



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 749**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/53** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 9/02** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**A01H 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07812035 .9**  
96 Fecha de presentación : **06.06.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2032702**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.03.2009**

54 Título: **Enzima dicamba monooxigenasa modificada y procedimiento de uso.**

30 Prioridad: **06.06.2006 US 811152 P**  
**05.06.2007 US 758657**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.05.2011**

73 Titular/es: **MONSANTO TECHNOLOGY, L.L.C.**  
**800 North Lindbergh Boulevard**  
**St. Louis, Missouri 63167, US**  
**Board of Regents of the University of Nebraska**

72 Inventor/es: **Clemente, Thomas, E.;**  
**Dumitru, Razvan;**  
**Feng, Paul, C.C.;**  
**Flasinski, Stanislaw y**  
**Weeks, Donald, P.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 359 749 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Enzima dicamba monooxigenasa modificada y procedimientos de uso.

### Antecedentes de la invención

#### **1. Campo de la invención**

- 5 La invención se refiere en líneas generales al campo de la biotecnología. Más específicamente, la invención se refiere a enzimas dicamba monooxigenasa modificadas capaces de conferir tolerancia al herbicida dicamba en organismos transgénicos.

#### **2. Descripción de la técnica relacionada**

10 Los procedimientos para la producción de cultivos de campo, tales como maíz, soja y algodón, han cambiado drásticamente durante la pasada década debido a la introducción de rasgos tales como la resistencia a insectos y la tolerancia a herbicidas a través del uso de técnicas de ingeniería genética en plantas. Estos cambios han provocado una mayor productividad por hectárea, costes disminuidos en la producción, mayor flexibilidad y eficacia en los regímenes de producción, uso disminuido de pesticidas y, en el caso del algodón resistente a insectos, una salud mejorada en los agricultores. Los cultivos transgénicos por tanto han logrado una adopción generalizada y ahora se cultivan en millones de acres en todo el mundo. Sin embargo, para que los cultivos transgénicos sigan siendo competitivos en el mercado, ahora requerirán nuevos rasgos de valor añadido.

15 Aunque han aparecido nuevos rasgos que mejoran la cantidad y calidad de los cultivos agrícolas y hortícolas y continuarán apareciendo a una velocidad creciente en los años que vienen, existe una demanda de rasgos que mejoren los procedimientos para la producción de comida, pienso y otros productos. Por ejemplo, aunque actualmente están disponibles plantas transgénicas tolerantes a tratamientos con los herbicidas glifosato, bromoxinil, sulfonilureas y otros herbicidas, existen lagunas en el espectro de las malas hierbas controladas y las opciones de tratamiento que pueden abordarse a través del desarrollo de cultivos tolerantes a herbicidas adicionales. Además, la aparición de malas hierbas resistentes a los herbicidas indicados anteriormente, aunque está generalmente localizada y contenida de forma variable, impone la necesidad de medidas de control suplementarias o alternativas de las malas hierbas.

20 Como se ha demostrado que la tolerancia transgénica a herbicidas es valiosa en un entorno comercial, se necesitan plantas tolerantes a otros herbicidas para evitar la dependencia excesiva de cualquier herbicida individual y para aumentar las opciones de manejar las dificultades para controlar las especies de malas hierbas. Es de particular interés el desarrollo de tolerancia a herbicidas para herbicidas que sean tanto respetuosos con el medioambiente como altamente eficaces para controlar las malas hierbas. El dicamba es uno de dichos ejemplos de un herbicida eficaz y respetuoso con el medio ambiente que han usado los agricultores durante más de 40 años. El dicamba es especialmente útil para el control de malas hierbas latifoliadas anuales y perennes y varias malas hierbas herbáceas en el maíz, el sorgo, los granos pequeños, el pasto, el heno, el pastizal forestal, la caña de azúcar, el espárrago, el césped, y cultivos de semillas de hierba (Crop Protection Reference, 1995). Desafortunadamente, el dicamba puede dañar muchos cultivos comerciales y plantas dicotiledóneas tales como la soja, el algodón, el guisante, la patata, el girasol, y la canola, que son particularmente sensibles incluso a bajos niveles del herbicida. A pesar de esto, el dicamba es altamente eficaz en el control del crecimiento de malas hierbas y por tanto es una herramienta importante en la agricultura.

30 Recientemente, se aisló un gen que codifica la dicamba monooxigenasa (DMO) de *Pseudomonas maltophilia* que confiere tolerancia a dicamba (patente de Estados Unidos N° 7.022.896). La DMO está implicada en la conversión del herbicida dicamba (ácido 3,6-dicloro-o-anísico) en un ácido 3,6-diclorosalicílico no tóxico. Este gen se describe en la patente de Estados Unidos N° 7.022.896 que proporciona tolerancia al dicamba en plantas que expresan el gen DMO. Sin embargo, el desarrollo de variantes de este gen sería de gran beneficio. Dichas variantes podrían tener potencialmente una eficacia de expresión alterada en condiciones ambientales específicas. De este modo, podría seleccionarse una variante que esté optimizada para un entorno específico en el que se pretende usar, y puede mostrar características cinéticas particularmente beneficiosas. La variante en particular puede mostrar eficacia máxima a diferentes temperaturas o condiciones de pH, y por tanto podría seleccionarse para una especie de cultivo particular dependiendo de las condiciones intracelulares y/o las condiciones previstas de crecimiento del cultivo.

#### **50 Sumario de la invención**

En un aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en: a) una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 1; b) una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de la SEC ID N° 2; y c) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con una identidad de secuencia de al menos el 90% con el polipéptido de la SEC ID N° 1, donde el polipéptido tiene actividad dicamba monooxigenasa y comprende cisteína en una posición correspondiente al aminoácido 112 de la SEC ID N° 1. En otras realizaciones, se proporciona un vector de ADN que comprende un ácido nucleico de DMO descrito en este documento unido de forma funcional a un promotor. El promotor puede ser

funcional en una célula vegetal. En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica la dicamba monooxigenasa puede estar unida de forma funcional a un péptido de tránsito en cloroplastos.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una secuencia polipeptídica con una identidad de al menos el 90% con la SEC ID N° 1, donde el polipéptido tiene actividad dicamba monooxigenasa y comprende cisteína en una posición correspondiente al aminoácido 112 de la SEC ID N° 1.

10 En otro aspecto más, la invención proporciona una célula o tejido huésped transformado con un ácido nucleico codificante de dicamba monooxigenasa descrito en este documento. En ciertas realizaciones, la célula huésped puede ser una célula de una planta. En otras realizaciones, la célula vegetal puede definirse como una célula vegetal dicotiledónea o una célula de una planta monocotiledónea. En realizaciones específicas, la célula huésped es una célula vegetal de soja, algodón, maíz o colza. En otras realizaciones, se proporciona un cultivo tisular que comprende una célula transgénica descrita en este documento.

15 En otro aspecto más, la invención proporciona una planta transgénica, y la descendencia de la misma, transformada con un ácido nucleico codificante de dicamba monooxigenasa descrito en este documento. En ciertas realizaciones, la planta puede definirse como una planta dicotiledónea o monocotiledónea. En realizaciones específicas, la planta es una planta de soja, algodón, maíz o colza.

20 En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para producir una planta tolerante a dicamba que comprende introducir en la planta una construcción de transformación proporcionada en este documento transformando de forma estable una o más células vegetales y regenerar la una o más células en una planta tolerante a dicamba. En una realización preferida, el procedimiento comprende adicionalmente cruzar una planta parental consigo misma o una segunda planta, donde la planta parental y/o la segunda planta comprende la construcción de transformación y la planta tolerante a dicamba hereda la construcción de transformación de la planta parental y/o la segunda planta.

25 En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para producir comida o pienso que comprende: a) obtener una planta de la invención proporcionada en este documento o una parte de la misma; y b) preparar comida o pienso a partir de la planta o parte de la misma. En una realización de la invención, la parte de la planta es una semilla. En ciertas realizaciones adicionales, la comida o pienso es aceite, harina, proteína, grano, almidón o proteína. En otras realizaciones, el pienso comprende una planta de forraje o pasto tal como heno. La invención también proporciona procedimientos para producir fibras, agentes farmacéuticos, agentes nutracéuticos, y compuestos químicos industriales, incluyendo biocombustibles, así como cualquier otro producto derivado de una planta proporcionada en este documento.

30 En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para controlar el crecimiento de malas hierbas en un entorno de crecimiento de cultivos que comprende una planta de la invención proporcionada en este documento o una semilla de la misma, que comprende aplicar al entorno de crecimiento de cultivos una cantidad del herbicida dicamba eficaz para controlar el crecimiento de malas hierbas. En ciertas realizaciones de la invención, el herbicida dicamba puede aplicarse sobre la parte superior del entorno de crecimiento de cultivos. En realizaciones específicas, la cantidad del herbicida dicamba no daña la planta de la invención o la semilla de la misma y daña una planta del mismo genotipo que la planta que carece de un ácido nucleico codificante de DMO proporcionado por la invención.

35 En otra realización más de la invención, se proporciona una planta que comprende un ácido nucleico codificante de DMO proporcionado por la invención y al menos otra secuencia codificante transgénica incluyendo, por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco o más de dichas secuencias codificantes. En realizaciones particulares, las plantas comprenden un transgén que confiere uno o más rasgos beneficiosos adicionales, tales como tolerancia a herbicidas o plagas/insectos. Por ejemplo, puede proporcionarse tolerancia a uno o más herbicidas además de a dicamba, así como otro rasgo beneficioso, como se describe a continuación en este documento. La invención, por lo tanto, proporciona plantas que comprenden un ácido nucleico codificante de DMO de la presente invención "apilado" en cualquier combinación deseada con rasgos transgénicos adicionales.

### **Breve descripción de las figuras**

50 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos gráficos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

55 **FIG. 1.** Esquema del casete usado para el diseño genético del gen de la dicamba monooxigenasa (DMOc) para su expresión en plantas superiores usando el promotor FLt36 del virus del estriado clorótico del cacahuete, la secuencia potenciadora de la traducción del virus del grabado del tabaco (líder TEV), y una región terminadora del gen de la subunidad pequeña de la Rubisco del guisante. Otra versión diseñada genéticamente del gen DMOc que se preparó contenía una región codificante de un péptido de tránsito del gen de la subunidad pequeña de la Rubisco del guisante para la localización en el cloroplasto de la DMO entre la región potenciadora de la traducción del TEV y la región codificante de DMOc.

**FIG. 2.** Paneles de transferencia de ADN, ARN y proteína que demuestran la presencia y expresión del gen de la DMO modificado por ingeniería genética en plantas de tabaco transgénicas de la generación T<sub>1</sub>. Los carriles Q a V representan las muestras de ADN, ARNm y DMO extraídas de diversas plantas de tabaco de la generación T<sub>1</sub>. Los extractos de una planta de tabaco no transgénica se representan en el carril WT mientras que el carril Ox muestra un producto de digestión de restricción de la construcción génica de DMO clonada (panel superior) y la enzima DMO de ~37 kDa super-producida en *E. coli* (panel inferior). La subunidad grande de ~55 kDa de la Rubisco se detectó en la transferencia de proteína añadiendo anticuerpos contra la Rubisco a los anticuerpos DMO y la detección de la Rubisco sirvió como una patrón interno para comparar las cargas de proteína total en cada carril. Se cargaron cantidades iguales de ARN en cada carril que se midieron por tinción con bromuro de etidio de un gel duplicado. Las flechas indica la localización de la banda de ADN, ARNm o proteína, de DMO.

**FIG. 3.** Efecto del tratamiento con dicamba a 2,2 kg/ha en dos plantas de tabaco T<sub>1</sub>, una que contiene el gen DMOc modificado por ingeniería genética que carece de una secuencia codificante del péptido de tránsito en cloroplastos (derecha) y una que carece del gen DMOc (segunda desde la derecha). La planta transgénica de la derecha presenta poco, si lo hay, daño por el tratamiento con dicamba. Las dos plantas de la izquierda no se trataron con dicamba y representan una planta no transgénica (izquierda) y una planta transgénica que contiene el gen DMOc (segunda desde la izquierda).

**FIG. 4.** Formación de DCSA frente al tiempo por DMOw.

**FIG. 5.** Determinación del pH óptimo de ensayo para DMOw.

**FIG. 6.** Determinación de la temperatura óptima de ensayo para DMOw.

**FIG. 7.** Determinación del pH óptimo para DMOc.

**FIG. 8.** Determinación de la temperatura óptima para DMOc.

**FIG. 9.** Sumario de las condiciones óptimas de temperatura y pH para DMOc y DMOw.

**FIG. 10.** Cinética en estado estacionario para DMOw.

**FIG. 11.** Cinética en estado estacionario para DMOc.

**FIG. 12.** Efectos de la preincubación de DMOc durante 45 minutos a 30°C en TRIS 50 mM pH 7,5 y KPi 100 mM pH 7,0.

**FIG. 13.** Ensayos de DMOc con la enzima sedimentando una semana y almacenada a 4°C en tampón TRIS (los dos ensayos de la izquierda; ensayos antes y después del almacenamiento, respectivamente) y tampón KPi (los dos ensayos de la derecha; ensayos antes y después del almacenamiento, respectivamente).

**FIG. 14.** Construcción del gen de la dicamba monooxigenasa modificado por ingeniería genética para la recombinación homóloga y expresión en cloroplastos de tabaco.

**FIG. 15.** Demostración del estado homoplástico de los genomas cloroplásticos de líneas de tabaco transgénicas transformadas con un gen DMO diseñado para la recombinación homóloga y expresión en cloroplastos de tabaco. El panel de la izquierda muestra una construcción para la integración de DMO en el cloroplasto por recombinación homóloga (como se muestra en la FIG. 14). La barra por encima de la secuencia de direccionamiento izquierda se refiere a un fragmento de ADN amplificado para la reparación de la sonda de hibridación marcada con digoxigenina. Los paneles de la derecha muestran transferencias de ADN: El carril 1 contiene marcadores de tamaño. El carril 2 contiene ADN de plantas de tabaco no transgénicas. Los carriles 3-11 contienen ADN aislado de plantas transgénicas poco después de la primera ronda de selección y regeneración en presencia de espectinomycin (panel superior) y después de varias rondas de selección y regeneración cuando se obtuvo aparente homoplásticidad del genoma cloroplástico (panel inferior). El ADN para los análisis de transferencia de ADN se aisló de plantas transgénicas y no transgénicas y se sometió a digestión con enzimas de restricción con BamH I antes de la separación electroforética y el sondeo del ADN transferido con un fragmento de ADN marcado complementario a la "secuencia de direccionamiento izquierda" del vector de transformación del genoma cloroplástico (es decir, la sonda de hibridación marcada con digoxigenina). La banda de ADN de 5,6 kb corresponde al fragmento de ADN del cloroplasto que contiene el gen DMO y la banda de 3,3 kb corresponde a la banda del cloroplasto nativo homólogo que carece de una construcción del gen DMO insertada.

**FIG. 16.** Plantas de tabaco transgénicas homoplásticas de la generación T<sub>1</sub> que contienen un gen de la dicamba monooxigenasa codificado en el cloroplasto tratadas con dicamba a un nivel de 28 kg/ha (las plantas 1-2 y las plantas 3-4 se obtuvieron de dos plantas R<sub>0</sub> independientemente transformadas).

**FIG. 17.** Expresión de DMO y sensibilidad y resistencia al tratamiento con dicamba en plantas de tabaco no transgénicas y transgénicas que contiene el gen DMO en el genoma cloroplástico. La transferencia de proteína se sondeó con anticuerpos contra DMO: El carril 1 contiene DMO purificada. El carril 2 es el blanco y el carril 3 contiene extractos proteicos de plantas de tabaco no transgénicas. Los carriles 4 y 8 contienen proteínas aisladas de plantas

de tabaco "falso-positivas" que presentan resistencia a antibióticos durante la selección en espectinomocina, pero que carecen del gen DMO intacto. Los carriles 5-7 contienen extractos de plantas transgénicas que expresan DMO codificada por el gen DMO integrado en el genoma cloroplástico. S = plantas sensibles a dicamba a 0,56 kg/ha; R = plantas resistentes a dicamba a 5,6 kg/ha. Se cargaron cantidades casi iguales de los extractos en los carriles 4-8 medidas por la cantidad de proteína de la subunidad grande de la Rubisco detectada con anticuerpos anti-Rubisco aunque se cargó significativamente más proteína de las plantas no transgénicas en el carril 3. La flecha indica la posición de la proteína DMO.

**FIG. 18.** Comparación de una parte de la secuencia polipeptídica de DMO de tipo silvestre con regiones conservadas de otras oxigenasas de hierro-azufre que muestra que la DMO es única, con baja identidad con enzimas conocidas, pero W112 (flecha) está conservada en otras oxigenasas de hierro-azufre y está unida por dos dominios conservados, Rieske y Fe no hemo (SEC ID N° 4-23).

### Descripción detallada de la invención

La invención proporciona variantes de dicamba monooxigenasa (DMO) que comprenden una cisteína en una posición correspondiente a la posición 112 de la DMO mostrada en SEC ID N° 1, denominada en este documento DMOc. Se demostró que DMOc produce un elevado nivel de tolerancia al herbicida dicamba cuando se expresa en plantas transgénicas. Los resultados fueron sorprendentes ya que la posición alterada del aminoácido está muy conservada en otras oxigenasas de hierro-azufre. De 78 secuencias de oxigenasa de hierro-azufre analizadas de 45 especies, las 52 secuencias de oxigenasa con al menos un 15% de identidad tenían un W correspondiente a la posición del aminoácido 112 de la SEC ID N° 1, a pesar de la identidad total más alta de solamente el 38%. Esta posición también está unida por dos dominios funcionales conservados (FIG. 18). La DMOc de elevado nivel de tolerancia a herbicidas por tanto fue inesperada.

El análisis de los parámetros de Michaelis-Menten para DMOc con relación a la secuencia no alterada (DMOw; patente de Estados Unidos N° 7.022.896) reveló que las enzimas eran diferentes en términos de eficacias catalíticas: DMOc era cinco veces más eficaz que DMOw y DMOc parecía tener una tasa de renovación mayor y una unión más fuerte al sustrato. Además, DMOc funcionaba mejor a condiciones de pH inferiores y mayor temperatura con relación a la enzima nativa. Estos resultados indicaron el potencial de seleccionar variantes de DMO para su uso en una planta transgénica particular en base a condiciones esperadas de uso, tales como condiciones de crecimiento de cultivos. Un aspecto de la invención, por lo tanto, implica identificar un entorno candidato de crecimiento de cultivos para al menos una primera especie de cultivo, e identificar la enzima DMO más adecuada para ese entorno en base a la cinética, por ejemplo de DMOc y DMOw. Por ejemplo, un especialista en la técnica puede, en realizaciones particulares, seleccionar una secuencia codificante de DMOc para su uso en plantas que presentan condiciones de pH inferiores *in planta* y/o en el caso de entornos de cultivo con mayores temperaturas con relación a otras especies vegetales o entornos de cultivo, respectivamente. El dicamba puede aplicarse por incorporación en la tierra (incorporación previa a la planta); pulverizando la tierra (pre-afloramiento); y sobre la parte superior de las plantas (tratamiento post-afloramiento), aunque los niveles de tolerancia a dicamba pueden diferir en diversos momentos durante el crecimiento de la planta.

Como se ha indicado anteriormente, se obtuvo tolerancia a niveles extremadamente altos del herbicida dicamba en plantas transgénicas que expresaban DMOc. En el tabaco, por ejemplo, que normalmente es sensible incluso a niveles muy bajos de dicamba, se crearon plantas transgénicas que expresaban DMOc que eran tolerantes al tratamiento con dicamba a 5,6 kg/ha o más, por ejemplo, 10-20 veces más que las tasas de aplicación en el campo normalmente recomendadas para el control de malas hierbas latifoliadas. Cuando se insertaba el gen DMOc en el genoma cloroplástico de plantas de tabaco, se obtenía una tolerancia a dicamba a al menos 28 kg/ha. También se crearon plantas transgénicas de soja, tomate y *Arabidopsis thaliana* que albergaban un gen DMOc codificado en el núcleo y se halló que eran tolerantes a elevados niveles de dicamba. Por ejemplo, la inserción de DMOc en el genoma nuclear de plantas de soja produjo tolerancia a tratamientos de 2,8 kg/ha, permitiendo de este modo el uso de dicamba para controlar las malas hierbas en campos de plantas que expresan DMOc.

Por tanto se ha demostrado que DMOc es eficaz para conferir tolerancia a dicamba sin la necesidad de secuencias codificantes adicionales tales como *P. maltophilia*, cepa DI-6, ferredoxina o reductasa. El gen DMO modificado se heredaba de forma estable como un gen mendeliano sin pérdida aparente de la penetrancia o expresión. Aunque se obtuvo una expresión algo más fuerte con un péptido de tránsito de cloroplastos, las plantas transgénicas con un transgén DMO que carece de la secuencia codificante del péptido de tránsito también mostraban un elevado nivel de tolerancia a dicamba post-afloramiento.

## **A. Ácidos nucleicos y construcciones recombinantes**

### **1. Dicamba monooxigenasa (DMO)**

En una realización de la presente invención, se proporcionan construcciones de ADN que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de dicamba monooxigenasa que comprende una cisteína en una posición correspondiente a la posición 112 de la SEC ID N° 1. En este documento se proporciona una secuencia codificante de DMO ejemplar como SEC ID N° 2. Esta secuencia, además de comprender cisteína en la posición 112 de la SEC

ID N° 1, incluía la adición de un codón GCC (alanina) después del codón de inicio ATG para añadir un sitio de restricción Nco I con relación a la secuencia codificante nativa y para facilitar la clonación. El polipéptido de la SEC ID N° 1, por lo tanto, también incluía un resto de Ala adicional inmediatamente después de la Met codificada por el codón de inicio. La secuencia peptídico de tránsito se escindió del plásmido con Bgl II y EcoR I y después se clonó en los sitios BamH I y EcoR I del vector pBluescript II KS+. Esta construcción se usó como molde en una reacción de PCR con cebadores que añadían sitios de restricción Nco I en cada extremo de la secuencia codificante del péptido de tránsito. La digestión del producto de PCR con Nco I permitió la inserción de la secuencia codificante del péptido de tránsito en el sitio del codón de inicio ATG del gen DMO modificado.

Por tanto, en una realización de la invención, se proporcionan secuencias que codifican el polipéptido de la SEC ID N° 1 incluyendo, aunque sin limitación, la SEC ID N° 2. Como es bien sabido en la técnica, pueden prepararse y usarse fácilmente secuencias homólogas y derivados de estas secuencias. Por ejemplo, puede usarse un ácido nucleico que codifica un polipéptido DMO que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con el polipéptido DMOc de la SEC ID N° 1, incluyendo una identidad de al menos aproximadamente el 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con dichas secuencias. También puede usarse un ácido nucleico que muestra una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de ácido nucleico proporcionada como SEC ID N° 2, incluyendo una identidad de al menos aproximadamente el 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con dicha secuencia y que codifica una DMO que comprende una cisteína en la posición 112. En una realización, la identidad de secuencia se determina usando el paquete de software Sequence Analysis del GCG Wisconsin Package (Accelrys, San Diego, CA), MEGAlign (DNASStar, Inc., 1228 S. Park St., Madison, Wis. 53715) con parámetros por defecto. Dicho software aparea secuencias similares asignando grados de similitud o identidad.

Puede obtenerse una molécula polinucleotídica que expresa un polipéptido DMO por técnicas bien conocidas en la técnica en vista de la presente descripción. Por tanto pueden prepararse variantes de DMO proporcionadas en este documento que tienen la capacidad de degradar el dicamba y ensayarse para su actividad de acuerdo con la metodología descrita en este documento. Dichas secuencias también pueden identificarse, por ejemplo, a partir de organismos adecuados incluyendo bacterias que degradan el dicamba (patente de Estados Unidos N° 5.445.962; Krueger y col., 1989; Cork y Krueger, 1991; Cork y Khalil, 1995). Un medio para aislar una secuencia de DMO clonada es por hibridación de ácido nucleico, por ejemplo, con una biblioteca construida a partir del organismo fuente, o por RT-PCR usando ARNm del organismo fuente y cebadores basados en la DMO descrita. La invención, por lo tanto, abarca el uso de ácidos nucleicos que hibridan en condiciones rigurosas con una secuencia codificante de DMO descrita en este documento. Un especialista en la técnica entiende que las condiciones pueden volverse menos rigurosas aumentando la concentración salina y disminuyendo la temperatura. Por tanto, las condiciones de hibridación pueden manipularse fácilmente, y por tanto generalmente será el procedimiento de elección dependiendo de los resultados deseados. Un ejemplo de condiciones de alta rigurosidad es 5X SSC, formamida al 50% y 42°C. Realizando un lavado en estas condiciones, por ejemplo, durante 10 minutos, pueden eliminarse aquellas secuencias que no hibridan con una secuencia diana particular en estas condiciones. Una realización de la invención, por tanto, comprende el uso de un ácido nucleico codificante de DMO que se define como hibridante en condiciones de lavado de 5X SSC, formamida al 50% y 42°C durante 10 minutos con un ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID N° 2.

Las variantes también pueden sintetizarse químicamente usando las secuencia polinucleotídicas de DMO descritas en este documento de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden sintetizarse secuencias de ADN por química de fosforamida en un sintetizador automatizado de ADN. La síntesis química tiene varias ventajas. En particular, la síntesis química es deseable porque pueden usarse los codones preferidos por el huésped en el que se expresará la secuencia de ADN para optimizar la expresión. Un ejemplo de dicha secuencia que se optimizó para su expresión en dicotiledóneas usando el uso de codones de *Arabidopsis thaliana* es la secuencia de DMO mostrada en la SEC ID N° 3. El polipéptido, que se ha predicho que tendrá una Ala, Thr, Cys en las posiciones 2, 3, 112, respectivamente, se da en la SEC ID N° 1. El resto de Ala en la posición 2 se añadió con relación a la DMO de tipo silvestre como resultado de la adición de un codón para alanina inmediatamente después del codón de inicio ATG para simplificar la construcción de vector, como se explica a continuación.

No todos los codones tienen que alterarse para obtener una expresión mejorada, pero preferiblemente se cambian al menos los codones usados pocas veces en el huésped por los codones preferidos por el huésped, por ejemplo, codones usados más frecuentemente en el huésped y que generalmente se traducen más fácilmente que los codones raros no preferidos. Pueden obtenerse elevados niveles de expresión cambiando más de aproximadamente el 50%, mucho más preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, de los codones no preferidos por los codones preferidos por el huésped. Se conocen las preferencias de codón de muchas células huésped (documentos PCT WO 97/31115; PCT WO 97/11086; EP 646643; EP 553494; y las patentes de Estados Unidos N° 5.689.052; 5.567.862; 5.567.600; 5.552.299 y 5.017.692). Las preferencias de codón de otras células huésped pueden deducirse por procedimientos conocidos en la técnica. Además, usando síntesis química, pueden cambiarse fácilmente la secuencia de la molécula de ADN o su proteína codificada para, por ejemplo, optimizar su expresión (por ejemplo, eliminar las estructuras secundarias de ARNm que interfieren con la transcripción o traducción), añadir sitios de restricción únicos en puntos adecuados, y eliminar sitios de escisión por proteasa.

Pueden hacerse modificaciones y cambios en la secuencia polipeptídica de una proteína tal como las secuencias de DMO proporcionadas en este documento reteniendo al mismo tiempo la actividad enzimática. Lo siguiente es un

análisis basado en el cambio de los aminoácidos de una proteína para crear un polipéptido equivalente, o incluso uno modificado, mejorado y secuencias codificantes correspondientes. En realizaciones particulares de la invención, las secuencias de DMO pueden alterarse de este modo y usarse en los procedimientos de la invención. Los cambios de aminoácidos pueden conseguirse cambiando los codones de la secuencia de ADN.

5 Se sabe, por ejemplo, que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como sitios de unión en las moléculas sustrato. Como es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, pueden hacerse ciertas sustituciones en la secuencia de aminoácidos de una secuencia proteica y, por supuesto, la secuencia codificante de ADN subyacente, y no obstante obtener una proteína con propiedades similares. Por tanto se contempla que pueden hacerse diversos cambios en las secuencias peptídicas de DMO descritas en este documento y las secuencias codificantes de ADN correspondientes sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

Al hacer dichos cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir función biológica interactiva en una proteína está generalmente comprendida en la técnica (Kyte y *col.*, 1982). Se aprecia que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. Cada aminoácido tiene un índice hidropático asignado en base a sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte y *col.*, 1982), estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

En la técnica se sabe que los aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tengan un índice o valor hidropático similar y aún producir una proteína con actividad biológica similar, es decir, aún obtener una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al hacer dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están en  $\pm 2$ , aquellos que están en  $\pm 1$  son particularmente preferidos, y aquellos en  $\pm 0,5$  son incluso más particularmente preferidos. Por tanto, la observación de que una DMO que tenía una sustitución de un triptófano en la posición 112 con cisteína tenía actividad biológica y producía plantas tolerantes a elevados niveles de dicamba, fue sorprendente dados los diferentes índices hidropáticos entre los aminoácidos nativos y alterados y por tanto los especialistas en la técnica no la usarían para crear variantes funcionales de acuerdo con la técnica previa.

En la técnica también se comprende que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse de forma eficaz en base a la hidrofiliidad. La patente de Estados Unidos 4.554.101 indica que la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, controlada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la patente de Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los restos aminoacídicos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm$  1); glutamato (+3,0  $\pm$  1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5  $\pm$  1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar y aún obtener una proteína biológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están en  $\pm 2$ , aquellos que están en  $\pm 1$  son particularmente preferidos, y aquellos en  $\pm 0,5$  son incluso más particularmente preferidos. Las sustituciones ejemplares que toman estas características y diversas características anteriores en consideración son bien conocidas para los especialistas en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina. De nuevo, la actividad de DMOc fue sorprendente dados los valores de hidrofiliidad tan diferentes entre los aminoácidos alterados y nativos y los especialistas en la técnica no usarían esta sustitución para crear variantes funcionales de acuerdo con la técnica previa.

La modificación de una secuencia de DMO de acuerdo con la invención puede estar guiada por la consideración de los dominios conservados dentro de la enzima. Por ejemplo, a continuación se demuestra que la enzima DMO contiene dominios funcionales tales como un grupo de Rieske hierro-azufre y un sitio de unión para hierro libre (véase la FIG. 18, por ejemplo). Esta información, combinada con el conocimiento en la técnica respecto a los dominios funcionales y la modificación de proteínas, generalmente puede usarse, por lo tanto, para generar enzimas DMO modificadas manteniendo al mismo tiempo la actividad enzimática dentro del alcance de la invención (véase, por ejemplo, Mason y Cammack, 1992; Jiang y *col.*, 1996).

## 2. Construcciones de transformación

Un polinucleótido codificante de DMO usado de acuerdo con la invención típicamente se introducirá en una célula como una construcción que comprende elementos de control de la expresión necesarios para la expresión eficaz. Los procedimientos para unir de forma funcional elementos de control de la expresión a secuencias codificantes son bien conocidos en la técnica (Maniatis y *col.*, 1982; Sambrook y *col.*, 1989). Las secuencias de control de la expresión son secuencias de ADN implicadas de cualquier modo en el control de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión adecuadas y los procedimientos para usarlas son bien conocidos en la técnica. Puede usarse

un promotor en particular, con o sin elementos potenciadores, una región 5' no traducida, péptidos de tránsito o señal para el direccionamiento de una proteína o producto de ARN a un orgánulo vegetal, particularmente a un cloroplasto y regiones 3' no traducidas tales como sitios de poliadenilación. Un especialista en la técnica sabrá que son útiles diversos potenciadores, promotores, intrones, péptidos de tránsito, secuencias señal de direccionamiento, y regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) en el diseño de vectores de expresión en plantas eficaces, tales como los dividuados, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2003/01403641.

Los promotores adecuados para el presente uso y otros usos son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos que describen dichos promotores incluyen la patente de Estados Unidos 6.437.217 (promotor del maíz RS81), la patente de Estados Unidos 5.641.876 (promotor de la actina del arroz), la patente de Estados Unidos 6.426.446 (promotor del maíz RS324), la patente de Estados Unidos 6.429.362 (promotor del maíz PR-1), la patente de Estados Unidos 6.232.526 (promotor del maíz A3), la patente de Estados Unidos 6.177.611 (promotores constitutivos del maíz), las patentes de Estados Unidos 5.322.938, 5.352.605, 5.359.142 y 5.530.196 (promotor 35S), la patente de Estados Unidos 6.433.252 (promotor de la oleosina L3 del maíz), la patente de Estados Unidos 6.429.357 (el promotor de la actina 2 del arroz así como el intrón de la actina 2 del arroz), la patente de Estados Unidos 5.837.848 (promotor específico de la raíz), la patente de Estados Unidos 6.294.714 (promotores inducibles por la luz), la patente de Estados Unidos 6.140.078 (promotores inducibles por sales), la patente de Estados Unidos 6.252.138 (promotores inducibles por patógenos), la patente de Estados Unidos 6.175.060 (promotores inducibles por la deficiencia de fósforo), la patente de Estados Unidos 6.635.806 (el promotor de la gamma-coixina), y la solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 09/757.089 (promotor de la aldolasa de cloroplastos del maíz). Promotores adicionales que pueden encontrar uso son un promotor de la nopalina sintasa (NOS) (Ebert y col., 1987), el promotor de la octopina sintasa (OCS) (que lo portan plásmidos inductores de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*), los promotores de caulimovirus tales como promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Lawton y col., 1987), el promotor 35S de CaMV (Odell y col., 1985), el promotor 35S del virus del mosaico del higo (Walker y col., 1987), el promotor de la sacarosa sintasa (Yang y col., 1990), el promotor del complejo génico R (Chandler y col., 1989), y el promotor del gen de la proteína de unión a clorofila a/b, etc. Pueden ser particularmente beneficiosos para su uso con la presente invención el promotor CaMV35S (patentes de Estados Unidos N° 5.322.938; 5.352.605; 5.359.142; y 5.530.196), un promotor FMV35S (patentes de Estados Unidos 6.051.753; 5.378.619), PC1SV (por ejemplo, patente de Estados Unidos 5.850.019, y la SEC ID N° 24), y promotores AGRtu.nos (acceso a GenBank V00087; Depicker y col., 1982; Bevan y col., 1983).

Puede obtenerse beneficio para la expresión de genes heterólogos por el uso de una secuencia que codifica un péptido de tránsito. Los péptidos de tránsito generalmente se refieren a moléculas peptídicas que cuando se unen a una proteína de interés dirigen la proteína a un tejido, célula, localización subcelular, u orgánulo celular particular. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, péptidos de tránsito de cloroplastos, señales de direccionamiento nuclear, y señales vacuolares. Un péptido de tránsito de cloroplastos es de particular utilidad en la presente invención para dirigir la expresión de una enzima DMO a los cloroplastos. Se prevé que la función de la DMO estará facilitada por reductasas y ferredoxinas endógenas encontradas en las células vegetales para degradar el dicamba. Los cloroplastos vegetales son particularmente ricos en reductasas y ferredoxinas. Por consiguiente, en una realización preferida para la producción de plantas transgénicas tolerantes a dicamba, puede usarse una secuencia que codifica un péptido que dirigirá la oxigenasa degradante de dicamba al interior de los cloroplastos. Como alternativa o adicionalmente, la reductasa y/o ferredoxina endógena también puede expresarse en una célula.

El ADN que codifica una secuencia de direccionamiento a cloroplastos puede colocarse preferiblemente cadena arriba (5') de una secuencia codificante de DMO, pero también puede colocarse cadena abajo (3') de la secuencia codificante, o tanto cadena arriba como cadena abajo de la secuencia codificante. Un péptido de tránsito de cloroplastos (CTP) en particular puede diseñarse para fusionarse al extremo N de proteínas que tienen que dirigirse al interior del cloroplasto vegetal. Muchas proteínas localizadas en los cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares en forma de precursores y se dirigen al cloroplasto por un CTP que se retira durante las etapas de importación. Los ejemplos de proteínas cloroplásticas incluyen la subunidad pequeña (RbcS2) de la ribulosa-1,5,-bifosfato carboxilasa, la ferredoxina, la ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y proteína II del complejo de captación de luz, y la tioredoxina F. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que proteínas no del cloroplasto pueden dirigirse al cloroplasto mediante el uso de fusiones de proteínas con un CTP y que un CTP es suficiente para dirigir una proteína al cloroplasto. Por ejemplo, se ha demostrado que la incorporación de un péptido de tránsito de cloroplastos adecuado tal como el CTP de EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (Klee y col., 1987), y el CTP de EPSPS de *Petunia hybrida* (della-Cioppa y col., 1986) dirige secuencias heterólogas de la proteína EPSPS a cloroplastos en plantas transgénicas. Otras secuencias de direccionamiento a cloroplastos ejemplares incluyen la secuencia señal del maíz cab-m7 (Becker y col., 1992; documento PCT WO 97/41228) y la secuencia señal de la glutatión reductasa del guisante (Creissen y col., 1991; documento PCT WO 97/41228). En la presente invención, AtRbcS4 (CTP1; patente de Estados Unidos 5.728.925), AtShkG (CTP2; Klee y col., 1987), AtShkGZm (CTP2 sintético; véase la SEC ID N° 14 del documento WO04009761), y PsRbcS (Coruzzi y col., 1984) pueden ser de beneficio particular, por ejemplo, con respecto a la expresión de un polipéptido DMO.

Una 5' UTR que funciona como una secuencia líder de la traducción es un elemento genético de ADN localizado entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificante. La secuencia líder de la traducción está presente en el ARNm completamente procesado cadena arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de la traducción puede afectar al procesamiento del transcrito primario en ARNm, la estabilidad del ARNm o la

eficacia de traducción. Los ejemplos de secuencias líder de la traducción incluyen líderes de proteínas de choque térmico de maíz y petunia (patente de Estados Unidos N° 5.362.865), líderes de proteínas de cubierta de virus de plantas, líderes de la rubisco vegetal entre otros (Turner y Foster, 1995). En la presente invención, las 5' UTR que pueden, en particular, encontrar beneficio, son GmHsp (patente de Estados Unidos 5.659.122), PhDnaK (patente de Estados Unidos 5.362.865), AtAnt1, TEV (Carrington y Freed, 1990), y AGRtunos (acceso a GenBank V00087; Bevan y col., 1983).

La secuencia 3' no traducida, la región de terminación de la transcripción 3', o la región de poliadenilación indican una molécula de ADN unida a y localizada cadena abajo de la región codificante de un gen e incluye polinucleótidos que proporcionan la señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de afectar a la transcripción, el procesamiento del ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación funciona en plantas causando la adición de nucleótidos de poliadenilato en el extremo 3' del precursor de ARNm. La secuencia de poliadenilación puede obtenerse del gen natural, de una diversidad de genes vegetales, o de genes ADN-T. Un ejemplo de una región de terminación de la transcripción 3' es la región 3' de la nopalina sintasa (nos 3'; Fraley y col., 1983). Se ha descrito el uso de diferentes regiones 3' no traducidas (Ingelbrecht y col., 1989). Las moléculas de poliadenilación de un gen RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi y col., 1984) y AGRtu.nos (Rojiyaa y col., 1987, acceso a Genbank E01312) en particular pueden ser beneficiosas para su uso con la invención.

Puede unirse una unidad de expresión de la molécula polinucleotídica codificante de DMO a una segunda molécula polinucleotídica en una unidad de expresión que contiene elementos genéticos para un marcador seleccionable/valorable o para un gen que confiere un rasgo deseado. Los genes habitualmente usados para explorar células supuestamente transformadas incluyen la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), la  $\beta$ -galactosidasa, la luciferasa, y la cloramfenicol acetiltransferasa (Jefferson, 1987; Teeri y col., 1989; Koncz y col., 1987; De Block y col., 1984), la proteína verde fluorescente (GFP) (Chalfie y col., 1994; Haseloff y col., 1995; y solicitud PCT WO 97/41228).

La segunda molécula polinucleotídica puede incluir, aunque sin limitación, un gene que actúa como marcador de selección. Un segundo gen o gen adicional puede proporcionar una característica deseable asociada con la morfología, fisiología, crecimiento y desarrollo de la planta, la producción, la potenciación nutricional, la resistencia a enfermedades o plagas, o la tolerancia a entornos o compuestos químicos y puede incluir elementos genéticos que comprenden resistencia a herbicidas (patentes de Estados Unidos 6.803.501; 6.448.476; 6.248.876; 6.225.114; 6.107.549; 5.866.775; 5.804.425; 5.633.435; 5.463.175), producción aumentada (patentes de Estados Unidos RE38.446; 6.716.474; 6.663.906; 6.476.295; 6.441.277; 6.423.828; 6.399.330; 6.372.211; 6.235.971; 6.222.098; 5.716.837), control de insectos (patentes de Estados Unidos 6.809.078; 6.713.063; 6.686.452; 6.657.046; 6.645.497; 6.642.030; 6.639.054; 6.620.988; 6.468.523; 6.326.351; 6.313.378; 6.284.949; 6.281.016; 6.248.536; 6.242.241; 6.221.649; 6.177.615; 6.156.573; 6.153.814; 6.110.464; 6.093.695; 5.959.091; 5.942.664; 5.942.658; 5.880.275; 5.763.245; 5.763.241), resistencia a enfermedades fúngicas (patentes de Estados Unidos 6.653.280; 6.573.361; 6.506.962; 6.316.407; 6.215.048; 5.516.671; 5.773.696; 6.121.436; 6.316.407; 6.506.962), resistencia a virus (patentes de Estados Unidos 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; 5.304.730), resistencia a nematodos (patente de Estados Unidos 6.228.992), resistencia a enfermedades bacterianas (patente de Estados Unidos 5.516.671), crecimiento y desarrollo de la planta (patentes de Estados Unidos 6.723.897; 6.518.488), producción de almidón (patentes de Estados Unidos 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; 6.476.295), producción modificada de aceites (patentes de Estados Unidos 6.444.876; 6.426.447; 6.380.462), elevada producción de aceites (patentes de Estados Unidos 6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; 6.476.295), contenido modificado de ácidos grasos (patentes de Estados Unidos 6.828.475; 6.822.141; 6.770.465; 6.706.950; 6.660.849; 6.596.538; 6.589.767; 6.537.750; 6.489.461; 6.459.018), elevada producción de proteínas (patente de Estados Unidos 6.380.466), maduración de los frutos (patente de Estados Unidos 5.512.466), nutrición animal y humana potenciada (patentes de Estados Unidos 6.723.837; 6.653.530; 6.541.259; 5.985.605; 6.171.640), biopolímeros (patentes de Estados Unidos RE37.543; 6.228.623; 5.958.745 y publicación de patente de Estados Unidos N° US20030028917), resistencia a estrés ambiental (patente de Estados Unidos 6.072.103), péptidos farmacéuticos y péptidos secretables (patentes de Estados Unidos 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; 6.080.560), rasgos de procesamiento mejorado (patente de Estados Unidos 6.476.295), digestibilidad mejorada (patente de Estados Unidos 6.531.648), bajo contenido en rafinosa (patente de Estados Unidos 6.166.292), producción de enzimas industriales (patente de Estados Unidos 5.543.576), aroma mejorado (patente de Estados Unidos 6.011.199), fijación de nitrógeno (patente de Estados Unidos 5.229.114), producción de semillas híbridas (patente de Estados Unidos 5.689.041), producción de fibra (patentes de Estados Unidos 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; 5.869.720) y producción de biocombustible (patente de Estados Unidos 5.998.700). Cualquiera de estos u otros elementos genéticos, procedimientos, y transgenes pueden usarse con la invención como apreciarán los especialistas en la técnica en vista de la presente divulgación.

Una unidad de expresión puede proporcionarse en forma de ADN-T entre las regiones del extremo de la derecha (RB) y el extremo de la izquierda (LB) de un primer plásmido junto con un segundo plásmido que porta las funciones de transferencia e integración del ADN-T en *Agrobacterium*. Las construcciones también pueden contener segmentos de ADN estructurales plasmídicos que proporcionan la función de replicación y la selección por antibióticos en células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación de *Escherichia coli* tal como ori322, un origen de replicación de amplio rango de huésped tal como oriV u oriRi, y una región codificante para un marcador de selección tal como Spec/Strp que codifica la aminoglucósido adeniltransferasa (aadA) de Tn7 que confiere

resistencia a espectinomicina o estreptomina, o un gen marcador de selección por gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación de plantas, la cepa bacteriana huésped a menudo es *Agrobacterium tumefaciens* ABI, C58, o LBA4404. Sin embargo, otras cepas conocidas para los especialistas en la técnica de transformación de plantas pueden funcionar en la presente invención.

### 5 3. Preparación de células transgénicas

La transformación de células vegetales puede conseguirse por cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica para la introducción de transgenes en células (véase, por ejemplo, Miki y col., 1993). Los ejemplos de dichos procedimientos se cree que incluyen casi cualquier procedimiento por el que pueda introducirse ADN en una célula. Los procedimientos que se han descrito incluyen la electroporación como se ilustra en la patente de Estados Unidos N° 5.384.253; el bombardeo con microproyectiles como se ilustra en las patentes de Estados Unidos N° 5.015.580; 5.550.318; 5.538.880; 6.160.208; 6.399.861; y 6.403.865; la transformación mediada por *Agrobacterium* como se ilustra en las patentes de Estados Unidos N° 5.635.055; 5.824.877; 5.591.616; 5.981.840; y 6.384.301; y la transformación por protoplastos como se ilustra en la patente de Estados Unidos N° 5.508.184. A través de la aplicación de técnicas como éstas, pueden transformarse de forma estable las células de casi cualquier especie de planta y seleccionarse de acuerdo con la invención y desarrollarse estas células en plantas transgénicas.

El procedimiento más ampliamente utilizado para introducir un vector de expresión en plantas se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium* (por ejemplo, Horsch y col., 1985). *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias de la tierra patógenas para las plantas que transforman genéticamente las células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta (por ejemplo, Kado, 1991). Se proporcionan descripciones de sistemas de vector de *Agrobacterium* y procedimientos para la transferencia génica mediada por *Agrobacterium* en numerosas referencias, incluyendo Miki y col., supra, Moloney y col., 1989, y las patentes de Estados Unidos N° 4.940.838 y 5.464.763. Otras bacterias tales como *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, y *Mesorhizobium* que interactúan con plantas naturalmente pueden modificarse para que medien la transferencia génica a varias plantas diversas. Estas bacterias simbióticas asociadas con plantas pueden hacerse competentes para la transferencia génica por la adquisición tanto de un plásmido Ti desactivado como de un vector binario adecuado (Brothers y col., 2005).

### B. Cultivos tisulares y regeneración de las plantas

La regeneración de una célula vegetal transformada en una planta fértil puede conseguirse cultivando primero un explante en un medio de brotamiento y posteriormente en un medio de enraizamiento. A veces, un explante puede cultivarse en un medio de callos antes de transferirse a un medio de brotamiento. Puede aplicarse y optimizarse una diversidad de medios y necesidades de transferencia para cada sistema vegetal para la transformación de plantas y la recuperación de plantas transgénicas. Por consiguiente, dichos medios y condiciones de cultivo pueden modificarse o sustituirse con componentes nutricionalmente equivalentes, o procedimientos similares para la selección y recuperación de casos transgénicos.

Los medios nutrientes se preparan en forma de un líquido, pero estos pueden solidificarse añadiendo el líquido a materiales capaces de proporcionar un soporte sólido. El agar es el más habitualmente usado para este propósito. Bactoagar, agar Hazelton, Gelrite, y Gelgro son tipos específicos de soporte sólido que son adecuados para el crecimiento de células vegetales en cultivos tisular. Algunos tipos celulares crecerán y se dividirán en suspensión líquida o en medios sólidos o en ambos medios.

Las dianas celulares receptoras incluyen, aunque sin limitación, células meristemáticas, callos, embriones inmaduros y células gaméticas tales como el esperma de las microesporas del polen y los óvulos. Puede usarse cualquier célula a partir de la cual pueda regenerarse una planta transgénica fértil en ciertas realizaciones. Por ejemplo, pueden transformarse embriones inmaduros seguido de selección e inicio del callo y posterior regeneración de plantas transgénicas fértiles. La transformación directa de embriones inmaduros obvia la necesidad de desarrollo a largo plazo de cultivos celulares receptores. También pueden usarse células meristemáticas (es decir, células vegetales con capacidad de división celular continua y caracterizadas por un aspecto citológico indiferenciado, normalmente unidas en puntos o tejidos de crecimiento de las plantas tales como las puntas de las raíces, los ápices de los tallos, brotes laterales, etc.) como célula vegetal receptora. A causa de su crecimiento indiferenciado y su capacidad para la diferenciación en órganos y la totipotencia, podría recuperarse una planta transformada completa a partir de una única célula meristemática transformada.

Las células somáticas son de diversos tipos. Las células embriogénicas son un ejemplo de células somáticas que pueden inducirse a regenerar una planta a través de la formación de embriones. Las células no embriogénicas son aquellas que típicamente no responden de dicho modo.

Pueden usarse ciertas técnicas que enriquecen las células receptoras dentro de una población celular. Por ejemplo, el desarrollo de callos tipo II, seguido de la selección manual y cultivo del tejido embriogénico disgregable generalmente provoca un enriquecimiento de las células receptoras para su uso en, por ejemplo, transformación por microproyectil.

En ciertas realizaciones, las células receptoras se seleccionan después de su crecimiento en cultivo. Las células

cultivadas pueden hacerse crecer en soportes sólidos o en forma de suspensiones líquidas. En cualquier caso, pueden proporcionarse nutrientes a las células en forma de medio, y controlarse las condiciones ambientales. Hay muchos tipos de medios de cultivo tisular compuestos por aminoácidos, sales, azúcares, reguladores del crecimiento y vitaminas. La mayoría de los medios empleados en la práctica de la invención tendrán algunos componentes similares, aunque los medios pueden diferir en la composición y proporciones de los ingredientes de acuerdo con las prácticas de cultivo tisular conocidas. Por ejemplo, diversos tipos celulares crecen en más de un tipo de medio, pero mostrarán diferentes tasas de crecimiento y diferentes morfologías, dependiendo del medio de cultivo. En algunos medios, las células sobreviven pero no se dividen. La composición de medio también se optimiza frecuentemente en base a la especie o tipo celular seleccionado.

Se han descrito previamente diversos tipos de medios adecuados para el cultivo de células vegetales. Los ejemplos de estos medios incluyen, aunque sin limitación, el medio N6 descrito por Chu y col. (1975) y el medio MS (Murashige y Skoog, 1962). En algunas realizaciones, puede ser preferible usar un medio con una proporción amoníaco/nitrato algo inferior, tal como N6, para promover la generación de células receptoras manteniendo las células en un estado proembrionario capaz de soportar las divisiones. También puede usarse medio para plantas leñosas (WPM) (Lloyd y McCown, 1981).

El procedimiento de mantenimiento de los cultivos celulares puede contribuir a su utilidad como fuentes de células receptoras para su transformación. La selección manual de células para su transferencia a medio de cultivo fresco, la frecuencia de transferencia a medio de cultivo fresco, la composición del medio de cultivo, y los factores ambientales incluyendo, aunque sin limitación, la calidad y cantidad de luz y la temperatura son todos los factores para el mantenimiento de callos y/o cultivos en suspensión que son útiles como fuentes de células receptoras. Alternar el callo entre diferentes condiciones de cultivo puede ser beneficioso para enriquecer las células receptoras en un cultivo. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en cultivo en suspensión, pero transferirse a medio sólido a intervalos regulares. Después de un periodo de crecimiento en medio sólido, las células pueden seleccionarse manualmente para devolverlas a medio de cultivo líquido. Puede usarse la repetición de esta secuencia de transferencias a medio de cultivo fresco para enriquecer las células receptoras. Pasar cultivos celulares a través de un tamiz de 1,9 mm también puede ser útil para mantener la friabilidad de un callo o cultivo en suspensión y para enriquecer las células transformables cuando se usan dichos tipos celulares.

### C. Plantas transgénicas

Una vez se ha seleccionado una célula transgénica, la célula puede regenerarse en una planta transgénica fértil usando técnicas bien conocidas en la técnica. Las plantas transformadas pueden analizarse posteriormente para determinar la presencia o ausencia de un ácido nucleico particular de interés en una construcción de ADN. Los análisis moleculares pueden incluir, aunque sin limitación, transferencias de Southern (Southern, 1975) o análisis por PCR, enfoques de inmunodiagnóstico. También pueden usarse evaluaciones de campo. Estos y otros procedimientos bien conocidos pueden realizarse para confirmar la estabilidad de las plantas transformadas producidas por los procedimientos descritos. Estos procedimientos son bien conocidos para los especialistas en la técnica (Sambrook y col., 1989).

Por tanto pueden producirse plantas transgénicas que comprenden una secuencia codificante de DMO proporcionada en este documento. En particular, pueden transformarse plantas económicamente importantes, incluyendo cultivos, árboles, y otras plantas con construcciones de ADN de la presente invención de modo que sean tolerantes a dicamba o tengan tolerancia aumentada. Las plantas que se consideran actualmente tolerantes a herbicidas tipo auxina, por tanto, pueden transformarse para aumentar su tolerancia al herbicida. Algunos ejemplos no limitantes de plantas que pueden encontrar uso con la invención incluyen la alfalfa, la cebada, las judías, la remolacha, el brócoli, el repollo, la zanahoria, la canola, la coliflor, el apio, la col china, el maíz, el algodón, el pepino, la berenjena, el puerro, la lechuga, la sandía, la avena, la cebolla, el guisante, el pimiento, el cacahuete, la patata, la calabaza, el rábano, el arroz, el maíz dulce, el sorgo, la soja, la espinaca, el calabacín, la remolacha azucarera, el girasol, el tomate, el melón, y el trigo.

Una vez se ha preparado una planta transgénica que contiene un transgén, ese transgén puede introducirse en cualquier planta sexualmente compatible con la primera planta por cruce, sin la necesidad siquiera de transformar directamente la segunda planta. Por lo tanto, como se usa en este documento el término "descendencia" se refiere a los descendientes de cualquier generación de una planta parental preparada de acuerdo con la presente invención, donde la descendencia comprende una construcción de ADN seleccionada preparada de acuerdo con la invención. Una "planta transgénica" por tanto puede ser de cualquier generación. "Cruzar" una planta para proporcionar una línea de plantas que tenga uno o más transgenes o alelos añadidos con relación a una línea inicial de plantas, como se describe en este documento, se define como las técnicas que provocan que una secuencia particular se introduzca en una línea de plantas cruzando una línea inicial con una línea de plantas donante que comprende un transgén o alelo de la invención. Para conseguir esto se podrían realizar, por ejemplo, las siguientes etapas: (a) plantar semillas de la primera (línea inicial) y la segunda (línea de plantas donante que comprende un transgén o alelo deseado) plantas parentales; (b) hacer crecer las semillas de la primera y la segunda plantas parentales en plantas que alberguen flores; (c) polinizar una flor de la primera planta parental con polen de la segunda planta parental; y (d) recoger las semillas producidas en la primera planta que alberga la flor fertilizada.

La invención, por tanto, proporciona tejidos vegetales transgénicos que comprenden un ácido nucleico codificante de DMO proporcionado en este documento. Los tejidos pueden haberse transformado directamente con un ácido nucleico codificante de DMO o haber heredado el ácido nucleico de una célula progenitora. Los tejidos proporcionados por la invención incluyen específicamente, aunque sin limitación, células, embriones, embriones inmaduros, células meristemáticas, panojas inmaduras, microesporas, polen, hojas, anteras, raíces, puntas de las raíces, flores y semillas. Cualquiera de dichos tejidos, incluyendo cualquier parte de la planta, que comprenda un ácido nucleico descrito en este documento, se proporciona de este modo por la invención. Las semillas, en particular, encontrarán un beneficio particular para su uso, tanto uso para comercial como de alimentación en forma de grano, así como para plantarlas para hacer crecer cultivos adicionales.

## 10 **EJEMPLOS**

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar realizaciones de la invención. Los especialistas en la técnica deben apreciar que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención.

### **EJEMPLO 1**

#### 15 **Construcción de vector para diseñar por ingeniería genérica el gen DMO**

La secuencia codificante de la variante DMOc se generó inicialmente por amplificación por PCR a partir de un molde DMOw. En esta amplificación, la región codificante de DMOw se amplificó a partir del plásmido pPLH1, que contenía el gen DMOw en forma de un fragmento de ADN Xho I/Sst I de 3,5 kpb de *P. maltophilia*, cepa DI-6. Para la amplificación del ADN, se empleó un cebador 5' que insertaba un sitio de restricción Nco I cerca del extremo 5' del producto de PCR y un codón para alanina inmediatamente después del codón de inicio ATG y un cebador 3' que creaba un sitio de restricción Xba I en el extremo 3' del producto de PCR (los detalles del procedimiento se proporcionan a continuación). El cambio 112W a 112C se identificó posteriormente por secuenciación del ácido nucleico. Para la creación del vector de transformación de plantas, se insertó el gen DMOc usando los sitios Nco I y Xba I añadidos a los extremos 5' y 3', respectivamente, de la región codificante en el vector pRTL2 (Carrington y Freed, 1990) fusionando de este modo la región codificante al elemento potenciador de la traducción del virus del grabado del tabaco (líder de TEV) del vector. El sitio Nco I 5' se introdujo junto con la adición de un codón GCC (alanina) después del codón de inicio ATG y se creó un sitio de restricción Xba I en el extremo 3' de la región de codones usando cebadores de PCR diseñados específicamente. Para permitir el suministro de DMOc al cloroplasto, se colocó la región codificante del péptido de tránsito de cloroplastos del gen de la subunidad de la Rubisco del guisante (Coruzzi y col., 1983) cadena arriba de la región codificante de DMO para permitir su direccionamiento al cloroplasto. La secuencia codificante del péptido de tránsito portada en un fragmento Bgl II y EcoR I se clonó en los sitios BamH I y EcoR I del vector pBluescript II KS+. Esta construcción se usó como molde en una reacción de PCR que insertó un sitio Nco I tanto en el extremo 3' como en el extremo 5' de la secuencia del péptido de tránsito. El producto amplificado se clonó en el sitio Nco I del vector pRTL2 de modo que la secuencia del péptido de tránsito estuviera directamente cadena arriba y en fase con la región codificante del gen DMO. Se escindió un casete que constaba del líder de TEV, la región del péptido de tránsito y las secuencias codificantes de ADN de DMO del vector pRTL2 con Xho I y Xba I y se clonó en el vector pKLP36 (documento U.S. 5.850.019; FIG. 5) usando los mismos sitios de restricción para unir el casete a un promotor PCISV y la secuencia poli A de PsRbcS2-E9. El nuevo vector se llamó pKLP36-TEV-TP-DMOc (también denominado pKLP36-DMOc), y se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 EEUU el 2 de febrero de 2006, y se le asignó el número de acceso a la ATCC PTA-7357.

El vector pKLP36-DMOc se usó para transformar plantas de tabaco, *Arabidopsis* y de tomate. Para la transformación de la soja, el casete DMOc se cortó del pKLP36-TEV-TP-DMOc en forma de un segmento EcoR I/Acc I y se clonó en pPZP101 digerido con EcoR I/Acc I (Hajdukiewicz y col., 1994) para obtener los límites derecho e izquierdo. Este vector (pPZP101+casete DMOc) después se cortó con Scal y el casete DMOc se clonó en el vector binario pPTN200 (véase a continuación), un derivado de pPZP201 (Hajdukiewicz y col., 1994), que contiene un casete bar flanqueado por límites de ADN-T en la izquierda y la derecha y permite la selección de transformantes en regeneración en presencia del herbicida Basta. El nuevo vector binario de dos ADN-T se denominó pPTN348 y se usó para la transformación de la soja. El vector pPTN200 se preparó clonando primero promotor nos-elemento bar a partir de pGPTV-bar (Becker y col., 1992) en forma de un segmento PstI/BamHI en pPZP201 (véase Hajdukiewicz y col., 1994) y el plásmido resultante se llamó pPTN193. El terminador nos de pE7113-GUS (véase Mitsuhara y col., 1996) se clonó en pPTN 193 cadena abajo del promotor nos-elemento bar para obtener el casete bar.

Las enzimas de restricción y otras enzimas se obtuvieron de Fermentas o Invitrogen. DIG-11-dUTP (marcado con álcali), CSPD (listo para usar), los marcadores de peso molecular DIG III, anti-digoxigenina-AP (fragmentos Fab) y el reactivo de bloqueo se obtuvieron de Roche. La solución de prehibridación, ULTRAhyb, se obtuvo de Ambion. El marcador de peso molecular DIG-RNA I se obtuvo de Roche. El anticuerpo (de burro) anti-IgG de conejo, unido a peroxidasa y la membrana Hybond ECL (nitrocelulosa) se obtuvieron de Amersham Biosciences. Las transferencias de ADN, ARN y proteína, las técnicas de ADN recombinante, y otros procedimientos de biología molecular se realizaron usando técnicas convencionales (Ausubel y col., 1995).

## EJEMPLO 2

## Producción y análisis de plantas transgénicas

Se usaron tabaco, tomate, soja y *Arabidopsis* para la expresión transgénica del gen DMOc modificado por ingeniería genética y la confirmación de la tolerancia a dicamba en plantas que expresan el gen. La secuencia codificante de DMOc en el vector binario pKLP36 se introdujo en *A. tumefaciens* cepa C58C1 que contenía el plásmido Ti desactivado pMP90 (Koncz y Schell, 1986) por apareamiento triparental (Ditta 1980). Los transconjugantes resultantes se usaron para la transformación de tabaco (cv Xanthi) y tomate (cv Rutgers) usando el protocolo de disco foliar descrito por Horsch y col. (Horsch 1985). *Arabidopsis thaliana* se transformó por la técnica de inmersión floral (Clough y Bent, 1998). La transformación de las variedades de soja Thome y NE-3001 se realizó por el sistema de transformación mediado por *Agrobacterium* de nódulo cotiledonal (Zhang y col., 1999).

La transferencia génica mediada por *Agrobacterium* del gen DMOc al genoma nuclear de plantas de tabaco producto varias plantas de generación T<sub>1</sub> obtenidas independientemente. Las plantas se ensayaron para la presencia y expresión del gen DMOc usando análisis de transferencia de ADN, ARN y proteína. La FIG. 2 ilustra que, aunque todas las plantas transgénicas (carriles 1-6) en este análisis contenían los mismos fragmentos de ADN después de la digestión con enzimas de restricción que el gen DMO clonado (carril 8), el nivel de transcritos de ARNm y proteína DMO variaba significativamente entre transformantes. Por ejemplo, la planta cuyos extractos se representan en el carril 5 muestra niveles relativamente elevados de ARNm de DMO pero niveles muy bajos de la enzima. Por el contrario, se acoplaron niveles casi iguales de ARNm de DMO en los extractos mostrados en el carril 3 con una expresión de alto nivel de DMO. Sin embargo, se mostró que los acontecimientos con fuerte expresión podían obtenerse de forma habitual por este procedimiento.

Las plantas en el invernadero se pulverizaron con disolvente y dicamba de calidad comercial (Clarity; BASF) usando un pulverizador de carril, accionado por motor, de aire comprimido con una boquilla 8002E de ventilador plano que viaja a 0,83 m/s (1,87 mph). Los aditivos incluían: urea al 28%, nitrato de amonio al 1,25% v/v y tensioactivo no iónico al 1,0% v/v. La solución que contenía dicamba a diversas concentraciones se aplicó a 182 l/ha (40 galones por acre). Las plantaciones de campo de soja se pulverizaron con herbicida Clarity a 2,8 kg/ha (2,5 lb/ac).

Las plantas de tabaco, como la mayoría de las plantas dicotiledóneas, son bastante sensibles al tratamiento con dicamba. Esto se ilustró por comparación de plantas de tabaco no transgénicas no tratadas o tratadas con cantidades crecientes de dicamba. Los síntomas de daño del herbicida se detectaron fácilmente después de pulverizar dicamba a un nivel de 0,017 kg/ha. Los síntomas son bastante graves a 0,28 kg/ha y 0,56 kg/ha, los niveles normalmente usados para el control de malas hierbas en aplicaciones agrícolas.

El tratamiento post-aflorescencia de plantas transgénicas de tabaco que contenían DMOc con 5,6 kg/ha (10 a 20 veces mayor que las tasas de aplicación normales) causó pocos, si los había, síntomas mientras que una planta no transgénica padecía daño grave. El daño a las hojas inferiores de las plantas transgénicas podía duplicarse pulverizando las plantas con la solución de disolvente que contenía tensioactivo usada como vehículo para la aplicación de dicamba. Las hojas producidas después del tratamiento de las plantas transgénicas con dicamba no mostraron signos visibles de daño. Las plantas transgénicas de tomate que portaban el gen DMOc modificado por ingeniería genética, asimismo, no mostraron daño cuando se pulverizaban con elevados niveles de dicamba, en este caso particular, primero con 0,56 kg/ha y posteriormente con 5,6 kg/ha. *Arabidopsis thaliana* que expresaba el gen DMOc también presentó una fuerte tolerancia al tratamiento con dicamba. En este estudio, la concentración de dicamba empleada proporcionaba una dosis de 1,12 kg/ha. Un hallazgo inesperado fue la observación de que las plantas de tabaco transformadas con un gen DMOc que carecía de la región codificante del péptido de tránsito también eran tolerantes a tratamientos post-aflorescencia con dicamba a concentraciones sólo ligeramente por debajo del promedio de las plantas que albergaban genes DMOc con regiones codificantes del péptido de tránsito. En este estudio, los tratamientos se compararon usando 2,2 kg/ha de dicamba en dos plantas de tabaco T<sub>1</sub>, una que portaba DMOc que carecía de un péptido de tránsito de cloroplastos y la otra que carecía completamente del gen DMOc debido a la segregación genética. La última planta era completamente susceptible al daño causado por el tratamiento con dicamba y sucumbió al tratamiento (FIG. 3). La planta transgénica que portaba el gen DMOc que carecía del péptido de tránsito era completamente tolerante al tratamiento con dicamba a 2,2, kg/ha. Los estudios genéricos de la herencia del gen DMOc en plantas transgénicas de tabaco también demostraron que el rasgo se heredaba en la mayoría de las plantas de un modo mendeliano normal y que mantenía los niveles originales de expresión con respecto a la tolerancia al herbicida.

En soja, se produjeron más de 50 acontecimientos de soja transgénica R<sub>0</sub> y se recogieron semillas de la generación T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, y T<sub>3</sub>. Como se usó un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens*, se recuperaron tanto plantas transgénicas que albergaban un gen marcador como plantas transgénicas sin marcador que contenían el gen DMOc. En cualquier caso, la mayoría de las líneas transgénicas de soja mostraron tolerancia significativa al tratamiento con dicamba a 2,8 kg/ha y 5,6 kg/ha en condiciones de invernadero y fuerte tolerancia a dicamba a 2,8 kg/ha (el mayor nivel ensayado) en dos años de ensayos de campo. Estos resultados sugieren un amplio margen de seguridad para la soja transgénica y otros cultivos que portan el gen DMOc unido a un control altamente eficaz de una amplia gama de malas hierbas latifoliadas.

Los elevados niveles de resistencia a dicamba en plantas transgénicas de soja que albergan el gen DMO indican la capacidad de aplicar dicamba en campos de soja para suprimir en gran medida la competencia de malas hierbas latifoliadas sin daño al cultivo. Además, los cultivos resistentes a dicamba pueden ser un complemento importante a las actuales opciones de control de malas hierbas usando cultivos transgénicos tolerantes a herbicidas. Es decir, pueden ser un punto fuerte valioso en las estrategias para controlar las malas hierbas resistentes a herbicidas actualmente existentes y para suprimir la aparición de malas hierbas adicionales resistentes a herbicidas que finalmente podrían amenazar el uso a largo plazo y el valor de los herbicidas actuales y los cultivos tolerantes a herbicidas.

### EJEMPLO 3

#### 10 Sobre-expresión, purificación y comparación de las propiedades enzimáticas de DMOw y DMOc

##### A. Clonación y sobre-expresión

Las secuencias codificantes de DMO de tipo silvestre (DMOw) y variante (DMOc) se clonaron a partir de los plásmidos pMON95900DMO (DMOw) y pMON58499DMO (DMOc) en el vector pET28b (Novagen, San Diego, CA) y se introdujeron por transformación en células BL21 de *Escherichia coli* (Novagen, San Diego, CA). Las células se cultivaron en 1 litro de caldo Luria-Bertani a 37°C a una absorbancia a 600 nm de 0,4 a 0,6. La expresión proteica se indujo añadiendo  $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  50  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Na}_2\text{S}$  100  $\mu\text{M}$ , e isopropil-beta-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM y las células se cambiaron después a 15°C. Después de 48-72 horas a 15°C, las células se recogieron por centrifugación a 10000xg durante 20 minutos. Para uso posterior, las células se almacenaron a -20°C.

El rendimiento de la expresión proteica en *E. coli* para DMOw y DMOc fue diferente. Aunque la producción de DMOw fue de aproximadamente 100 a 150 mg de proteína pura por litro de medio LB, la producción de DMOc fue 10 veces inferior, o de aproximadamente 10 a 15 mg de proteína pura por litro. Esto no se había previsto ya que *E. coli* no tiene codones raros para cisteína y hay solamente un codón para triptófano, pero en ambos casos se mostró capacidad de producir las proteínas de formar heteróloga en *E. coli* independientemente del rendimiento. La cantidad de proteína en los cuerpos de inclusión fue baja en ambos casos, lo que sugiere que la proteína principalmente permanece en la fracción soluble.

Se purificó la proteína DMOw recombinante marcada con His de *Pseudomonas maltophilia*, cepa DI-6 y la proteína DMOc recombinante marcada con His expresada en la cepa BL21 de *E. coli*, hasta homogeneidad por cromatografía en columna de Ni-NTA. Las células se suspendieron en tampón de lisis (NaPi 100 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, e imidazol 10 mM) y se alteraron por sonicación. El lisado celular se centrifugó a 55000xg durante 1 hora. El sobrenadante se cargó en una columna de Ni-NTA, que se lavó con tampón de lavado (NaPi 100 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, e imidazol 20 mM) para retirar las proteínas que no se unen específicamente a la resina. La proteína marcada con His se eluyó con tampón de elución (NaPi 100 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, e imidazol 250 mM). Para la purificación de DMOw, un gradiente por etapas fue suficiente para obtener la enzima pura al 95%, mientras que para DMOc, se necesitó un gradiente lineal de 20 a 250 mM de concentración de imidazol para conseguir el mismo nivel de pureza. La enzima que se eluyó de la columna era pura a aproximadamente el 95% según la estimación por transferencias de proteína (transferencias de western) de la enzima después del fraccionamiento por tamaño en electroforesis en el de SDS-poliacrilamida. Una única banda principal a aproximadamente 40 kDa (enzima DMO de 37,3 kDa más 3 kDa para la marca His), indicó que la proteína correcta se había super-producido.

##### B. Ensayo para DMOc y DMOw y cinética en estado estacionario

Las concentraciones de proteína se determinaron por ensayo de Bradford con IgG de conejo como patrón. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. La actividad DMO se midió después de la formación de DCSA que se separó por HPLC (Waters Corporation, Milford, MA) usando una columna Discovery C18 (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El tiempo de retención para DCSA era de 8 minutos y para dicamba era de 9,5 minutos. Para los estudios cinéticos, se detectó el DCSA y se cuantificó por emisión de fluorescencia a 420 nm (longitud de onda de excitación de 310 nm) después de su separación en la columna de HPLC de mezcla de reacción. Se usaron concentraciones establecidas de DCSA (12 y 24  $\mu\text{M}$ ) como patrones de cuantificación.

Se usaron solución madre de dicamba (100, 200, 400, 800, 1000, 2000, 5000, y 10000  $\mu\text{M}$ ), KPi 0,1 M pH 7,2,  $\text{FeSO}_4$  0,1 M, NADH 0,1 M, y  $\text{MgCl}_2$  1 M. Los ensayos se realizaron a 30°C durante 20 minutos y la reacción se interrumpió por la adición de 40  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Para las mediciones de actividad, DMO se acopló con un exceso de ferredoxina y reductasa purificadas de *P. maltophilia* cepa DI-6.

Como el ensayo para la actividad DMO fue un ensayo discontinuo, fue importante establecer el tiempo durante el cual tiene que proceder el ensayo para obtener parámetros cinéticos significativos. Por tanto el ensayo tiene que proceder en condiciones iniciales ya que la cantidad de DCSA producida es lineal durante el tiempo que está procediendo el ensayo (FIG. 4). Los resultados sugerían que el ensayo podía proceder entre 20 a 30 minutos y aún mantener la linealidad. La FIG. 5 muestra que el pH óptimo para el ensayo realizado en presencia de tampón Kpi 0,1 M era de 7,2 y la temperatura óptima se halló a aproximadamente 37°C (FIG. 6).

### C. Análisis de los datos cinéticos

Los parámetros de Michaelis-Menten se determinaron ajustando los datos a una ecuación en estado estacionario no lineal (Ecuación 1). Los datos se analizaron usando Sigma plot 8.0 (Jandel Scientific).

$$V_0 = V_{\max} * [S] / (K_m + [S]) \quad \text{Ecuación 1}$$

- 5 También se determinaron el pH y la temperatura óptimos para DMOw y DMOc. El pH óptimo se midió a 30°C durante 20 minutos y la determinación de la temperatura óptima se midió también durante 20 minutos a pH 7,2 para ambas formas de la enzima. Los resultados se resumen en las FIG. 7-9 y se analizan a continuación.

10 Los estudios muestran que DMOw y DMOc difieren en las propiedades cinéticas. Por ejemplo, los parámetros de Michaelis-Menten calculados para DMOw y DMOc son: para DMOw,  $K_m = 49 \pm 7 \mu\text{M}$  y  $V_{\max} = 633 \pm 24$  nmoles/min/mg, y para DMOc,  $K_m = 20,5 \pm 5 \mu\text{M}$  y  $V_{\max} = 676 \pm 37$  nmoles/min/mg. Estos resultados se muestran en las FIG. 10 y 11 y se resumen en la siguiente Tabla 1. Además, dos análisis adicionales realizados para DMOw y DMOc produjeron resultados similares (Tabla 2 y 3).

15 Como puede observarse, en términos de eficacia catalítica, las enzimas DMOw y DMOc tienen diferentes propiedades: DMOc es una enzima cinco veces mejor que DMOw por este análisis. El perfil de pH para DMOc es diferente al de DMOw. Primero, parece que DMOc es sensible al sistema tamponante usado (TRIS frente a KPi) por comparación con DMOw (FIG. 9, 12, y 13). Segundo, DMOc muestra una actividad estacionaria sobre un amplio intervalo de pH cuando se ensaya en tampón KPi por comparación con TRIS cuando la actividad de DMOc disminuye con aumentos en unidades de pH. Los perfiles de temperatura para DMOc incubada en tampón KPi o TRIS son similares.

- 20 Mirando los perfiles de temperatura entre estas dos formas de la enzima, DMOw funcionaba mejor a 37°C mientras que DMOc funcionaba mejor a temperaturas algo inferiores (FIG. 9). La FIG. 9 indica una temperatura óptima inferior para DMOc, que puede ser útiles en plantas transgénicas pronto en la temporada de cultivo.

**Tabla 1.** Los parámetros cinéticos en estado estacionario para DMOw y DMOc.

Enzima	$K_m$ (M)	$V_{\max}$ (U/mg)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
DMOw	$49 \pm 7 \times 10^{-6}$	$633 \pm 24 \times 10^{-3}$	36,63	$7,47 \times 10^5$
DMOc	$20 \pm 5 \times 10^{-6}$	$676 \pm 37 \times 10^{-3}$	70,41	$35,21 \times 10^5$

25 **Tabla 2.** Sumario de los parámetros de Michaelis-Menten para DMOw.

Estudio nº	$R_{\text{sqr}}$	$V_{\max}$ (nmoles/min/mg)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )
1.	0,983	$633 \pm 24$	$49 \pm 7$
2.	0,988	$583 \pm 18$	$46 \pm 5$
3.	0,987	$590 \pm 19$	$46 \pm 5,5$

**Tabla 3.** Sumario de los parámetros de Michaelis-Menten para DMOc.

Estudio nº	$R_{\text{sqr}}$	$V_{\max}$ (nmoles/min/mg)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )
1.	0,933	$713 \pm 43$	$21 \pm 6$
2.	0,948	$676 \pm 37$	$20 \pm 5$

### EJEMPLO 4

#### 30 Análisis bioinformático de las regiones conservadas de DMO

Se realizó un análisis bioinformática para comparar la secuencia polipeptídica de DMO con otras oxigenasas de hierro-azufre y para identificar las regiones conservadas. Inicialmente, se seleccionaron 78 secuencias para el análisis en base al punto de corte de valor e  $1e-08$  y una cobertura del 70% de la secuencia de DMO sobre la alineación de secuencia. El análisis adicional de estas 78 secuencias reveló la presencia de dos dominios que se

habían identificado en otros estudios, incluyendo los dominios de Rieske y de Fe no hemo (Herman y *col.*, 2005). De estas 78 secuencias, 68 contenían ambos dominios, mientras 10 tenían solamente uno de los dominios. Las 68 moléculas con los dos dominios se usaron para el análisis adicional de motivos.

5 La alineación de las 68 moléculas con ambos dominios en diferentes niveles de identidad reveló un nuevo motivo WXWX. Aunque algunas secuencias no contenían el motivo, el análisis filogenético indicó que las moléculas sin el motivo estaban en ciertos clados del árbol filogenético que no pretenden al mismo grupo que las moléculas con el motivo. Aquellas moléculas sin el motivo, por lo tanto, se eliminaron de la base de datos original, dejando 52 secuencias restantes que se re-alinearon para análisis adicional.

10 Las 52 secuencias re-alineadas mostraron conservación alrededor de dos restos de W que contenían el siguiente formato:  $WX_1WX_2G$  (W es Trp, G es el resto Gly,  $X_1$  es un resto no polar, y  $X_2$  es cualquier aminoácido). El segundo W en este caso corresponde a la posición 112 de la SEC ID N° 1. El motivo WXG de  $WX_1WX_2G$  se ha presentado recientemente y proteínas con el motivo WXG está relacionadas con el sistema de secreción celular (Desvaux y *col.*, 2005).

15 El triptófano (W) y la cisteína (C) son restos con tamaños remarcadamente diferentes. El W es un resto grande, mientras que la C es uno relativamente pequeño. Como tanto W como C son aminoácidos polares, comparten algunos caracteres comunes, tales como la donación de protones. Como el resto de W está codificado por TGG y la Cys por TGC y TGT, ciertas conversiones en el tercer código (G->C o G->T) pueden producir una mutación sin sentido del W a C o de la C a W. Dichas conversiones se han identificado en la naturaleza y las bio-funciones y las actividades se cambiaron por esas mutaciones (véase, por ejemplo el gen BRCA1 en cáncer de mama y ovario hereditario (Xiaoman y Jinghe, 1999); la deficiencia del factor de coagulación XII (Wada y *col.*, 2003), y la mutación de la lipoproteína lipasa en hiperlipoproteinemia tipo I (Hoffmann y *col.*, 2000)).

20 Los resultados anteriores, por lo tanto, indicaron que, aunque la DMO es única y tiene baja identidad con las enzimas conocidas, el W112 está conservado en otras oxigenasas de hierro-azufre relacionadas. Además, la posición 112 está unida por dos dominios funcionales conservados (FIG. 18). Además, las conversiones de W a C típicamente afectan a la bioactividad. Por tanto fue particularmente sorprendente el hallazgo de que la DMOc producía una enzima funcional con parámetros cinéticos superiores que los de la enzima DMOw de tipo silvestre y producía una tolerancia de elevado nivel a dicamba cuando se expresaba en plantas transgénicas.

## EJEMPLO 5

### La DMO codificada en cloroplasto producía un elevado nivel de resistencia a dicamba

30 Para determinar si la DMO podría funcionar exclusivamente en el interior de los cloroplastos y para explorar la posibilidad de limitar el "gen propagado" a través del polen arrastrado, se crearon construcciones basadas en el vector pFMDV1 (por ejemplo, Svab y *col.*, 1990) para permitir la integración del gen DMOc en el genoma del cloroplasto del tabaco por recombinación homóloga y aislamiento de los transformantes usando selección para la resistencia a antibióticas (FIG. 14). En esta construcción, la región codificante del gen DMOc está dirigida por el promotor del gen psbA del cloroplasto que contiene la secuencia 5' UTR completa de de psbA. Los análisis iniciales de transferencia de ADN de las plantas transgénicas resistentes a antibióticos (FIG.15A) demostraron la presencia en los genomas cloroplásticos tanto del transgén DMOc (banda de 5,6 kb) como de la región génica nativa (banda de 3,3 kb) remplazada por integración homóloga del gen DMOc (es decir, los cloroplastos eran heteroplásticos para el gen nativo y el transgén DMOc). La regeneración y selección repetida de plantas transgénicas en medio que contenía antibiótico produjo cloroplastos aparentemente homoplásticos que albergaban el fragmento del gen DMOc pero no la región génica nativa remplazada (FIG. 15B).

45 Se ensayaron las generaciones  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$  de la descendencia de dos transformantes cloroplásticos obtenidos independientemente para la tolerancia al tratamiento con dicamba a diversas dosis. Todos mostraron elevados niveles de tolerancia. De hecho, los transformantes del genoma cloroplástico no presentaron daño aparente (diferente al "daño solamente del disolvente" en las hojas inferiores) cuando se pulverizaron con a una tasa de 28 kg/ha (25 lb/ac) (FIG. 16) y se observó daño solamente transitoria cuando las plantas se trataron con aplicaciones extremadamente altas de dicamba de 112 y 224 kg/ha. A estos niveles extremadamente altos, se causaba un daño inicial principalmente por los tensioactivos y otros componentes del disolvente en el que se suministraba el dicamba; los tejidos que crecen a partir del ápice dañado presentaban fenotipos casi normales a normales, lo que muestra ausencia de disminución en las tasas de crecimiento después de la atrofia inicial y retenía la capacidad de producir cantidades habituales de semillas y en su calidad habitual.

50 Los resultados eran coherentes con la posibilidad de que la ferredoxina reducida en cloroplastos del tabaco podía ser el donante a la DMO de los electrones necesarios para la oxidación de dicamba en DCSA. Como ensayo directo de esta posibilidad, se examinó la capacidad de la ferredoxina purificada de la espinaca de soportar la conversión de dicamba en DCSA en presencia y ausencia de DMO purificada de *P. maltophilia*, cepa DI-6, o super-producida y purificada de *E. coli* (Tabla 4). Los resultados demostraron que la ferredoxina reducida de la espinaca o Clostridium era completamente capaz de donar electrones a DMO *in vitro* medido por degradación de dicamba o aparición de DCSA.

**Tablas 4A-B.** La dicamba monooxigenasa purificada puede utilizar la ferredoxina reducida del cloroplasto o la ferredoxina reducida de *Clostridium* como fuente de electrones para catalizar la conversión *in vitro* de dicamba en ácido 3,6-diclorosalicílico.

**Tabla 4A-**Degradación de dicamba

Tipo de reacción	Degradación de dicamba (%)
(Ferr +Red) <sub>DI-6</sub> +NADH	0
(Oxi + Ferr + Red) <sub>DI-6</sub> + NADH	86
(Oxi) <sub>DI-6</sub> + (Ferr) <sub>espinaca</sub> + (Ferr:Oxidored) <sub>espinaca</sub> + NADPH	83
(Oxi) <sub>DI-6</sub> + (Ferr:Oxidored) <sub>espinaca</sub> + NADPH	ND
(Oxi) <sub>DI-6</sub> + (Ferr) <sub>espinaca</sub> + (Ferr:Oxidored) <sub>espinaca</sub> + No NADPH	ND
(Oxi) <sub>DI-6</sub> + (Ferr) <sub>clostridium</sub> + (Ferr:Oxidored) <sub>espinaca</sub> +NADPH	82
(Ferr) <sub>clostridium</sub> + (Ferr:Oxidored) <sub>espinaca</sub> + NADPH	ND

5

**Tabla 4B-**Formación de DCSA

Tipo de reacción	Formación de DCSA (%)
(Ferr +Red) <sub>DI-6</sub> + NADH	ND
(Oxi + Ferr + Red) <sub>DI-6</sub> + NADH	100
(Oxi) <sub>DI-6</sub> + (Ferr) <sub>espinaca</sub> + (Ferr:Oxidored) <sub>espinaca</sub> + NADPH	95
(Oxi) <sub>DI-6</sub> + (Ferr:Oxidored) <sub>espinaca</sub> + NADPH	2,5
(Oxi) <sub>DI-6</sub> + (Ferr) <sub>espinaca</sub> + (Ferr:Oxidored) <sub>espinaca</sub> + No NADPH	1,2
(Oxi) <sub>DI-6</sub> + (Ferr) <sub>clostridium</sub> + (Ferr:Oxidored) <sub>espinaca</sub> + NADPH	90
(Ferr) <sub>clostridium</sub> + (Ferr:Oxidored) <sub>espinaca</sub> +NADPH	1,5
ND, No determinado	

Aunque los resultados de la FIG. 2 mostraron que los niveles de DMO producidos eran variables y algunas veces los niveles de DMOc no se correlacionaban mucho con los niveles de tolerancia a dicamba, los resultados demostraron la capacidad de obtener de forma habitual una tolerancia de elevado nivel a dicamba. Se mostró la producción de DMOc a partir tanto de un gen DMOc localizado en el núcleo como de un gen DMOc localizado en el cloroplasto en transformantes. En transformantes nucleares ninguno constituía un nivel excepcionalmente alto de DMOc total con relación a las proteínas totales y la cantidad de DMOc en los transformantes cloroplásticos no era muy diferente y a veces inferior a los transformantes nucleares. Las estimaciones de la actividad enzimática relativa en extractos sin células de muestras de tejido foliar indicaron que es activo un porcentaje mayor de la DMOc producida en los cloroplastos que la DMOc sintetizada en el citoplasma y supuestamente transferida a los cloroplastos.

En todas las plantas analizadas, la tolerancia a dicamba se conseguía sin cotransformación con genes de ferredoxina o reductasa. Los resultados demostraron que las plantas contenían una o más moléculas que podían transferir electrones necesarios a la DMO para permitir la conversión de dicamba en ácido 3,6-diclorosalicílico (DCSA). El direccionamiento inicial de la DMO a los cloroplastos usando una secuencia del péptido de tránsito se abordó potencialmente utilizando ferredoxina reducida abundantemente disponible en los cloroplastos. A este respecto, es de interés observar que la transformación de plantas de tabaco con una construcción génica de DMOc que carece de una secuencia codificante del péptido de cloroplastos producía inesperadamente plantas que eran tolerantes al tratamiento post-afloramiento con dicamba. Los resultados de ensayos limitados con una pequeña cantidad de plantas de la generación T<sub>1</sub>, no obstante, indicaron que el nivel de tolerancia obtenido con estas plantas transgénicas era ligeramente inferior en promedio que el obtenido con plantas de tabaco que producían DMOc que contenía un péptido de tránsito. Estas observaciones suscitan cuestiones interesantes respecto a las moléculas en plantas transgénicas que pueden donar de forma productiva electrones a DMO. El hecho de que los cloroplastos homoplásticos que producen DMO de forma interna a partir de un gen DMOc integrado en el genoma del cloroplasto

muestran resistencia a niveles extremadamente elevados de dicamba (FIG. 16) y el hecho de que la DMO purificada pueda funcionar *in vitro* con ferredoxina cloroplástica reducida de la espinaca (Tabla 4) sugieren que la ferredoxina cloroplástica puede interactuar de forma productiva con DMO para permitir la transferencia de electrones. Sin embargo, la fuente de electrones para la DMO producida a partir de genes nucleares que carecen de una secuencia codificante del péptido de tránsito de cloroplastos sigue siendo desconocida. Suponiendo que las ferredoxinas no residen fuera de los cloroplastos de la planta, debe considerarse la posibilidad de que una proteína citoplasmática desconocida pueda proporcionar a DMO un suministro continuo de electrones. Como alternativa, la propia DMO puede contener un péptido de tránsito de cloroplastos gratuito que permita que entre suficiente DMO en los cloroplastos para proporcionar protección contra el dicamba que se mueve al interior de la célula después del tratamiento con dicamba.

## **REFERENCIAS**

Patente de Estados Unidos 4.554.101; patente de Estados Unidos 4.940.838; patente de Estados Unidos 5.015.580; patente de Estados Unidos 5.017.692; patente de Estados Unidos 5.229.114; patente de Estados Unidos 5.304.730; patente de Estados Unidos 5.322.938; patente de Estados Unidos 5.352.605; patente de Estados Unidos 5.359.142; patente de Estados Unidos 5.362.865; patente de Estados Unidos 5.378.619; patente de Estados Unidos 5.384.253; patente de Estados Unidos 5.445.962; patente de Estados Unidos 5.463.175; patente de Estados Unidos 5.464.763; patente de Estados Unidos 5.508.184; patente de Estados Unidos 5.512.466; patente de Estados Unidos 5.516.671; patente de Estados Unidos 5.530.196; patente de Estados Unidos 5.538.880; patente de Estados Unidos 5.543.576; patente de Estados Unidos 5.550.318; patente de Estados Unidos 5.552.299; patente de Estados Unidos 5.567.600; patente de Estados Unidos 5.567.862; patente de Estados Unidos 5.591.616; patente de Estados Unidos 5.633.435; patente de Estados Unidos 5.635.055; patente de Estados Unidos 5.641.876; patente de Estados Unidos 5.659.122; patente de Estados Unidos 5.689.041; patente de Estados Unidos 5.689.052; patente de Estados Unidos 5.716.837; patente de Estados Unidos 5.728.925; patente de Estados Unidos 5.750.876; patente de Estados Unidos 5.763.241; patente de Estados Unidos 5.763.245; patente de Estados Unidos 5.773.696; patente de Estados Unidos 5.804.425; patente de Estados Unidos 5.824.877; patente de Estados Unidos 5.837.848; patente de Estados Unidos 5.850.019; patente de Estados Unidos 5.850.023; patente de Estados Unidos 5.866.775; patente de Estados Unidos 5.869.720; patente de Estados Unidos 5.880.275; patente de Estados Unidos 5.942.658; patente de Estados Unidos 5.942.664; patente de Estados Unidos 5.958.745; patente de Estados Unidos 5.959.091; patente de Estados Unidos 5.981.834; patente de Estados Unidos 5.981.840; patente de Estados Unidos 5.985.605; patente de Estados Unidos 5.998.700; patente de Estados Unidos 6.011.199; patente de Estados Unidos 6.013.864; patente de Estados Unidos 6.015.940; patente de Estados Unidos 6.023.013; patente de Estados Unidos 6.051.753; patente de Estados Unidos 6.063.597; patente de Estados Unidos 6.063.756; patente de Estados Unidos 6.072.103; patente de Estados Unidos 6.080.560; patente de Estados Unidos 6.093.695; patente de Estados Unidos 6.107.549; patente de Estados Unidos 6.110.464; patente de Estados Unidos 6.121.436; patente de Estados Unidos 6.140.075; patente de Estados Unidos 6.140.078; patente de Estados Unidos 6.153.814; patente de Estados Unidos 6.156.573; patente de Estados Unidos 6.160.208; patente de Estados Unidos 6.166.292; patente de Estados Unidos 6.171.640; patente de Estados Unidos 6.175.060; patente de Estados Unidos 6.177.611; patente de Estados Unidos 6.177.615; patente de Estados Unidos 6.215.048; patente de Estados Unidos 6.221.649; patente de Estados Unidos 6.222.098; patente de Estados Unidos 6.225.114; patente de Estados Unidos 6.228.623; patente de Estados Unidos 6.228.992; patente de Estados Unidos 6.232.526; patente de Estados Unidos 6.235.971; patente de Estados Unidos 6.242.241; patente de Estados Unidos 6.248.536; patente de Estados Unidos 6.248.876; patente de Estados Unidos 6.252.138; patente de Estados Unidos 6.271.443; patente de Estados Unidos 6.281.016; patente de Estados Unidos 6.284.949; patente de Estados Unidos 6.294.714; patente de Estados Unidos 6.313.378; patente de Estados Unidos 6.316.407; patente de Estados Unidos 6.326.351; patente de Estados Unidos 6.372.211; patente de Estados Unidos 6.380.462; patente de Estados Unidos 6.380.466; patente de Estados Unidos 6.384.301; patente de Estados Unidos 6.399.330; patente de Estados Unidos 6.399.861; patente de Estados Unidos 6.403.865; patente de Estados Unidos 6.423.828; patente de Estados Unidos 6.426.446; patente de Estados Unidos 6.426.447; patente de Estados Unidos 6.429.357; patente de Estados Unidos 6.429.362; patente de Estados Unidos 6.433.252; patente de Estados Unidos 6.437.217; patente de Estados Unidos 6.441.277; patente de Estados Unidos 6.444.876; patente de Estados Unidos 6.448.476; patente de Estados Unidos 6.459.018; patente de Estados Unidos 6.468.523; patente de Estados Unidos 6.476.295; patente de Estados Unidos 6.483.008; patente de Estados Unidos 6.489.461; patente de Estados Unidos 6.495.739; patente de Estados Unidos 6.501.009; patente de Estados Unidos 6.506.962; patente de Estados Unidos 6.518.488; patente de Estados Unidos 6.521.442; patente de Estados Unidos 6.531.648; patente de Estados Unidos 6.537.750; patente de Estados Unidos 6.537.756; patente de Estados Unidos 6.538.109; patente de Estados Unidos 6.538.178; patente de Estados Unidos 6.538.179; patente de Estados Unidos 6.538.181; patente de Estados Unidos 6.541.259; patente de Estados Unidos 6.555.655; patente de Estados Unidos 6.573.361; patente de Estados Unidos 6.576.818; patente de Estados Unidos 6.589.767; patente de Estados Unidos 6.593.293; patente de Estados Unidos 6.596.538; patente de Estados Unidos 6.608.241; patente de Estados Unidos 6.617.496; patente de Estados Unidos 6.620.988; patente de Estados Unidos 6.635.806; patente de Estados Unidos 6.639.054; patente de Estados Unidos 6.642.030; patente de Estados Unidos 6.645.497; patente de Estados Unidos 6.653.280; patente de Estados Unidos 6.653.530; patente de Estados Unidos 6.657.046; patente de Estados Unidos 6.660.849; patente de Estados Unidos 6.663.906; patente de Estados Unidos 6.686.452; patente de Estados Unidos 6.706.950; patente de Estados Unidos 6.713.063; patente de Estados Unidos 6.716.474; patente de Estados Unidos 6.723.837; patente de Estados Unidos 6.723.897; patente de Estados Unidos 6.770.465; patente de Estados Unidos 6.774.283; patente de Estados Unidos 6.803.501; patente de Estados Unidos 6.809.078;

patente de Estados Unidos 6.812.379; patente de Estados Unidos 6.822.141; patente de Estados Unidos 6.828.475; patente de Estados Unidos N° 7.022.896; publicación de patente de Estados Unidos 2003/0028917; publicación de patente de Estados Unidos 2003/0135879; publicación de patente de Estados Unidos 2003/01403641; patente de Estados Unidos serie 09/757.089; patente de Estados Unidos RE37.543; patente de Estados Unidos RE38.446

- 5 Ausubel y col., En: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, Nueva York, 1995.  
 Becker y col., *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197, 1992.  
 Becker y col., *Plant Mol. Biol.*, 20:49, 1992.  
 Bevan y col., *NAR*, 11:369, 1983.  
 Brothers y col., *Nature*, 433:630, 2005.
- 10 Carrington y Freed, *J. of Virology* 64:1590-1597, 1990.  
 Carrington y Freed, *J. Virology*, 64:1590, 1990.  
 Chalfie y col., *Science*, 263:802, 1994.  
 Chandler y col., *Plant Cell*, 1:1175-1183, 1989.  
 Chang y col., *J. Biol. Chem.*, 31; 278(44):42821-42828, 2003.
- 15 Chu y col., *Scientia Sinica*, 18:659, 1975.  
 Clough y Bent, *Plant J.*, 16:735, 1998.  
 Cork y Khalil, *Adv. Appl. Microbiol.*, 40: 289, 1995.  
 Cork y Krueger, *Adv. Appl. Microbiol.*, 38:1, 1991.  
 Coruzzi y col., *EMBO J.*, 3: 1671, 1984.
- 20 Coruzzi y col., *J. Biol. Chem.* 258:1399-1402, 1983.  
 Creissen y col., *Plant J.*, 2:129, 1991.  
 Crop Protection Reference, *Chemical & Pharmaceutical Press, Inc.*, NY, 11<sup>a</sup> Ed., 1803-1821, 1995.  
 De Block y col., *EMBO J.*, 3:1681, 1984.  
 della-Cioppa y col., *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 83:6873-6877, 1986.
- 25 Depicker et al, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1:561, 1982.  
 Desvaux y col., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1745:223-253, 2005.  
 Ditta y col., *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 77(12):7347-7351, 1980.  
 Ebert y col., *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 84:5745-5749, 1987.  
 Solicitud EP 553494.
- 30 Solicitud EP 646643.  
 Fraley y col., *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 80:4803, 1983.  
 Hajdukiewicz y col., *Plant Mol. Biol.* 25:989-994, 1994.  
 Haseloff y col., *TIG*, 11:328-329, 1995.  
 Herman y col., *J. Biol. Chem.*, 280:24759-24767, 2005.
- 35 Hoffmann y col. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85(12):4795-498, 2000.  
 Horsch y col., *Science*, 227:1229, 1985.  
 Ingelbrecht y col., *Plant Cell*, 1:671, 1989.  
 Jefferson, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5:387, 1987.

- Jiang y col., *J. Bacteriol.* 178:3133-3139, 1996.
- Kado, *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 10:1, 1991.
- Klee y col., *Mol. Gen. Genet.*, 210:437-442, 1987.
- Koncz y Schell, *Mol. Gen. Genet.*, 204:383-396, 1986.
- 5 Koncz y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84:131, 1987.
- Krueger y col., *J. Agric. Food Chem.*, 37:534, 1989.
- Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lawton y col., *Plant Mol. Biol.*, 9:315-324, 1987.
- Lloyd y McCown, *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30:421, 1981.
- 10 Maniatis, y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982.
- Mason, JR, y Cammack, R., *Annu. Rev. Microbiol.* 46:277-305, 1992.
- Miki y col., En: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick y Thompson (Eds.), CRC Press, 67-88, 1993.
- Mitsuhara y col., *Plant Cell Physiol.* 37:49-59, 1996.
- 15 Moloney y col., *Plant Cell Reports*, 8:238, 1989.
- Murashige y Skoog, *Physiol. Plant*, 15:473-497, 1962.
- Odell y col., *Nature*, 313:810-812, 1985.
- Solicitud PCT WO 04009761
- Solicitud PCT WO 95/24492
- 20 Solicitud PCT WO 97/11086
- Solicitud PCT WO 97/31115
- Solicitud PCT WO 97/41228
- Rojiyaa y col., (documento JP 1987201527-A), 1987.
- 25 Sambrook y col., En: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Southern, *Mol. Biol.*, 98:503, 1975.
- Svab y col., *Plant Mol. Biol.*, 14:197, 1990.
- Svab y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(21):8526-8530, 1990.
- Teeri y col., *EMBO J.*, 8:343, 1989.
- 30 Turner y Foster, *Molec. Biotechn.*, 3:225, 1995.
- Wada y col., *Thromb. Haemost.*, 90(1):59-63, 2003.
- Walker y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6624-6628, 1987.
- Xiaoman y Jinghe, *Chin. Med. Sci. J.*, 14(4):195-199, 1999.
- Yang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.
- 35 Zhang y col., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56: 37-46, 1999.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CLEMENTE, THOMAS E.

DUMITRU, RAZVAN

FENG, PAUL C. C.

FLASINSKI, STAN

WEEKS, DONALD P.

5 <120> ENZIMA DMO MODIFICADA Y PROCEDIMIENTOS DE USO

<130> MONS: 093WO

<140> PCTUS0770514

<141> 06-06-2007

<150> DESCONOCIDO

10 <151> 06-06-2007

<150> 11/758.657

<151> 05-06-2007

<150> 60/811.152

<151> 06-06-2006

15 <160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 340

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 1

25 Met Ala Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu  
 20 25 30  
 Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile  
 35 40 45  
 30 Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly  
 50 55 60  
 His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln  
 65 70 75 80  
 Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn  
 85 90 95

35

Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys  
 100 105 110  
 Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly  
 115 120 125  
 5 Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val  
 130 135 140  
 Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His  
 145 150 155 160  
 Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg  
 165 170 175  
 10 Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met  
 180 185 190  
 Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg  
 195 200 205  
 Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys  
 210 215 220  
 15 Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly  
 260 265 270  
 20 Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln  
 275 280 285  
 Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg  
 290 295 300  
 25 Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys  
 305 310 315 320  
 Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln  
 325 330 335  
 Leu Glu Ala Ala  
 340

30 <210> 2  
 <211> 1023  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<400> 2

atggccacct tcgtccgcaa tgcctggtat gtggcggcgc tgcccagga actgtccgaa 60  
 aagccgctcg gccggacgat tctcgacaca ccgctcgcgc tctaccgcca gcccgacggt 120  
 gtggtcgctg cgctgctcga catctgtccg caccgcttcg cgccgctgag cgacggcatc 180  
 ctcgtcaacg gccatctcca atgcccctat cacgggctgg aattcgatgg cggcgggagc 240  
 5 tgcgtccata acccgcacgg caatggcgcc cgcccggctt cgctcaacgt ccgctccttc 300  
 ccggtggtgg agcgcgacgc gctgatctgg atctgtcccg gcgatccggc gctggccgat 360  
 cctggggcga tccccgactt cggctgcccg gtcgatcccc cctatcggac cgtcggcggc 420

tatgggcatg tcgactgcaa ctacaagctg ctggtcgaca acctgatgga cctcggccac 480  
 gcccaatatg tccatcgcgc caacgccag accgacgcct tcgaccggct ggagcgcgag 540  
 gtgatcgtcg gcgacggtga gatacaggcg ctgatgaaga ttcccggcgg cacgccgagc 600  
 10 gtgctgatgg ccaagtctct gcgcgccgcc aatacccccg tcgacgcttg gaacgacatc 660  
 cgctggaaca aggtgagcgc gatgctcaac ttcacgcgcg tggcgccgga aggcaccccc 720  
 aaggagcaga gcatccactc gcgcggtacc catatcctga cccccgagac ggaggcgcagc 780  
 tgccattatt tcttcggctc ctcgcgcaat ttcggcatcg acgatccgga gatggacggc 840  
 gtgctgcgca gctggcaggc tcaggcgcgt gtcaaggagg acaaggctgt cgtcggaggc 900  
 atcgagcgcg gccgcgcta tctcgaggcg aatggcatcc gcccgcgat gctgtcgtgc 960  
 gacgaagccg cagtccgtgt cagccgcgag atcgagaagc ttgagcagct cgaagccgcc 1020  
 tga 1023

15

<210> 3

<211> 1023

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<400> 3

atggccactt tcgttagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttctgagga gttgagcgag 60  
 aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgtca acctgacgga 120  
 gttgtcgctg ccctgcttga tatttgtccg catcgcttcg ctccggtgag tgacggtatt 180  
 25 ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggtctgg aatttgacgg aggtggccag 240  
 tgtgtccaca acccgcacgg caacggagcc cgccctgctt ctctgaacgt gcgatcattc 300  
 cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctgccctg gagatccagc actcgcagat 360  
 cccggtgcta tccctgactt tgggtgtcgt gttgatccag cttaccgtac tctcggaggc 420  
 tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctatgga tcttggacac 480  
 gctcagtagc tgcaccgcgc taacgcccga acagacgcct tcgatagact tgagcgtgag 540  
 gtgatcgttg gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tccctggtgg cacaccctca 600  
 gttctcatgg ctaagtctct gcgtggtgct aacacaccag ttgacgcctg gaacgacatc 660  
 cggtggaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcacgcgcg tcgcgccgga agggacgccc 720  
 30 aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc 780  
 tgccattact tcttcggtag ttcccgaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggc 840  
 gttctcagga gctggcaagc tcaagccctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct 900  
 atcgaaaggc ggagggctta cgtcgaagcg aacgggatca gaccgcat gttgtcctgc 960  
 gacgagggcag ccgtcagggc atccagggag attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg 1020  
 tga 1023

<210> 4

35 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 4

5 Ser Asp Ile Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Ile  
 1 5 10 15  
 Val Asp Gly Cys Arg Ile Gln Cys Ala Tyr His Ala Leu Glu Phe Asp  
 20 25 30  
 Gly Thr Gly Ala Cys Val Lys Asn Pro His Gly Lys Gln Lys Ile Pro  
 35 40 45  
 10 Ala Ala Ala Lys Leu Gln Ala Tyr Pro Val Val Glu Lys His Ser Leu  
 50 55 60  
 Ile Trp Val Trp Met Gly Glu Gln Ala Ala Ala Asp Pro Ser Val Ile  
 65 70 75 80  
 Pro Asp Phe Ser Met Leu Asp Pro Asp Ser Gly Phe Gln Val Ser Arg  
 85 90 95  
 15 Arg Asp Trp Leu His Met Asp Ala Ser Tyr Asp Leu Val Val Asp Asn  
 100 105 110  
 Leu Met Asp Leu Ser His Thr Ala  
 115 120

<210> 5

20 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 5

Ala Asp Arg Cys Pro His Arg Phe Val Pro Leu Ser Arg Gly Gln Arg  
 1 5 10 15  
 Asp Gly Asp Met Met Arg Cys Gly Tyr His Gly Leu Ala Phe Ser Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Gly Cys Val His Asn Pro Phe Thr Asp Glu Ala Leu Pro Leu  
 35 40 45  
 30 Ala Arg Val Glu Val Leu Pro Val Val Glu  
 50 55

<210> 6

<211> 58

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 6

Gly Gly Arg Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Gly His Gly Ser Val  
 1 5 10 15  
 5 Val Asp Gly Ala Leu Met Cys Pro Tyr His Gly Leu Arg Phe Asp Gly  
 20 25 30  
 Asp Gly Arg Cys Val His Asn Pro His Pro Gly Gly His Leu Pro Asp  
 35 40 45  
 Ala Arg Gln Arg Val Tyr Pro Leu Val Glu  
 50 55

10 <210> 7

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 7

Leu Asp Ile Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Val Asn Gly His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly  
 20 25 30  
 20 Gly Gly Gln Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala  
 35 40 45  
 Ser Leu Asn Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu  
 50 55

<210> 8

25 <211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 8

Glu Asp Phe Cys Pro His Arg Gly Ala Pro Leu Ser Leu Gly Phe Val  
 1 5 10 15  
 Arg Asp Gly Val Leu Val Cys Gly Tyr His Gly Leu Glu Met Gly Cys  
 20 25 30  
 Asn Gly Lys Thr Ala Ala Met Pro Gly Gln Arg Val Gly Gly Phe Pro  
 35 40 45  
 35 Ala Ile Arg Ser Phe Pro Val Val Glu  
 50 55

<210> 9

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 9

Glu Asp Phe Cys Pro His Arg Gly Ala Pro Leu Ser Leu Gly Phe Val  
 1 5 10 15

10

Arg Asp Gly Val Leu Val Cys Gly Tyr His Gly Leu Glu Met Gly Cys  
 20 25 30

Asn Gly Lys Pro Ala Gly Met Pro Gly Gln Arg Val Gly Gly Phe Pro  
 35 40 45

Ser Ile Arg Ser Phe Pro Ala Val Glu  
 50 55

15

<210> 10

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 10

Glu Asp Phe Cys Pro His Arg Gly Ala Pro Leu Ser Leu Gly Phe Val  
 1 5 10 15

25

Arg Asp Gly His Leu Val Cys Gly Tyr His Gly Leu Thr Met Lys Ala  
 20 25 30

Asp Gly Lys Cys Ala Ser Met Pro Gly Gln Arg Val Gly Gly Phe Pro  
 35 40 45

Cys Ile Arg Gln Phe Pro Val Val Glu  
 50 55

30

<210> 11

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 11

Glu Asp Phe Cys Pro His Arg Gly Ala Pro Leu Ser Leu Gly Phe Val  
 1 5 10 15  
 Arg Asp Gly Gln Leu Val Cys Gly Tyr His Gly Leu Glu Met Gly Cys  
 20 25 30  
 5 Asp Gly Lys Cys Ser Ser Met Pro Gly Gln Arg Val Arg Gly Phe Pro  
 35 40 45  
 Ser Ile His Ala Tyr Pro Val Val Glu  
 50 55

<210> 12

10 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 12

Glu Asp Ala Cys Trp His Arg Leu Val Pro Leu Ser Lys Gly Arg Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Asp Thr Val Val Cys Gly Tyr His Gly Leu Lys Phe Asn Pro  
 20 25 30  
 20 Gln Gly Arg Cys Thr Tyr Met Pro Ser Gln Glu Thr Ile Asn Pro Ser  
 35 40 45  
 Ala Cys Val Arg Ser Tyr Pro Val Val Glu  
 50 55

<210> 13

<211> 58

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 13

30 Glu Asp Ala Cys Trp His Arg Leu Val Pro Leu Ser Lys Gly Arg Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Asp Thr Val Val Cys Gly Tyr His Gly Leu Lys Tyr Asn Ala  
 20 25 30  
 Gln Gly Arg Cys Thr Phe Met Pro Ser Gln Glu Thr Ile Asn Pro Ser  
 35 40 45  
 35 Ala Cys Val Arg Ala Tyr Pro Val Val Glu  
 50 55

<210> 14

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 14

	Lys	His	Ser	Leu	Ile	Trp	Val	Trp	Met	Gly	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp
	1				5					10						15
	Pro	Ser	Val	Ile	Pro	Asp	Phe	Ser	Met	Leu	Asp	Pro	Asp	Ser	Gly	Phe
				20					25					30		
10	Gln	Val	Ser	Arg	Arg	Asp	Trp	Leu	His	Met	Asp	Ala	Ser	Tyr	Asp	Leu
			35					40					45			
	Val	Val	Asp	Asn	Leu	Met	Asp	Leu	Ser	His	Thr	Ala				
				50					55						60	
15																

<210> 15

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 15

	Lys	His	Thr	Gly	Leu	Trp	Phe	Trp	Pro	Gly	Asp	Ala	Asp	Arg	Ala	Asp
	1				5					10						15
	Pro	Ala	Leu	Ile	Pro	Asp	Phe	Gly	Phe	Leu	Asp	Val	Glu	Arg	Pro	Leu
				20					25					30		
25	His	Arg	Gly	His	Leu	Lys	Met	Asp	Ala	Gly	Tyr	Glu	Leu	Val	Thr	Asp
			35					40					45			
	Asn	Leu	Met	Asp	Leu	Ser	His	Ala	Glu							
		50					55									

30 <210> 16

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 16

Arg His Ala Leu Leu Trp Ile Trp Met Gly Asp Ala Ala Lys Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Ser Ile Pro Asp Phe Ser Trp Leu Ser Asp Pro Arg Trp Glu  
 20 25 30  
 5 Ala Val Arg Gly Ala Thr Val Ala Glu Gly His Phe Glu Leu Tyr Ser  
 35 40 45  
 Asp Asn Ile Leu Asp Leu Ser His Ala Asn  
 50 55

<210> 17

10 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 17

Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg  
 20 25 30  
 20 Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val  
 35 40 45  
 Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His Ala Gln  
 50 55

<210> 18

25 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 18

Arg Tyr Gly Phe Val Trp Val Trp Pro Gly Asp Ala Ser Arg Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Ala Leu Pro Ala Leu Thr Trp Ala Asp Asp Pro Val Trp Ala  
 20 25 30  
 35 His Gly Gly Gly Leu Tyr His Ile Arg Cys Asp Tyr Arg Leu Met Ile  
 35 40 45  
 Asp Asn Leu Met Asp Leu Thr His Glu Thr  
 50 55

<210> 19

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 19

	Arg	Tyr	Gly	Phe	Val	Trp	Val	Trp	Pro	Gly	Asp	Ala	Ser	Glu	Ala	Asp
	1				5					10					15	
10	Pro	Ala	Lys	Leu	Pro	Ala	Leu	Ala	Trp	Ala	Glu	Asp	Pro	Ala	Trp	Ala
			20					25					30			
	His	Gly	Gly	Gly	Leu	Tyr	His	Ile	Arg	Cys	Asp	Tyr	Arg	Leu	Met	Ile
			35					40				45				
	Asp	Asn	Leu	Met	Asp	Leu	Thr	His	Glu	Thr						
		50					55									

15 <210> 20

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 20

	Arg	Tyr	Gly	Phe	Ile	Trp	Val	Trp	Pro	Gly	Asp	Pro	Glu	Gln	Ala	Asp
	1				5					10					15	
	Pro	Ala	Arg	Ile	His	His	Leu	Glu	Trp	Ala	Glu	Ser	Glu	Ala	Trp	Ala
				20				25					30			
25	Tyr	Gly	Gly	Gly	Leu	Tyr	His	Ile	Gln	Cys	Asp	Tyr	Arg	Leu	Met	Ile
			35					40				45				
	Asp	Asn	Leu	Met	Asp	Leu	Thr	His	Glu	Thr						
		50					55									

<210> 21

30 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35

<400> 21

Arg His Gly Phe Ile Trp Val Trp Pro Gly Asp Ala Glu Gln Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Pro Asp Gln Ile Pro Glu Leu His Trp Ala Asn Asp Pro Glu Trp Ala  
 20 25 30  
 Tyr Gly Gly Gly Leu Tyr His Ile Asn Cys Asp Tyr Arg Leu Met Ile  
 35 40 45  
 Asp Asn Leu Met Asp Leu Thr His Glu Thr  
 50 55

5

<210> 22

10 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 22

Arg His Arg Phe Val Trp Leu Trp Met Gly Asp Pro Val Leu Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Leu Val Pro Asp Met His Trp Asn Asp Asp Pro Ala Trp Ala  
 20 25 30  
 Gly Asp Gly Lys Thr Ile Tyr Ala Lys Cys Asp Trp Arg Leu Val Val  
 35 40 45

20

<210> 23

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 23

Arg His Arg Tyr Ile Trp Leu Trp Met Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Leu Val Pro Asp Met His Trp Asn His Asp Pro Ala Trp Ala  
 20 25 30  
 Gly Asp Gly Lys Thr Ile Arg Val Asn Cys Asp Tyr Arg Leu Val Leu  
 35 40 45  
 Asp Asn Leu Met Asp Leu Thr His Glu Thr  
 50 55

30

35 <210> 24

<211> 433

<212> ADN

# ES 2 359 749 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<400> 24

```
5      agatcttgag ccaatcaaag aggagtgatg tagacctaa gcaataatgg agccatgacg      60
      taagggctta cgccatacg aaataattaa aggctgatgt gacctgtcgg tctctcagaa      120
      cctttacttt ttatgtttgg cgtgtatfff taaatttcca cggcaatgac gatgtgacct      180
      aacgagatct tgagccaatc aaagaggagt gatgtagacc taaagcaata atggagccat      240
      gacgtaaggg cttacgcca tacgaaataa ttaaaggctg atgtgacctg tcggtctctc      300
      agaaccttta ctttttatat ttggcgtgta tttttaaatt tccacggcaa tgacgatgtg      360
      acctgtgcat cgcttttggc tataaataag ttttagtttg tattgatcga cacggtcgag      420
      aagacacggc cat                                          433
10
```

## REIVINDICACIONES

- 1.- Una molécula de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en:
- a) una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la SEC ID N° 1;
  - b) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de la SEC ID N° 2; y
- 5           c) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido con al menos un 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEC ID N° 1, en el que el polipéptido tiene actividad dicamba monooxigenasa y comprende cisteína en una posición correspondiente al aminoácido 112 de la SEC ID N° 1.
- 2.- La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucleico codifica la dicamba monooxigenasa codificada por el plásmido pKLP36-TEV-TP-DMOc (N° de acceso a la ATCC PTA-7357).
- 10   3.- Una construcción de ADN que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 unida de forma funcional a un promotor.
- 4.- La construcción de la reivindicación 3, en la que
- (i) el promotor es funciona en una célula vegetal; o
  - (ii) la molécula de ácido nucleico está unida de forma funcional a un péptido de tránsito de cloroplastos.
- 15   5.- Una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la SEC ID N° 1, en la que el polipéptido tiene actividad dicamba monooxigenasa y comprende cisteína en una posición correspondiente al aminoácido 112 de la SEC ID N° 1.
- 6.- Una célula vegetal transformada con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
- 7.- La célula vegetal de la reivindicación 6, en la que
- 20           (i) la célula vegetal es una célula vegetal dicotiledónea, preferiblemente la célula vegetal dicotiledónea es una célula vegetal de soja, algodón, maíz o colza; o
- (ii) la célula vegetal es una célula vegetal monocotiledónea.
- 8.- Un cultivo de tejido vegetal que comprende la célula vegetal de la reivindicación 6.
- 9.- Una planta transgénica transformada con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
- 25   10.- La planta transgénica de la reivindicación 9, en la que
- (i) la planta es una planta dicotiledónea, preferiblemente la planta es una planta de soja, algodón, maíz o colza; o
  - (ii) la planta es una planta monocotiledónea.
- 11.- Un procedimiento para producir una planta tolerante a dicamba que comprende introducir la construcción de la reivindicación 3 en la planta transformando de forma estable una célula vegetal inicial y regenerar la célula en dicha planta tolerante a dicamba.
- 30   12.- El procedimiento de la reivindicación 11, en el que
- (i) la planta tolerante a dicamba se produce cruzando una planta parental consigo misma, en el que la planta parental comprende la construcción de transformación de la reivindicación 3 y la planta tolerante a dicamba hereda la construcción de transformación de la reivindicación 3 a partir de dicha planta parental, o
- 35           (ii) la planta tolerante a dicamba se produce cruzando una planta parental con una segunda planta, en el que la planta parental y/o la segunda planta comprende la construcción de transformación de la reivindicación 3 y la planta tolerante a dicamba hereda la construcción de transformación de la reivindicación 3 de dicha planta parental y/o la segunda planta.
- 40   13.- Un procedimiento para controlar el crecimiento de malas hierbas en un entorno de crecimiento de cultivos que comprende una planta transgénica de la reivindicación 9 o una semilla de la misma que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende aplicar al entorno de crecimiento de cultivos una cantidad del herbicida dicamba eficaz para control el crecimiento de malas hierbas.
- 14.- El procedimiento de la reivindicación 13, en el que
- 45           (i) el herbicida dicamba se aplica sobre la parte superior del entorno de crecimiento de cultivos; o

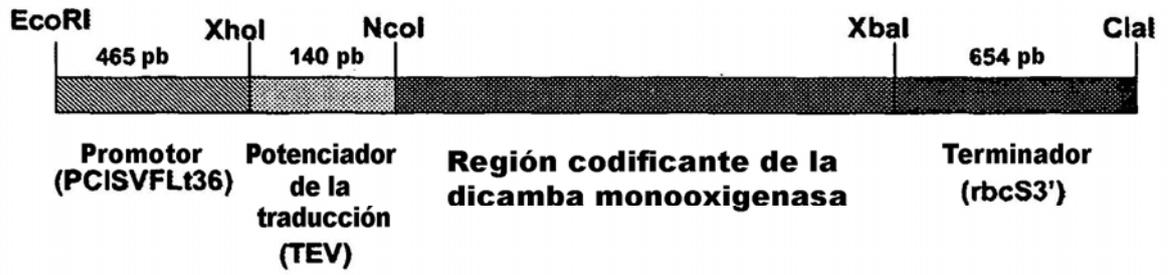
(ii) la cantidad del herbicida dicamba no daña dicha planta transgénica de la reivindicación 9 o semilla de la misma que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, y daña una planta del mismo genotipo que la planta transgénica de la reivindicación 9 que carece del ácido nucleico de la reivindicación 1.

15.- Un procedimiento para producir un alimento, pienso o producto industrial que comprende:

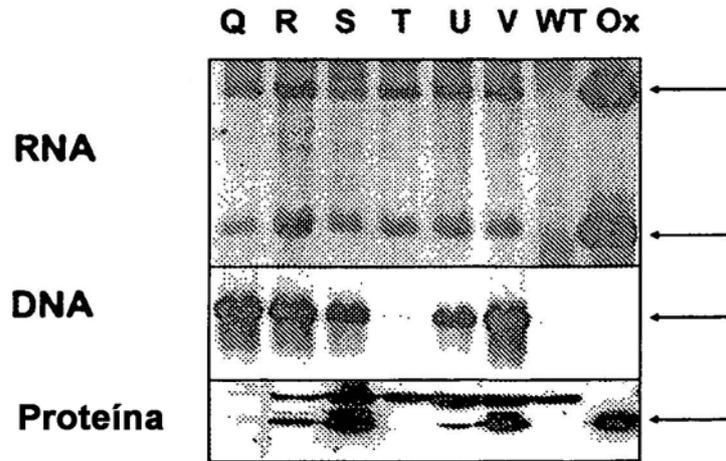
- 5                   a) obtener la planta transgénica de la reivindicación 9 o una parte de la misma que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1; y
- b) preparar el alimento, pienso o producto industrial a partir de la planta o parte de la misma.

16.- El procedimiento de la reivindicación 15, en el que

- (i) el alimento o pienso es aceite, harina, grano, almidón, flor de harina, o proteína; o
- 10                   (ii) el producto industrial es biocombustible, fibra, compuestos químicos industriales, un agente farmacéutico o nutracéutico.



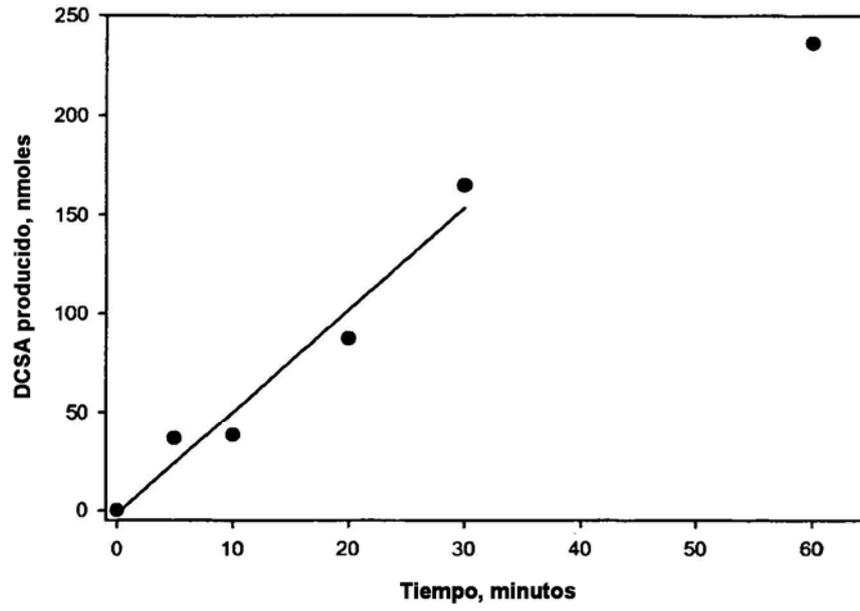
**FIG. 1**



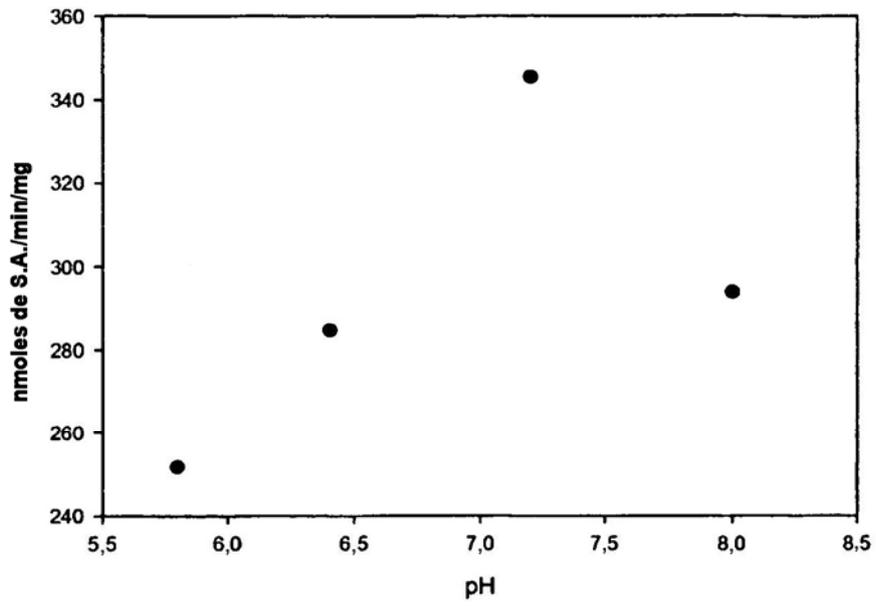
**FIG. 2**



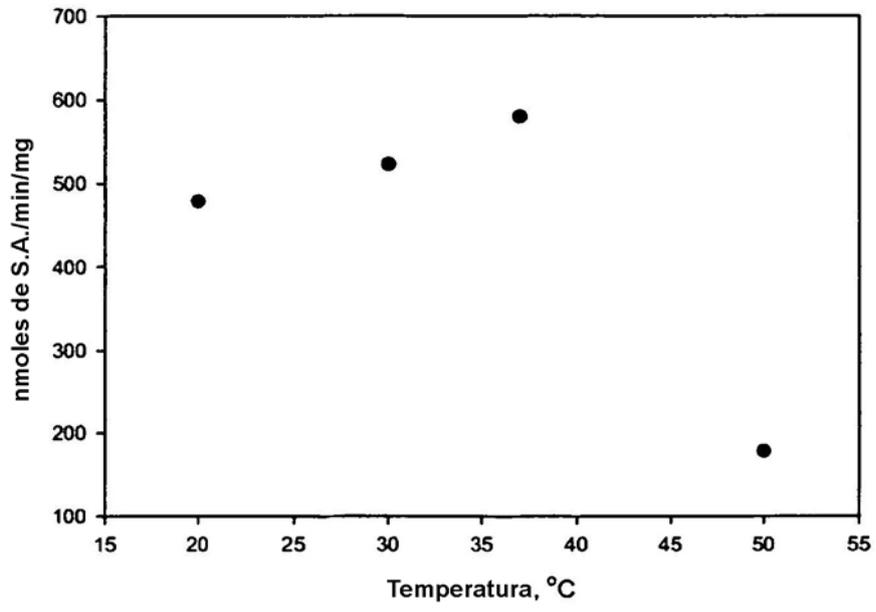
**FIG. 3**



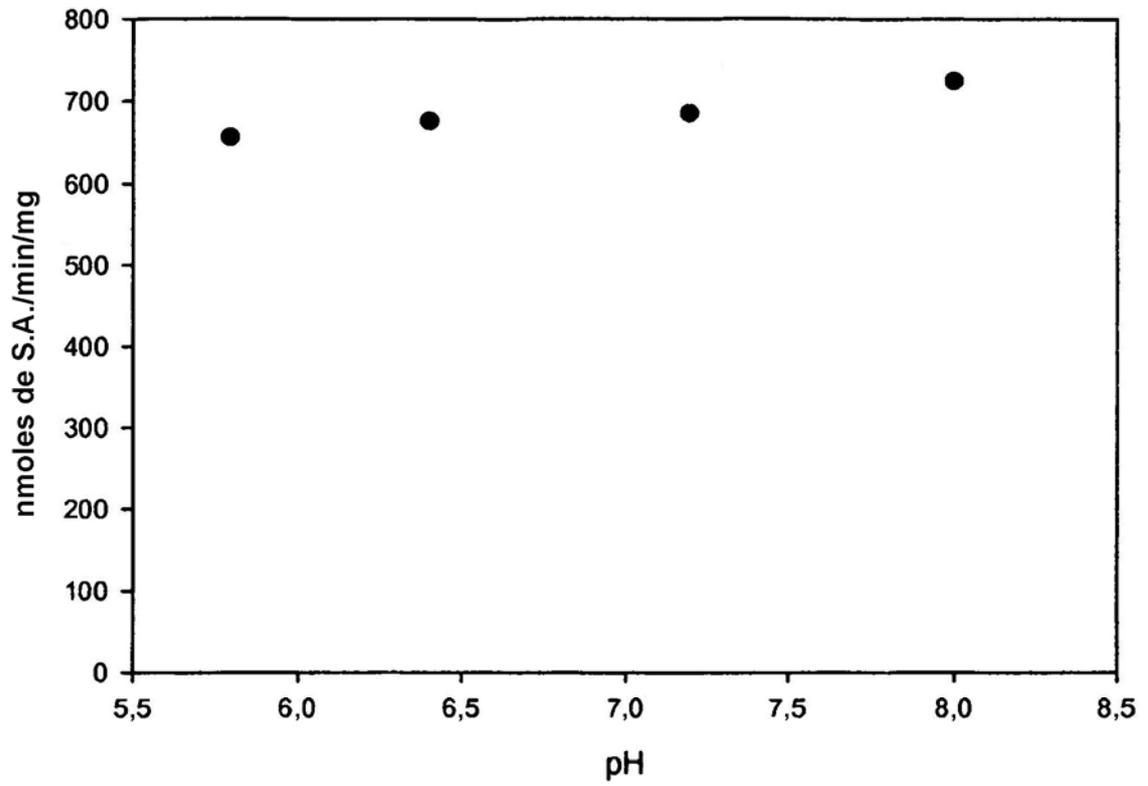
**FIG. 4**



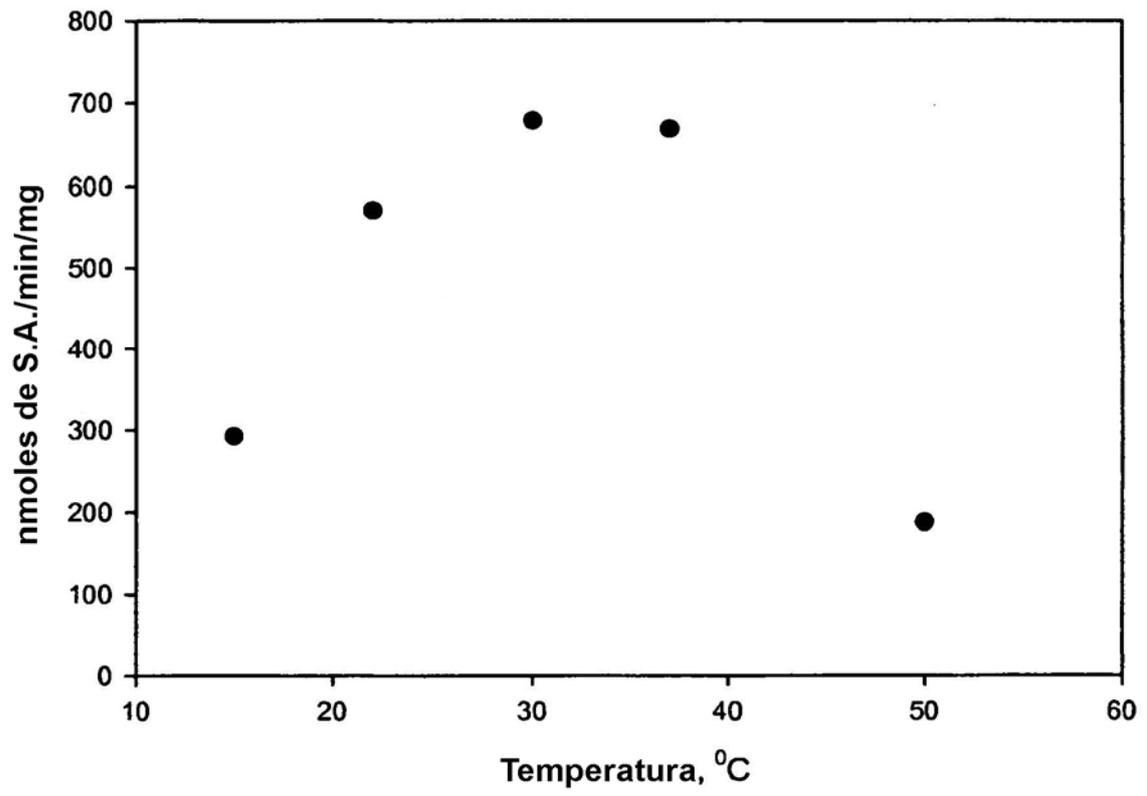
**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG.7**



**FIG. 8**

La mutación W112C causa cambios en el pH y la temperatura óptimos

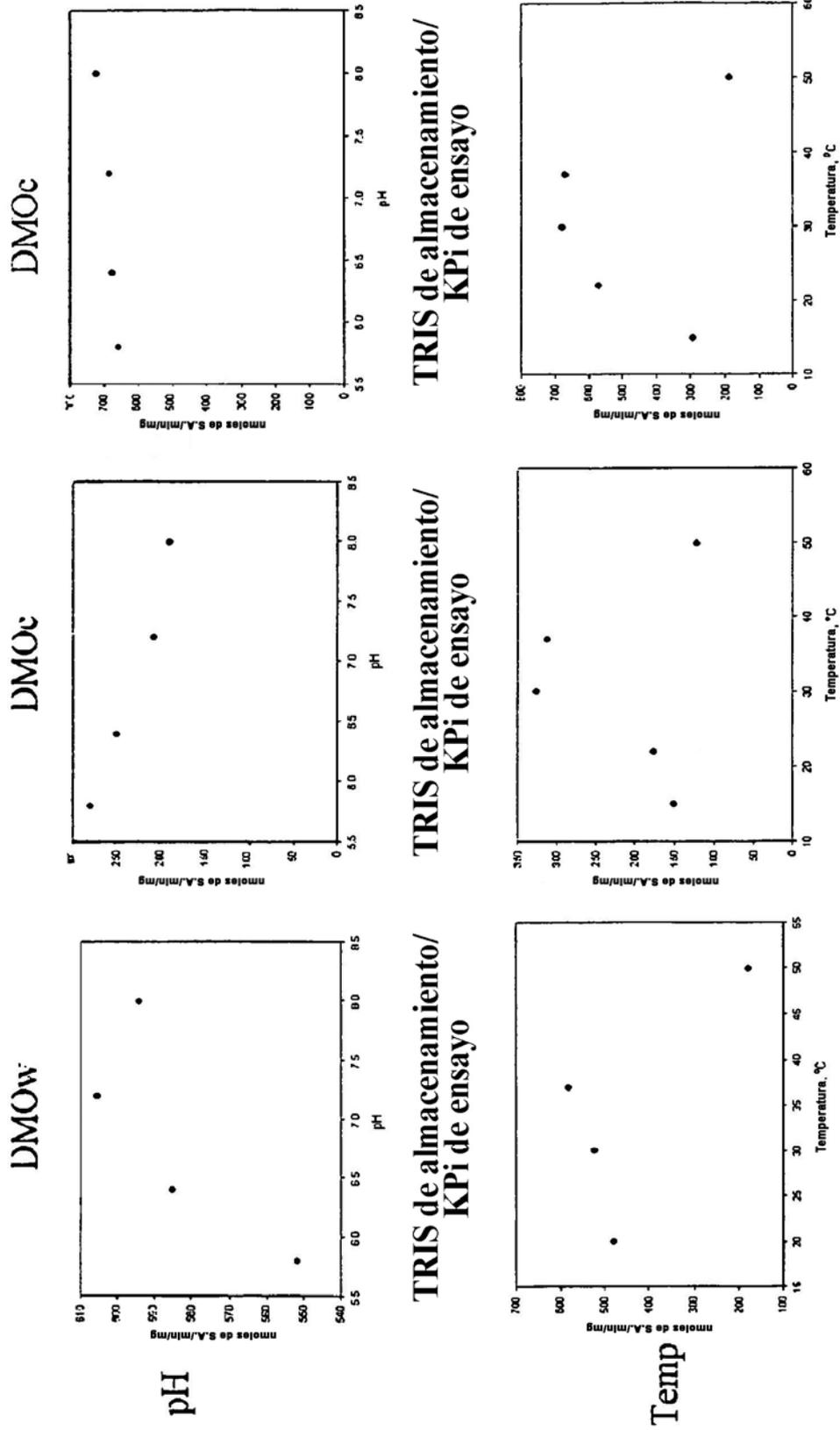
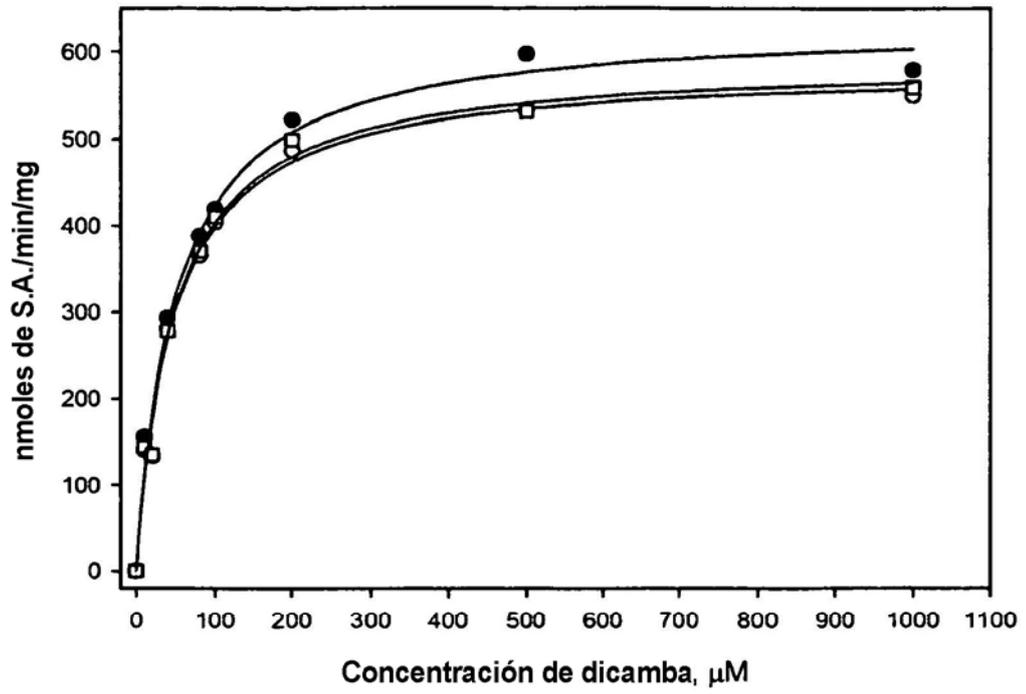
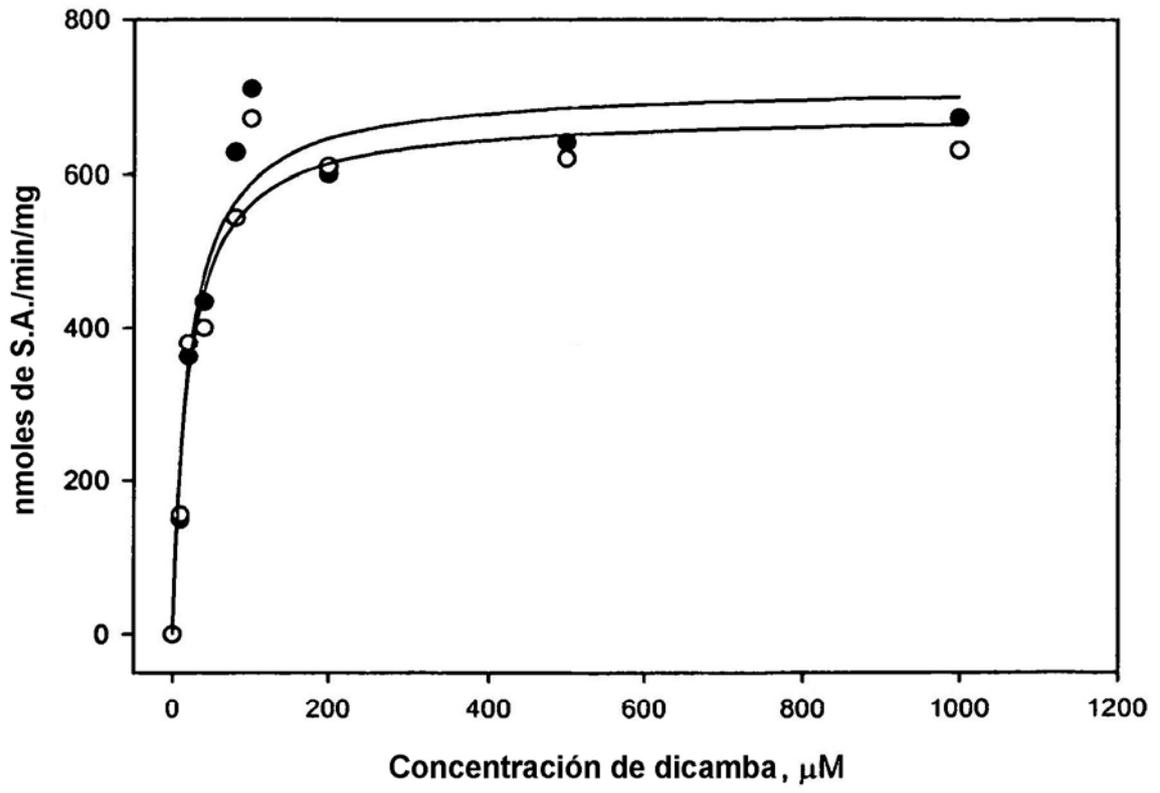


FIG. 9



**FIG. 10**



**FIG. 11**

Efecto de la preincubación de DMO-C a 30°C durante 45 minutos

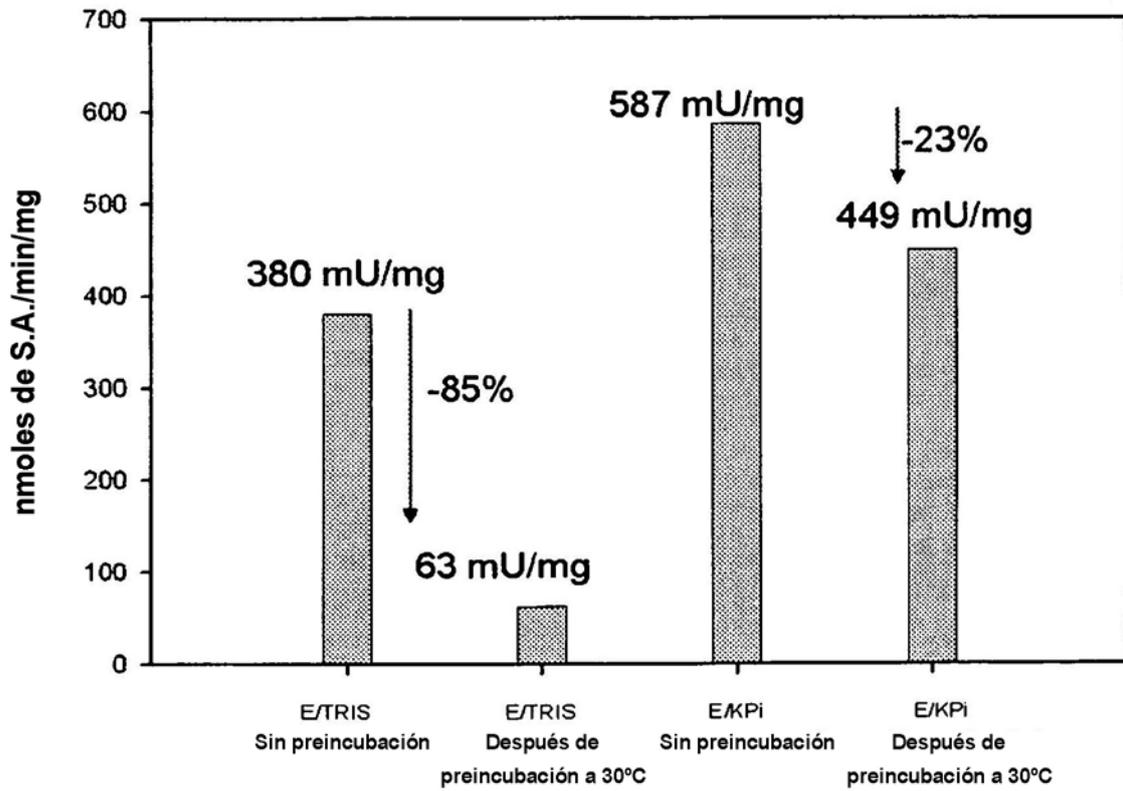
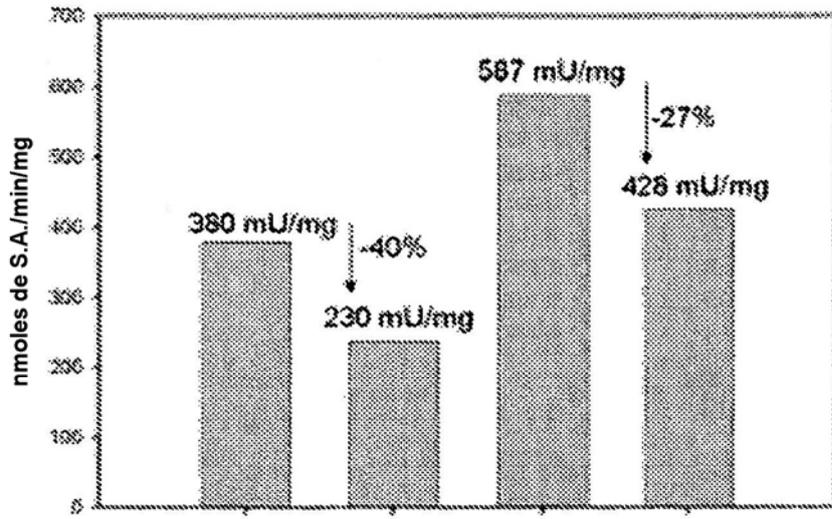


FIG. 12



**FIG. 13**

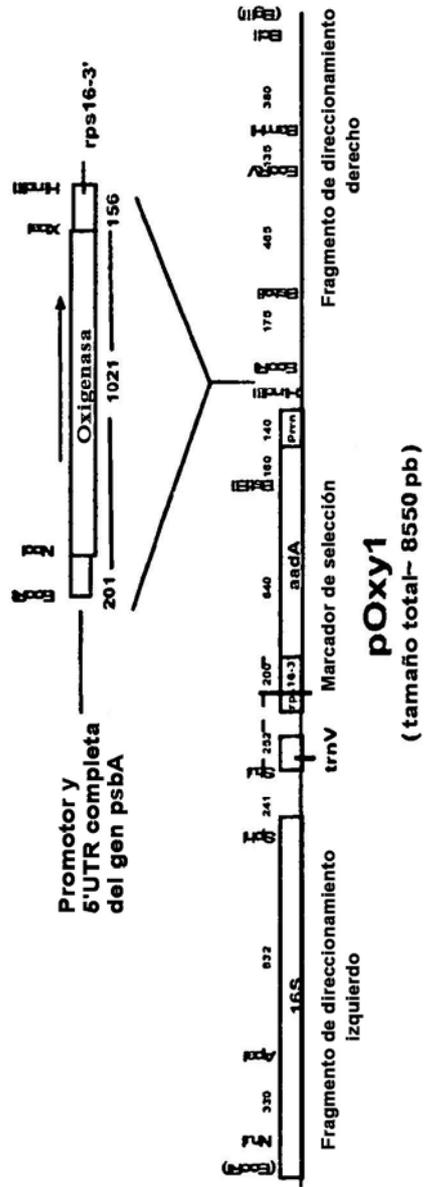


FIG. 14

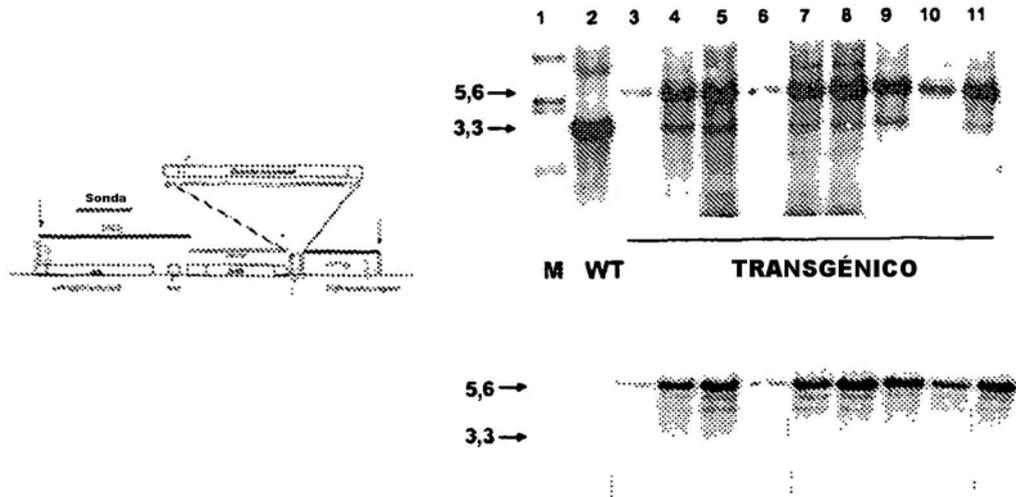
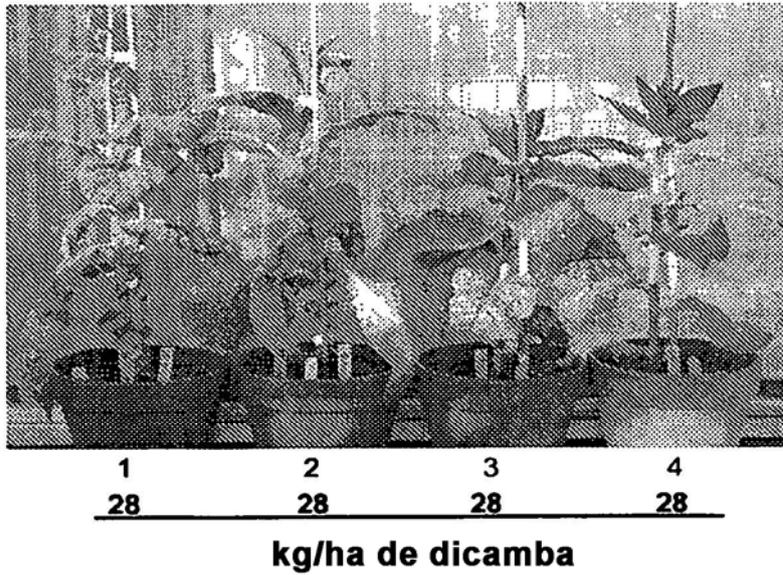


FIG. 15



**FIG. 16**



	<b> dominio de Rieske</b>
gi 45782155	ED LQNNPAPL EL GG NPPGG IQRHYHACNEDDT CACVKNPKSKQKIP AAALKQATPVUE
gi 48880840	ASDCNPPPTD L SQQGQDCCNPPPCVYFC L APTDGG CCVKNPPTDEALP LARVENLPVUE
gi 48849366	QNNPPTD L SQQGQDCCNPPPCVYFC L APTDGG CCVKNPPTDGLP DAEQRUNPLVE
oxigenasa	
gi 67542060	LDNPPHRRAPL SSSPLNPLMLG CQVXGL LPTDGG CCVKNPPTDGLP ATLNURSTPVUE
gi 67686900	EDNPPHRRAPL SSSPLNPLMLG CQVXGL LPTDGG CCVKNPPTDGLP ATLNURSTPVUE
gi 17548443	EDNPPHRRAPL SSSPLNPLMLG CQVXGL LPTDGG CCVKNPPTDGLP ATLNURSTPVUE
gi 67676026	EDNPPHRRAPL SSSPLNPLMLG CQVXGL LPTDGG CCVKNPPTDGLP ATLNURSTPVUE
gi 109236881	EDNPPHRRAPL SSSPLNPLMLG CQVXGL LPTDGG CCVKNPPTDGLP ATLNURSTPVUE
gi 127377501	EDNPPHRRAPL SSSPLNPLMLG CQVXGL LPTDGG CCVKNPPTDGLP ATLNURSTPVUE
	* ** _** * .. * ** * * *
	↓
	<b> de Fe no hemo</b>
dominio	
gi 45782155	ENSLIGVNNHGEQRAADPSVIFD FSELEPD SGFQVSRPDLHMDASVDLVNQLNGLNXXA
gi 48880840	KNTGLVFPDGDARRADPAL IFFPGFLDVEE---PLRQNLKNDAGVELVYDSEKDYSD
gi 48849366	ENALLNINMGDAKADPAIIPBTFELSDP R--NEAURGATVAE SIFELTVDNDELCSLW
oxigenasa	
gi 67542060	RRGTVVWNP GDAFRADPAALPALTWARDPV--SARGGSLYHIFEDYRLMGGNLSLXXY
gi 67686900	RYSFVWVWNP GDAKADPAALP ALAPAEDE A--WANGGGLYHINCSYRLMGGNLSLXXY
gi 17548443	RYSFVWVWNP GDAFRADPAALPALTWARDPV--SARGGSLYHIFEDYRLMGGNLSLXXY
gi 67676026	RRGTVVWNP GDAFRADPAALPALTWARDPV--SARGGSLYHIFEDYRLMGGNLSLXXY
gi 109236881	RNPVWVWNP GDAFRADPAALPALTWARDPV--SARGGSLYHIFEDYRLMGGNLSLXXY
gi 127377501	RNYFVWVWNP GDAFRADPAALPALTWARDPV--SARGGSLYHIFEDYRLMGGNLSLXXY
	: . * * : ** * : : * ** : ** *

FIG. 18