cultivo en la etapa VT (CIPVT), el porcentaje de extrusión de anteras promedio en la etapa S90+8 (AES9E) y el rendimiento (medido como bushels por acre (bu/acre)) al final de la temporada. Los ensayos de campo incluyeron el evento transgénico tolerante al glifosato NK603 (número de depósito ATCC PTA-24780) como un control negativo para la esterilidad masculina inducida por glifosato y como un control positivo para la tolerancia vegetativa al glifosato. Las plantas que contenían el evento NK603 presentan tolerancia al glifosato vegetativa de nivel comercial y producen borlas completamente tolerantes al glifosato. Todos los datos se sometieron a análisis de varianza y promedio (LSD) separados a $p < 0,05$.

Tabla 13. Resultados de eficacia de rasgos para los ensayos de campo con plantas que contienen la SEQ ID N0: 1

Evento	CIPVT	AES9E
NK603 control	1,25	95,00
Evento 1	1,25	0
Evento 2	3,75	3,25
Evento 3	0	4,00
Evento 4	0	1,75

La lesión del cultivo promedio en la etapa VT para las plantas de control que contenían el evento NK603 fue 1,25. La lesión del cultivo promedio para las plantas que contenían el evento 1, el evento 2, el evento 3 y el evento 4 fue 1,25, 3,75, 0 y 0, respectivamente. La diferencia

estadística menos significativa (LSD) de la lesión del cultivo a 0,05 fue 10,25 para todos los eventos evaluados. Estos resultados indican que las plantas que contenían los cuatro eventos transgénicos que contenían el elemento diana de mts-ARNip SEQ ID NO: 1 tenían lesión vegetativa nula o muy baja con la aplicación de 0,75 lb ae/acre de glifosato en V7, seguido de V9, de forma similar a las plantas de control que contenían el evento NK603.

La extrusión de anteras promedio en la etapa S90+8 para las plantas de control que contenían el evento NK603 fue 95. La extrusión de anteras promedio en S90+8 para las plantas que contenían el evento 1, el evento 2, el evento 3 y el evento 4 fue 0, 3,25, 4 y 1,75, respectivamente. La extrusión de anteras promedio en S90+8 LSD a 0,05 fue 42,71 para todos los eventos evaluados. Estos resultados indican que las plantas que contenían los cuatro eventos transgénicos que contenían el elemento diana de mts-ARNip SEQ ID NO: 1 tenían extrusión de anteras nula o muy baja con la aplicación de 0,75 lb ae/acre de glifosato en V7, seguido de V9, contrariamente a las plantas de control que contenían el evento NK603, que resultaron completamente androfértiles después de la aplicación del glifosato.

Al final de la temporada, se cosechó el maíz de estos ensayos de campo y se determinó el rendimiento. El rendimiento promedio para las plantas de control que contenían el evento NK603 fue 96,74 bu/acre. El rendimiento

promedio para las plantas que contenían el evento 1, el evento 2, el evento 3 y el evento 4 fue 102,17 bu/acre, 96,48 bu/acre, 97,59 bu/acre y 95,8 bu/acre, respectivamente. El LSD del rendimiento en 0,05 fue 26,25 bu/acre para todos los eventos evaluados. Véase la tabla 14. Estos resultados indican que las plantas que contenían los cuatro eventos transgénicos que contenían el elemento diana de mts-ARNip SEQ ID N0: 1 tenían paridad de rendimiento con NK603.

Tabla 14. Resultados de rendimiento para los ensayos de campo con plantas que contienen la SEQ ID N0: 1

Evento	Rendimiento promedio (bu/acre)
NK603 Control	96,74
Evento 1	102,17
Evento 2	96,48
Evento 3	97,59
Evento 4	95,8

Se realizaron ensayos de campo de R2 o plantas endogámicas de una generación posterior que contenían el transgen cp4-epsps unido operativamente a diversos elementos diana de mts-ARNip en múltiples ubicaciones para evaluar la tolerancia al glifosato vegetativa y la sensibilidad al glifosato específica de la borla. Los ensayos de campo evaluaron plantas endogámicas de R2 o una generación posterior que contenían una copia única del transgen cp4-epsps unido operativamente al elemento diana de mts-ARNip

SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, cada uno en la configuración A del vector de transformación. Se realizaron los ensayos utilizando un diseño de bloque de grupo con el factor de agrupamiento como el vector de transformación o un grupo de vectores de transformación si los números de evento para un vector de transformación específico eran bajos. Se puntuaron múltiples parámetros agronómicos y de eficacia de rasgos en la temporada de ensayos de campo y, al final de la temporada, se determinó el rendimiento. Se realizaron ensayos de campo de eficacia de rasgos mediante la aplicación de un glifosato a 1,5 lb ae/acre aplicado a maíz V2, seguido de glifosato a 0,75 lb ae/acre aplicado a maíz V8 (875 días de grado de crecimiento), seguido de glifosato a 0,75 lb ae/acre aplicado a maíz V10 (1025 días de grado de crecimiento). Las calificaciones de porcentaje de lesión de cultivo en la etapa de VT (CIPVT), porcentaje de extrusión de anteras promedio en la etapa S90+8 (AES90+8), altura de la planta promedio (en pulgadas) y rendimiento (medido como bushels por acre (bu/acre)) al final de la temporada. Los ensayos de campo incluyeron el evento transgénico tolerante al glifosato NK603 como un control negativo para la esterilidad masculina inducida por glifosato y como un control positivo para la tolerancia vegetativa al glifosato. Se colocó una mezcla tolerante al glifosato de polinizadores masculinos que consistía en tres

bases de germoplasma híbridas cada tres parcelas y rodeando el ensayo completo para actuar como la fuente de polen para las entradas de prueba. Se aplicaron tratamientos de herbicida utilizando una mochila de CO₂ o un pulverizador suspendido calibrado para administrar 15 galones por acre (GPA) utilizando boquillas Teejet® TTI inducidas por aire (TeeJet Technologies, Springfield, IL) con agua como el portador herbicida. Todos los datos se sometieron a análisis de varianza y promedio (LSD) separados a $p < 0,05$.

Los resultados se proporcionan en la tabla 15.

No se observó diferencia significativa en el porcentaje de lesión de cultivo en VT (CIPVT) o en la altura de la planta promedio en comparación con el control NK603 para las plantas evaluadas que contenían el elemento diana de mts-

ARNip SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8. Las plantas que contenían el elemento diana de mts-ARNip SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 tampoco tenían disminución significativa en el rendimiento de semilla en comparación con el control NK603. Las plantas que contenían el elemento diana de mts-ARNip SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7 tenían extrusión de anteras muy baja o ausente con valores de AES90+8 de 0-2,75 % y 0-1,5 %, respectivamente. Las plantas que contenían el elemento diana de mts-ARNip SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 tenían extrusión de anteras significativamente disminuida en comparación con

las plantas de control, con valores de AES90+8 en el intervalo del 10 % al 25 %.

Tabla 15. mts-ARNip diferente en la misma configuración A del vector de transformación

SEQ ID NO:	N.º de eventos evaluados	CIPVT (LSD=8,1)	AES90+8 (LSD = 10)	Rendimiento de semillas bu/acre (LSD=24,7)	Altura de planta promedio (pulgadas) (LSD=6,9)
n/a	NK603	0-6,25 %	90 %	110	83,2
1	8	2,5-6,25 %	0-2,75 %	97-99	84,75
4	4	1,25-3,75 %	16,25-18,75 %	70-80	85,1
5	4	5 %	10 %-20 %	90-100	84,31
6	7	3,75 %	25 %	120	82,1
7	2	3,75-5 %	0-1,5%	100-110	79,8
8	2	2,5-2,7 %	15,75-17,85 %	80-90	80,1

Ejemplo 6. Producción de semillas híbridas

Las plantas y las semillas transgénicas de la invención se pueden utilizar para fines de cultivo incluido en la producción de semillas híbridas. Las plantas de maíz transgénicas que comprenden una construcción de ADN recombinante que comprende un transgen codificante de una proteína de EPSPS tolerante al glifosato unida operativamente a un elemento diana de mts-ARNip se plantan en un área, por ejemplo, un campo abierto. Otras plantas de maíz originales pueden estar presentes o no en la misma área. Para el control de las malezas durante la producción de las semillas, se puede aplicar glifosato a las plantas de maíz transgénicas en las etapas vegetativas según lo indicado por las etiquetas de los productos agrícolas

Roundup®.

La producción de semillas híbridas se puede realizar mediante la aplicación de glifosato a las plantas de maíz transgénicas (hembra) comenzando justo antes o durante el desarrollo de la borla en las etapas de crecimiento vegetativo del maíz que van desde V7 a V13. La aplicación de glifosato producirá un fenotipo androestéril inducido mediante la tolerancia al glifosato selectiva de tejido en las plantas de maíz transgénicas. Las plantas de maíz transgénicas androestériles inducidas se pueden polinizar por otras plantas donantes de polen (macho), lo que produce una semilla de maíz híbrida viable que contiene la construcción de ADN recombinante para la tolerancia al glifosato selectiva de tejido. Las plantas donantes de polen pueden estar presentes en la misma área o no y pueden ser plantas de maíz transgénicas o no. La polinización se puede lograr a través de los medios conocidos en la técnica, incluido mediante colocación próxima de plantas o mediante polinización manual. La semilla híbrida se cosecha de las plantas de maíz transgénicas.

Habiendo ilustrado y descrito los principios de la presente invención, debería ser evidente para los expertos en la técnica que la disposición y detalles de la invención pueden ser modificados sin alejarse de tales principios.

Reivindicamos que todas las modificaciones se encuentran dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas.