

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 919**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2008** **PCT/US2008/063212**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2008** **WO08141154**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2008** **E 08780621 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017** **EP 2145007**

54 Título: **Nuevos genes de resistencia a herbicidas**

30 Prioridad:

09.05.2007 US 928303 P

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

05.07.2017

73 Titular/es:

DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 ZIONSVILLE ROAD
INDIANAPOLIS 46268-1054, US

72 Inventor/es:

LIRA, JUSTIN, M.;
SNODDERLEY, ERIKA, MEGAN;
ROBINSON, ANDREW, E.;
WRIGHT, TERRY, R. y
MERLO, DONALD, J.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 621 919 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

Nuevos genes de resistencia a herbicidas

Antecedentes de la invención

5 Las malas hierbas pueden agotar rápidamente el suelo de nutrientes valiosos necesarios para cultivos y otras plantas deseables. Hay muchos tipos diferentes de herbicidas usados actualmente para el control de las malas hierbas. Un herbicida extremadamente popular es el glifosato.

Se han desarrollado cultivos, tales como maíz, soja, canola, algodón, remolacha azucarera, trigo, césped y arroz, que son resistentes al glifosato. Por lo tanto, los campos con, por ejemplo, sojas resistentes al glifosato que crecen activamente, se pueden pulverizar para controlar las malas hierbas sin dañar las plantas de soja.

10 Con la introducción de cultivos tolerantes al glifosato (GTC) modificados genéticamente a mediados de la década de 1990, se proporcionó a los cultivadores una herramienta sencilla, conveniente, flexible y barata para controlar una amplia variedad de malas hierbas de hoja ancha y maleza incomparable en agricultura. Por consiguiente, los productores adoptaron rápidamente los GTC y en muchos casos abandonaron muchas de las prácticas agrónomas mejor aceptadas tales como la rotación de cultivos, rotación del modo de acción de herbicidas, mezcla en depósito, incorporación de control de las malas hierbas mecánico con químico y de cultivo. Actualmente, la soja, algodón, 15 maíz y canola tolerantes al glifosato están disponibles en el comercio en Estados Unidos y en cualquier parte del hemisferio occidental. La alfalfa fue el primer GTC perenne introducido, impulsando la oportunidad del uso repetido del glifosato en el mismo cultivo y campos repetidamente a lo largo de un periodo de años. Muchos GTC (p. ej., trigo, arroz, remolacha azucarera, césped, etc.) están listos para la introducción pendientes de la aceptación del mercado mundial. Muchas otras especies resistentes al glifosato están en etapas de desarrollo experimentales (p. 20 ej., caña de azúcar, girasol, remolacha, guisantes, zanahoria, pepino, lechuga, cebolla, fresa, tomate y tabaco; especies forestales como el álamo y liquidámbar; y especies hortícolas como caléndula, petunia y begonias; véase el sitio en la red "isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005"). Además, el coste del glifosato se ha reducido drásticamente en años recientes hasta el punto de que pocos programas de control de malas hierbas 25 convencionales pueden competir eficazmente en precio y rendimiento con los sistemas de GTC de glifosato.

El glifosato se ha usado satisfactoriamente en zonas de efecto de quemado y en otras no cultivadas para el control total de la vegetación durante más de 15 años. En muchos casos, como con los GTC, el glifosato se ha usado 1-3 veces al año durante 3, 5, 10, hasta 15 años en una línea de cultivo. Estas circunstancias han conducido a una 30 excesiva dependencia del glifosato y la tecnología del GTC y han impuesto una fuerte presión de selección sobre las especies nativas de malas hierbas para plantas que son naturalmente más tolerantes al glifosato o que han desarrollado un mecanismo para resistir la actividad herbicida del glifosato.

El uso extensivo de programas de control de malas hierbas solo con glifosato está dando como resultado la selección de malas hierbas resistentes al glifosato, y está seleccionando la propagación de especies de malas hierbas que son inherentemente más tolerantes al glifosato que la mayoría de las especies objetivo (es decir, 35 desplazamiento de malas hierbas).

Aunque el glifosato se ha usado ampliamente globalmente durante más de 15 años, solo se ha descrito un puñado de malas hierbas que han desarrollado resistencia al glifosato; sin embargo, la mayoría de estas se han identificado en los últimos cinco años. Las malas hierbas resistentes incluyen tanto especies de hierbas como de hoja ancha, 40 *Lolium rigidum*, *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica*, *Sorghum halepense*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Conyza canadensis*, *Conyza bonariensis*, *Plantago lanceolata*, *Amaranthus palmerii*, y *Amaranthus rudis*. Además, malas hierbas que previamente no han sido un problema agrícola antes del amplio uso de los GTC ahora se están convirtiendo en más prevalentes y difíciles de controlar en el contexto de los GTC, que comprende >80% de los acres de algodón y soja en EE.UU. y >20% de acres de maíz en EE.UU. Estos desplazamientos de malas hierbas se están produciendo predominantemente con (pero no exclusivamente) malas hierbas de hoja ancha difíciles de controlar. Algunos 45 ejemplos incluyen especies *Ipomoea*, *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Taraxacum*, y *Commelina*.

En zonas donde los agricultores se enfrentan a malas hierbas resistentes al glifosato o a un desplazamiento a especies de malas hierbas más difíciles de controlar, los agricultores compensan la debilidad del glifosato con mezclas en tanque o alternando con otros herbicidas que controlarán las malas hierbas que faltaban. Una pareja de 50 mezcla en tanque popular y eficaz para controlar las de hoja ancha que se escapan en muchos casos, es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). El 2,4-D se ha usado en situaciones agrícolas y que no son de cultivos para el control de malas hierbas de hoja ancha de amplio espectro, durante más de 60 años. Se han descrito casos individuales de especies más tolerantes, pero el 2,4-D sigue siendo uno de los herbicidas más ampliamente usado globalmente. Una limitación para el uso adicional del 2,4-D es que su selectividad en cultivos de dicotiledóneas como la soja y el algodón, es muy mala, y por lo tanto el 2,4-D no se usa típicamente (y en general no cerca) de 55 cultivos de dicotiledóneas sensibles. Además, el uso de 2,4-D en cultivos de forrajes es algo limitado por la naturaleza del daño que se puede producir al cultivo. El 2,4-D en combinación con el glifosato se ha usado para proporcionar un tratamiento de efecto quemado robusto antes de plantar soja y algodón en siembra directa; sin embargo, debido a la sensibilidad de estas especies dicotiledóneas al 2,4-D, estos tratamientos de efecto quemado

deben hacerse al menos 14-30 días antes de plantación.

El 2,4-D es de la clase de herbicidas de ácido tipo fenoxi, como el MCPA. El 2,4-D se ha usado en muchos cultivos de monocotiledóneas (tales como maíz, trigo y arroz) para el control selectivo de las malas hierbas de hoja ancha sin dañar gravemente las plantas del cultivo deseado. El 2,4-D es un derivado de auxina sintética que actúa para

desregular la homeostasis de hormonas celulares naturales e impide el crecimiento controlado, equilibrado; sin embargo, el modo de acción exacto todavía no se conoce. Triclopir y fluroxipir son herbicidas de tipo ácido piridiloxiacético cuyo modo de acción es también como una auxina sintética.

Estos herbicidas tienen niveles diferentes de selectividad en algunas plantas (p. ej., las dicotiledóneas son más sensibles que los forrajes). El diferente mecanismo por plantas diferentes es una explicación de los variados niveles de selectividad. En general, las plantas metabolizan el 2,4-D lentamente, de modo que la diferente respuesta de las plantas al 2,4-D se puede explicar más probablemente por la diferente actividad en el o los sitios activos (WSSA, 2002). El metabolismo del 2,4-D de las plantas típicamente se produce por un mecanismo en dos fases, típicamente hidroxilación seguido de conjugación con aminoácidos o glucosa (WSSA, 2002).

A lo largo del tiempo, las poblaciones microbianas han desarrollado una ruta alternativa y eficaz para la degradación de este xenobiótico particular, que da como resultado la mineralización completa del 2,4-D. Las aplicaciones sucesivas del herbicida seleccionan microbios que pueden usar el herbicida como una fuente de carbono para el crecimiento, dándoles una ventaja competitiva en el suelo. Por esta razón, el 2,4-D actualmente formulado tiene una semivida en el suelo relativamente corta, y no se han encontrado efectos significativos de transferencia a cultivos posteriores. Esto se suma a la utilidad herbicida del 2,4-D.

Un organismo que se ha investigado extensamente por su capacidad para degradar el 2,4-D es *Ralstonia eutropha*. El gen que codifica la primera etapa enzimática en la ruta de mineralización es *tfdA*. Véase la patente de EE.UU. nº. 6.153.401 y nº de acceso en GENBANK M16730. *TfdA* cataliza la conversión del ácido 2,4-D en diclorofenol (DCP) por una reacción de dioxigenasa dependiente de cetoglutarato. El DCP tiene poca actividad herbicida comparado con el 2,4-D. Se ha usado *TfdA* en plantas transgénicas para impartir resistencia al 2,4-D en plantas dicotiledóneas (p. ej., algodón y tabaco) normalmente sensibles al 2,4-D.

Se ha identificado un gran número de genes de tipo *tfdA* que codifican proteínas capaces de degradar el 2,4-D del entorno y se han depositado en la base de datos Genbank. Muchos homólogos son similares a *tfdA* (>85% de identidad de aminoácidos) y tienen propiedades enzimáticas similares al *tfdA*. Sin embargo, hay una serie de homólogos que tienen una identidad significativamente menor con el *tfdA* (25-50%), aunque todavía tienen los restos característicos asociados con la α -cetoglutarato dioxigenasa de las dioxigenasas de Fe^{2+} . Por lo tanto, no es obvio cuales son las especificidades de sustrato de estas dioxigenasas divergentes.

Un ejemplo único de homología baja con *tfdA* (35% de identidad de aminoácidos) es *sdpA* de *Sphingobium herbicidovorans*

Se ha mostrado que esta enzima cataliza la primera etapa en (S)-dicloroprop (y otros ácidos (S)-fenoxipropiónico) así como en la mineralización del 2,4-D (un ácido fenoxiacético).

La transformación de este gen en plantas no se ha descrito hasta ahora.

El desarrollo de nuevas tecnologías de cultivos tolerantes a herbicida (HTC) ha tenido un éxito limitado debido en gran medida a la eficacia, bajo coste y conveniencia de los GTC. Por consiguiente, se ha producido una tasa muy alta de aceptación de GTC entre los productores. Esto crea poco incentivo para el desarrollo de nuevas tecnologías de HTC.

Las subestructuras químicas de ariloxialcanoato son una entidad común de muchos herbicidas comercializados que incluyen auxinas de fenoxiacetato (tales como 2,4-D y dicloroprop), auxinas de piridiloxiacetato (tales como fluroxipir y triclopir), ariloxifenoxipropionatos (AOPP) inhibidores de acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase) (tales como haloxifop, quizalofop, y diclofop), y fenoxiacetatos 5-sustituidos inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa IX (tales como piraflufen y flumiclorac). Sin embargo, esta clase de herbicidas son todos bastante distintos, y no existen pruebas en la bibliografía actual de rutas de degradación comunes entre estas clases de compuestos químicos. Recientemente se ha descrito una enzima multifuncional para la degradación de herbicidas de cobre múltiples modos de acción, en el documento WO/2005/107437; presentado el 2 de mayo, 2005). Se describen en lo sucesivo otra enzima multifuncional única y sus usos potenciales.

Kohler HPE, "Sphingomonas herbicidovorans MH: A versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, (1999), vol. 23, no. 4-5, páginas 336-340, se refiere a *Sphingomonas herbicidovorans MH*: un degradador de herbicida de ácido fenoxialcanoico versátil, y describe el aislamiento de *Sphingomonas herbicidovorans MH* de una columna de suelo que se degrada con dicloroprop que es capaz de crecer en herbicidas de ácido fenoxialcanoico, tales como mecoprop, dicloroprop, 2,4-D, MCPA, y 2,4-DB. Se describe además que la cepa MH usa ambos enantiómeros de los herbicidas quirales mecoprop y dicloroprop como la única fuente de carbono y energía. Los sistemas de absorción específicos de enantiómero son responsables del transporte de sustratos ácido a través de la membrana celular. El catabolismo es inhibitorio por dos dioxigenasas dependientes

de alfa-cetoglutarato específicas de enantiómero que catalizan la escisión del enlace éter del respectivo enantiómero para dar el correspondiente fenol y piruvato. Por lo tanto, la degradación selectiva de los enantiómeros de mecoprop y diclorprop por la cepa MH no se debe solamente al catabolismo selectivo sino también al transporte enantioselectivo.

- 5 Schleinitz et al. "Localization and characterization of two novel genes encoding stereospecific dioxygenases catalyzing 2(2,4-dichlorophenoxy)propionate cleavage in *Delftia acidovorans* MC1", *Applied and Environmental Microbiology, American Society for Microbiology*, vol. 70, no. 9, página 5357 - 5365, describe la localización y caracterización de dos nuevos genes, rdpA y sdgA, que codifican dioxygenasas estereoespecíficas que catalizan la escisión de 2-(2,4-diclorofenoxi)propionato en *Delftia acidovorans* MC1.
- 10 Müller T.A. et al. "Genetic Analysis of Phenoxyalkanoic Acid Degradation in *Sphingomonas herbicidovorans* MH" *Applied and Environmental Microbiology, American Society for Microbiology*, vol. 70, no. 10, página 6066-6075, se refiere al análisis genético de la degradación del ácido fenoxialcanoico en *Sphingomonas herbicidovorans* MH y describe el aislamiento de varios genes implicados en la degradación de diclor- y mecoprop de la alfa-proteobacteria *Sphingomonas herbicidovorans* MH. Se encontraron dos genes de las dioxygenasas dependientes de α -cetoglutarato, sdgAMH y rdpAMH, los cuales eran ambos adyacentes a secuencias con potenciales elementos de inserción. Además, se aislaron un gen para la diclorofenol hidroxilasa (tfdB), un gen regulador putativo (cadR), dos genes para las diclorocatecol 1,2-dioxygenasas (dccA/II), dos para dienolactona hidrolasas (dccD/II), parte de un gen para la maleilacetato reductasa (dccE), y un gen para una potencial ácido fenoxialcanoico permeasa. El análisis de estos genes sugiere un reservorio diferente y transferencia reducida para los genes de la ruta de escisión orto
- 15 modificada en Alfabroteobacterias comparado con las Beta y Gammaproteobacterias.
- 20

La patente de Estados Unidos 5.925.806 se refiere a la expresión controlada de construcciones transgénicas en plastos de plantas y describe composiciones y métodos útiles para ingeniería genética de células de plantas controlando el patrón de tiempo o tejido de la expresión de secuencias de ADN extrañas insertadas en el genoma de plastos de plantas. Las construcciones incluyen las de transformación nuclear que proporcionan expresión de una sola subunidad de ARN polimerasa vírica en tejidos de células vegetales, y las de dirigirse a la proteína polimerasa expresada en los plastos de células vegetales. Además, se proporcionan construcciones de expresión de plastos que comprenden una región de promotor de gen vírico que es específica para la ARN polimerasa expresada a partir de las construcciones descritas, y una secuencia de ADN de interés que se va a expresar en las células de plasto transformadas.

30 Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona nuevas plantas que no solo son resistentes al 2,4-D, sino también a herbicidas de piridiloxiacetato. Hasta la fecha, no se ha esperado o sugerido que una planta con ambas propiedades ventajosas se pudiera producir mediante la introducción de un solo gen. La presente invención también incluye plantas que producen una o más enzimas de la presente invención "apiladas" junto con uno o más de otros genes de resistencia a herbicidas, que incluyen, pero no se limitan a genes de resistencia al glifosato, ALS (imidazolinona, sulfonilurea), ariloxialcanoato, HPPD, PPO, y glufosinato, para así proporcionar plantas tolerantes a herbicidas compatibles con las opciones de control de malas hierbas más amplio y más consistente y gestión de la resistencia a herbicidas. La presente invención incluye además métodos y composiciones que usan homólogos de los genes y proteínas ejemplificados en la presente memoria.

- 40 En algunas realizaciones, la invención proporciona plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas tolerantes al 2,4-D, MCPA, fluoroxipir, y uno o más herbicidas disponibles en el mercado (p. ej., glifosato, glufosinato, paraquat, inhibidores de ALS (p. ej., sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidina sulfonanilidas, y otros), inhibidores de HPPD (p. ej., mesotona, isoxaflutol, y otros), dicamba, bromoxinil, ariloxifenoxipropionatos, y otros). También se describen vectores que comprenden secuencias de ácido nucleico responsables de dicha tolerancia a herbicidas, así
- 45 como métodos de uso de dichas plantas tolerantes y combinaciones de herbicidas para el control de malas hierbas y la prevención de desplazamientos de población de malas hierbas. La presente invención permite nuevas combinaciones de herbicidas para usar de formas nuevas.

La presente invención permite nuevos usos de nuevas combinaciones de herbicidas y cultivos, que incluyen aplicación preplantación en una zona en la que se va a plantar, inmediatamente antes de plantar con semillas, para plantas que de lo contrario serían sensibles a ese herbicida (tal como 2,4-D).

- 50 La presente invención se refiere en parte a la identificación de una enzima que no solo es capaz de degradar el 2,4-D, sino que sorprendentemente también tiene nuevas propiedades, que distinguen la enzima de la presente invención de proteínas de tipo tfdA previamente conocidas, por ejemplo. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de una enzima que es capaz de degradar tanto el 2,4-D como herbicidas de piridiloxiacetato. No se ha descrito previamente una enzima dioxygenasa dependiente de α -cetoglutarato que tenga la capacidad de degradar herbicidas auxínicos de fenoxiacetato y piridiloxiacetatos. La enzima y gen preferidos para usar de acuerdo con la presente invención se denominan en la presente memoria AAD-13 (ariloxialcanoato dioxygenasa). Este descubrimiento muy novedoso es la base del importante rasgo del cultivo tolerante a herbicida (HTC) y oportunidades de marcadores seleccionables. Las plantas de la presente invención pueden ser resistentes a lo largo
- 55

de todo su ciclo de vida.

No había motivación previa para producir plantas que comprendieran el gen *AAD-13* (preferiblemente un polinucleótido de *AAD-13* que tiene una secuencia optimizada para la expresión en uno o más tipos de plantas, como se ilustra en la presente memoria), y no se esperaba que dichas plantas pudieran producir eficazmente una enzima *AAD-13* para hacer a las plantas resistentes a un herbicida de ácido fenoxiacético (tal como 2,4-D) y/o uno o más herbicidas de piridiloxiacetatos tales como triclopir y fluroxipir. Por lo tanto, la presente invención proporciona muchas ventajas que hasta ahora no se pensaba que fueran posibles en la técnica.

La invención también se refiere en parte a la identificación y uso de genes que codifican enzimas ariloxialcanoato dioxigenasa que son capaces de degradar herbicidas auxínicos de fenoxiacetato y/o auxínicos de piridiloxiacetatos.

- 10 Por lo tanto, la presente invención incluye la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y otros herbicidas auxínicos de ariloxialcanoato por la enzima *AAD-13* expresada de forma recombinante.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la reacción química general que es catalizada por las enzimas *AAD-13* de la presente invención.

- 15 La figura 2 es un alineamiento por ClustalW de α -cetoglutarato dioxigenasas. Los restos conservados en 80% de las secuencias están marcados. (Están marcados restos idénticos y similares).

La figura 3 ilustra la rotura concomitante del α -cetoglutarato y el sustrato de interés por la *AAD-13*.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos natural de *AAD-13* de *Sphingobium herbicidovorans*.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de proteína traducida codificada por la SEQ ID NO: 1.

- 20 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos optimizada para planta de *AAD-13* (v1).

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de proteína traducida codificada por la SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos optimizada para *E. coli* de *AAD-13* (v2).

SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia del cebador "sdpacodF" de *AAD-13* (v1).

SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia del cebador "sdpacodR" *AAD-13* (v1).

- 25 SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia del cebador "sucCD".

SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia del cebador "sucCD".

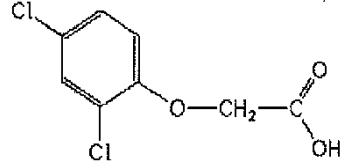
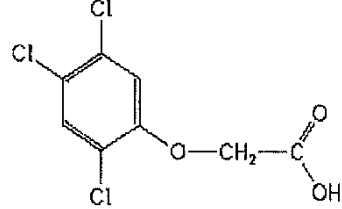
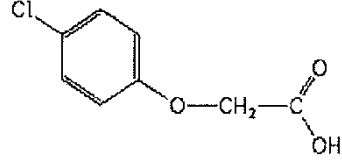
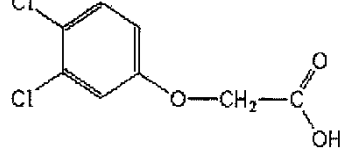
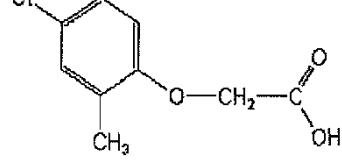
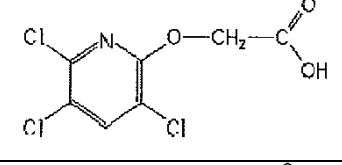
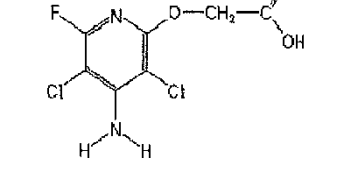
SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia del cebador *AAD-13* (v2).

SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia del cebador *AAD-13* (v2).

Descripción detallada de la invención

- 30 El presente desarrollo de un gen de resistencia al 2,4-D y los posteriores cultivos resistentes, proporcionan excelentes opciones para controlar especies de malas hierbas de hoja ancha, resistentes al glifosato (o muy tolerantes y desplazadas) para aplicaciones en cultivo. El 2,4-D es un herbicida de hoja ancha de amplio espectro, relativamente barato y fuerte, que proporcionaría una excelente utilidad a los agricultores si se pudiera proporcionar mayor tolerancia del cultivo en cultivos de dicotiledóneas y monocotiledóneas igualmente. Los cultivos de dicotiledóneas transgénicas tolerantes al 2,4-D también tendrían una mayor flexibilidad en el tiempo y tasa de aplicación. Una utilidad adicional del presente rasgo de tolerancia al herbicida para el 2,4-D es su utilidad para prevenir el daño a cultivos normalmente sensibles por la deriva del 2,4-D, volatilización, inversión (u otro fenómeno de movimiento fuera de sitio), mala aplicación, vandalismo y similares. Un beneficio adicional del gen *AAD-13* es que a diferencia de todos los homólogos de *tfdA* caracterizados hasta la fecha, el *AAD-13* es capaz de degradar las auxinas de piridiloxiacetatos (p. ej., fluroxipir) además de auxinas de fenoxi acirales (p. ej., 2,4-D, MCPA, ácido 4-clorofenoxiacético). Véase la tabla 1. Se muestra en la figura 1 una ilustración general de las reacciones químicas catalizadas por la presente enzima *AAD-13*. (La adición de O₂ es estereoespecífica; la rotura del compuesto intermedio a fenol y glioxilato es espontánea). Debe entenderse que las estructuras químicas en la figura 1 ilustran las cadenas principales moleculares y que están incluidos diferentes grupos R y similares (tales como los mostrados en la tabla 1) pero no se ilustran necesariamente específicamente en la figura 1. Se han usado globalmente múltiples mezclas de diferentes combinaciones de auxinas de fenoxi para abordar espectros de malas hierbas específicos y condiciones medioambientales en diferentes regiones. El uso del gen *AAD-13* en plantas proporciona protección a un espectro mucho más amplio de herbicidas auxínicos, aumentando así la flexibilidad y el espectro de malas hierbas que se pueden controlar. La presente invención también se puede usar para proteger de la deriva u
- 45

otros daños del herbicida auxínico sintético fuera de sitio para toda la variedad de auxinas de fenoxi disponibles en el mercado. La tabla 1 define auxinas de piridiloxi y fenoxi disponibles en el comercio y proporciona las estructuras químicas relevantes.

Tabla 1. Auxinas de fenoxiacetato y piridiloxiacetato. En general la referencia a los herbicidas auxínicos de fenoxi y auxínicos de piridiloxi se hacen del ácido activo, pero algunos están formulados comercialmente como una variedad de las formulaciones del correspondiente éster y estas se consideran igualmente como sustratos para la enzima AAD-13 en la planta, ya que las esterasas de plantas generales convierten estos ésteres en ácidos activos en la planta. Igualmente, la referencia también puede ser para la correspondiente sal orgánica o inorgánica del correspondiente ácido. Los intervalos de tasa de uso posibles pueden ser tratamientos autónomos o en combinación con otros herbicidas tanto en usos de cultivos como de no cultivos.				
Nombre químico	Nº CAS	Posibles intervalos de tasa de uso (g ea/ha)	Intervalos de tasa de uso preferidos (g ea/ha)	Estructura
2,4-D	94-75-7	25-4000	280-1120	
2,4,5-T	93-76-5	25-4000	25-4000	
4-CPA	122-88-3	25-4000	25-4000	
3,4-DA	588-22-7	25-4000	25-4000	
MCPA	94-74-6	25-4000	125-1550	
Triclopir	55335-06-3	50-2000	70 - 840	
Fluroxipir	69377-81-7	25 - 2000	35-560	

Ahora se ha identificado un solo gen (*AAD-13*) que, cuando está genéticamente modificado para la expresión en plantas, tiene las propiedades de permitir el uso de herbicidas auxínicos de fenoxi en las plantas donde nunca había existido tolerancia inherente o no era suficientemente alta para permitir el uso de estos herbicidas. Además, *AAD-13* puede proporcionar protección en la planta frente a herbicidas de piridiloxiacetato donde la tolerancia natural tampoco era suficiente para permitir selectividad, expandiendo la potencial utilidad de estos herbicidas. Las plantas que contienen *AAD-13* solo ahora se pueden tratar de forma secuencial o mezclados en tanque con uno, dos o una combinación de varios herbicidas auxínicos de fenoxi. La tasa para cada herbicida auxínico de fenoxi puede estar en el intervalo de 25 a 4000 g ea/ha, y más típicamente de 100 a 2000 g ea/ha para el control de un amplio espectro de malas hierbas dicotiledóneas. Igualmente, se puede aplicar uno, dos o una mezcla de varios compuestos auxínicos de piridiloxiacetato a las plantas que expresan *AAD-13* con mejor riesgo de daño de dichos herbicidas. La tasa para cada herbicida de piridiloxiacetato puede estar en el intervalo de 25 a 2000 g ea/ha, y más típicamente 35-840 g ea/ha para el control de malas hierbas dicotiledóneas adicionales.

El glifosato se usa extensamente porque controla un espectro muy amplio de especies de malas hierbas de hoja ancha y hierbas. Sin embargo, el uso repetido del glifosato en GTC y en aplicaciones no de cultivo selecciona, y continuará seleccionando por los desplazamientos de malas hierbas a especies más tolerantes de forma natural o biotipos resistentes al glifosato. Las parejas de herbicidas de las mezclas en tanque usados con tasas eficaces que ofrecen el control de la misma especie, pero tienen diferentes modos de acción, se prescriben para estrategias de gestión de más resistencia herbicida como un método para retrasar la aparición de malas hierbas resistentes. El apilamiento del *AAD-13* con un rasgo de tolerancia al glifosato (y/o con otros rasgos de tolerancia a herbicidas) podría proporcionar un mecanismo que permite el control de especies de malas hierbas dicotiledóneas resistentes al glifosato en GTC, permitiendo el uso de glifosato, auxina(s) de fenoxi (p. ej., 2,4-D) y herbicidas auxínicos de piridiloxiacetato (p. ej., fluroxipir) de forma selectiva en el mismo cultivo. Las aplicaciones de estos herbicidas podría ser simultáneamente en una mezcla en tanque que comprende dos o más herbicidas de diferentes modos de acción; aplicaciones individuales de una sola composición herbicida en aplicaciones secuenciales como preplantación, pre-brotación o post-brotación y divididas en el tiempo, en el intervalo de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 meses; o alternatively, se puede aplicar cualquier combinación de cualquier número de herbicidas que represente cada uno una clase química en cualquier momento en el plazo de aproximadamente 7 meses de la plantación del cultivo hasta la recolección del cultivo (o el intervalo previo a la recolección para el herbicida individual, el que sea más corto).

Es importante tener flexibilidad en el control de un amplio espectro de hierbas y malas hierbas de hoja ancha en términos de época de aplicación, tasa de los herbicidas individuales y la capacidad para controlar malas hierbas difíciles o resistentes. Las aplicaciones de glifosato en un cultivo con un apilamiento de gen de resistencia al glifosato/*AAD-13* pueden estar en el intervalo de 250-2500 g ea/ha; el o los herbicidas auxínicos de fenoxi (uno o más) se podrían aplicar desde 25-4000 g ea/ha; y el o los herbicidas auxínicos de piridiloxiacetato (uno o más) se podrían aplicar desde 25-2000 g ea/ha. La o las combinaciones óptimas y la época de esta o estas aplicaciones dependerán de la situación particular, especie y entorno, y lo determinará mejor un experto en la técnica de control de malas hierbas y que tiene el beneficio de la presente descripción.

Los plantones típicamente son resistentes durante todo el ciclo de crecimiento. Las plantas transformadas típicamente serán resistentes a una nueva aplicación de herbicida en cualquier momento en que el gen sea expresado. Se muestra tolerancia al 2,4-D en la presente memoria a lo largo del ciclo de vida usando los promotores consecutivos ensayados hasta ahora (principalmente CsVMV y AtUbi 10). Típicamente se podría esperar esto, pero es una mejora frente a otras actividades no metabólicas donde puede tener un impacto importante en la tolerancia la expresión reducida de un sitio de mecanismo de acción de resistencia, por ejemplo. Un ejemplo es el algodón Roundup Ready, donde las plantas eran tolerantes si se pulverizaban temprano, pero si se pulverizaban demasiado tarde el glifosato se concentraba en los meristemos (porque no es metabolizado y es translocado); los promotores víricos que usaba Monsanto no se expresan bien en las flores. La presente invención proporciona una mejora en relación con esto.

Las formulaciones herbicidas (p. ej., formulación de éster, ácido o sal; o concentrado soluble, concentrado emulsionable, o líquido soluble) y aditivos de mezcla en tanque (p. ej., adyuvantes, tensioactivos, retardantes de deriva o agentes de compatibilidad) pueden afectar significativamente al control de las malas hierbas de un herbicida dado o combinación de uno o más herbicidas. Cualquier combinación de estos con cualquiera de los productos químicos herbicidas mencionados antes está dentro del alcance de esta invención.

Un experto en la técnica también verá el beneficio de combinar dos o más modos de acción para aumentar el espectro de las malas hierbas controladas y/o para el control de especies de malas hierbas naturalmente más tolerantes o resistentes. Esto podría extenderse también a las sustancias químicas para las que la tolerancia a los herbicidas es posible en los cultivos a través de la participación humana (sea de forma transgénica o no transgénica) más allá de los GTC. De hecho, los rasgos que codifican la resistencia al glifosato (p. ej., planta resistente o EPSPS bacterianas (incluyendo cepa CP4 de *Agro.*), glifosato oxidoreductasa (GOX), *GAT*), resistencia al glufosinato (p. ej., *Pat*, *bar*), resistencia a herbicida que inhibe la acetolactato sintasa (ALS) (p. ej., imidazolinona, sulfonilurea, triazopirimidina sulfonanilida, pirimidiniltobenzoatos, y otras sustancias químicas = *AHAS*, *Csr1*, *SurA*, y otros), resistencia a bromoxinilo (p. ej., *Bxn*), resistencia a inhibidores de la enzima HPPD (4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa), resistencia a inhibidores de la fitoeno desaturasa (PDS), resistencia a herbicidas que inhiben el

fotosistema II (p. ej., *psbA*), resistencia a herbicidas que inhiben el fotosistema I, resistencia a herbicidas que inhiben la protoporfirinógeno oxidasa IX (PPO) (p. ej., *PPO-1*), resistencia a herbicidas de fenilurea (p. ej., *CYP76B1*), enzimas degradadoras de dicamba (véase, p. ej., US 20030135879), y otras se podrían apilar solos o en múltiples combinaciones para proporcionar la capacidad de controlar eficazmente o prevenir el cambio de malas hierbas y/o la resistencia a cualquier herbicida de las clases mencionadas antes. La EPSPS modificada in vivo se puede usar en algunas realizaciones preferidas, así como los genes de resistencia al glifosato de clase I, Clase II y Clase III.

En relación con herbicidas adicionales, algunos inhibidores de ALS preferidos adicionales incluyen, pero no se limitan a sulfonilureas (tales como clorsulfurón, halosulfurón, nicosulfurón, sulfometurón, sulfosulfurón, trifloxisulfurón), imidazolononas (tales como imazamox, imazetapir, imazaquin), triazolopirimidina sulfonanilidas (tales como cloransulam-metilo, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam y penoxsulam), pirimidiniltiobenzoatos (tales como bispiribac y piritiobac), y flucarbazona. Algunos inhibidores de la HPPD preferidos incluyen, pero no se limitan a mesotriona, isoxaflutol y sulcotriona. Algunos inhibidores de la PPO preferidos incluyen, pero no se limitan a flumiclorac, flumioxazin, flufenpir, piraflufen, flutiacet, butafenacil, carfentrazona, sulfentrazona, y los éteres difenólicos (tales como acifluorfen, fomesafen, lactofen, y oxifluorfen).

Adicionalmente, AAD-13 solo o apilado con uno o más rasgos de HTC adicionales, se puede apilar con uno o más rasgos agronómicos adicionales (p. ej., resistencia a insectos, resistencia fúngica o tolerancia al estrés, y otros) o rasgos de calidad (p. ej., mayor rendimiento, mejor perfil de aceites, mejor calidad de la fibra y otros). Por lo tanto, la presente invención se puede usar para proporcionar un paquete agronómico completo de mejor calidad del cultivo con la capacidad de control flexible y económico de cualquier número de plagas agronómicas.

La presente invención se refiere en parte a la identificación de una enzima que no solo es capaz de degradar el 2,4-D, sino que también tiene sorprendentemente nuevas propiedades, que distinguen la enzima de la presente invención de proteínas *tfdA* previamente conocidas, por ejemplo. Incluso aunque esta enzima tiene homología muy baja con *tfdA*, los genes de la presente invención todavía se pueden clasificar en general en la misma familia global de dioxigenasas dependientes de α -cetoglutarato. Esta familia de proteínas se caracteriza por tres restos de histidina conservados en un motivo "HX(D/E)X₂₃₋₂₆(T/S)X₁₁₄₋₁₈₃HX₁₀₋₁₃R" que comprende el sitio activo. Las histidinas se coordinan con el ion Fe²⁺ en el sitio activo que es esencial para la actividad catalítica (Hogan *et al.*, 2000). Los experimentos de expresión in vitro preliminares descritos en la presente memoria se diseñaron para ayudar a seleccionar nuevas características. Estos experimentos también indican que la enzima AAD-13 es única frente a otra enzima distinta de la misma clase, descrita en la solicitud de patente presentada previamente (WO/2005/107437; presentada el 2 de mayo, 2005). La enzima AAD-1 de esta solicitud comparte solo aproximadamente 25% de identidad de secuencia con la presente proteína AAD-13.

Más específicamente, la presente invención se refiere en parte al uso de una enzima que no solo es capaz de degradar el 2,4-D, sino también herbicidas de piridiloxiacetato. No se ha descrito previamente una enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato, aparte de las enzimas identificadas previamente AAD-1 y AAD-12 (objeto de las solicitudes de patente PCT US/2005/014737 (WO 2005/107437) y WO 2007/053482, respectivamente), que tenga la capacidad de degradar herbicidas de diferentes clases químicas con diferentes modos de acción. Las enzimas y genes preferidos para usar de acuerdo con la presente invención se denominan en la presente memoria genes y proteínas AAD-13 (ariloxialcanoato dioxigenasa).

Esta invención también se refiere en parte a la identificación y uso de genes que codifican enzimas ariloxialcanoato dioxigenasa que son capaces de degradar herbicidas auxínicos de fenoxi y piridiloxiacetato. Por lo tanto, la presente invención se refiere, en parte, a la degradación de herbicidas de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros ácidos fenoxiacéticos y ácido piridiloxiacético mediante una enzima AAD-13 expresada de forma recombinante.

Las presentes proteínas dieron ensayo positivo para la conversión del 2,4-D en 2,4-diclorofenol ("DCP"; herbicidamente inactivo) en ensayos analíticos. Proteínas parcialmente purificadas de la presente invención pueden convertir rápidamente el 2,4-D en DCP in vitro. Una ventaja adicional que proporcionan las plantas transformadas con AAD-13 es que el o los herbicidas originales son metabolizados a formas inactivas, reduciendo así el potencial de recogida de restos herbicidas en el grano o restos de la recolección.

A la luz de estos descubrimientos, ahora se proporcionan nuevas plantas que comprenden un polinucleótido que codifica este tipo de enzima. Hasta ahora, no había motivación para producir dichas plantas, y no se esperaba que dichas plantas pudieran producir eficazmente esta enzima para hacer a las plantas resistentes no solo a los herbicidas fenoxiacético (tales como el 2,4-D) sino también a los herbicidas de piridiloxiacetato. Por lo tanto, la presente invención proporciona muchas ventajas que hasta ahora no se pensaba que fueran posibles en la técnica.

Se pueden adquirir y cribar cepas disponibles al público (depositadas en colecciones de cultivos tales como ATCC o DSMZ), usando técnicas descritas en la presente memoria para genes nuevos. Las secuencias descritas en la presente memoria se pueden usar para amplificar y clonar los genes homólogos en un sistema de expresión recombinante para el posterior cribado y ensayo de acuerdo con la presente invención.

Como se ha discutido antes en la sección de antecedentes, un organismo que se ha investigado ampliamente por su capacidad para degradar el 2,4-D es *Ralstonia eutropha*.

El gen que codifica la primera enzima en la ruta de degradación es *tfdA*. Véase la patente de EE.UU. nº 6.153.401 y nº de acceso en GENBANK M16730. *TfdA* cataliza la conversión del ácido 2,4-D en DCP herbicidamente inactivo por una reacción de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato. *TfdA* se ha usado en plantas transgénicas para impartir resistencia al 2,4-D en plantas dicotiledóneas (p. ej., algodón y tabaco) normalmente sensibles al 2,4-D.

5 Se ha identificado un gran número de genes de tipo *tfdA* que codifican proteínas capaces de degradar el 2,4-D y se han depositado en la base de datos de NCBI. Muchos homólogos son bastante similares a *tfdA* (>85% de identidad de aminoácidos) y tienen propiedades enzimáticas similares al *tfdA*. Sin embargo, se identifica ahora una pequeña colección de homólogos de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato que tienen un nivel bajo de homología con *tfdA*.

10 La presente invención se refiere en parte a descubrimientos sorprendentes de nuevos usos y funciones de una enzima relacionada vagamente, *sdpA*, de *Sphingobium herbiciaovorans* con homología baja con *tfdA* (35% de identidad de aminoácidos) y homología baja con la AAD-1 (27% de identidad de aminoácidos) recién identificada. Esta enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato purificada en su forma natural se ha mostrado previamente que degrada el 2,4-D y S-diclorprop. Sin embargo, no se ha descrito previamente una enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato que tenga la capacidad de degradar un herbicida selectivo de la clase química de piridiloxiacetato. *SdpA* (de *Sphingobium herbicidovorans*) no se ha expresado nunca en plantas, ni había ninguna motivación para hacerlo, en parte porque el desarrollo de nuevas tecnologías de HTC ha estado limitada debido en gran parte a la eficacia, bajo coste y conveniencia de los GTC.

20 A la luz de la nueva actividad, las proteínas y genes de la presente invención se denominan en la presente memoria proteínas y genes AAD-13. Actualmente se ha confirmado que AAD-13 degrada una variedad de herbicidas auxínicos de fenoxiacetato in vitro. Véase la tabla 5.4.4-1 en el ejemplo 5, más adelante. Además, se ha encontrado sorprendentemente que esta enzima, como se ha descrito por primera vez en la presente memoria, también puede degradar sustratos adicionales de la clase de moléculas de ariloxialcanoato. Los sustratos de importancia agronómica significativa incluyen herbicidas auxínicos de piridiloxiacetato. Este descubrimiento muy novedoso es la base de importantes oportunidades de cultivos tolerantes a herbicidas (HTC) y rasgos de marcadores seleccionables. Esta enzima es única en su capacidad para suministrar actividad de degradación herbicida a un amplio espectro de herbicidas de hoja ancha (auxinas de fenoxiacetato y piridiloxiacetato).

25 Por lo tanto, la presente invención se refiere en parte a la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros herbicidas auxínicos fenoxiacéticos y herbicidas auxínicos de piridiloxiacetato, por una enzima ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-13) expresada de forma recombinante. Esta invención también se refiere en parte a la identificación y usos de genes que codifican una enzima ariloxialcanoato dioxigenasa degradadora (AAD-13) capaz de degradar herbicidas auxínicos de fenoxi y/o piridiloxi.

30 La presente enzima permite la expresión transgénica que da como resultado las combinaciones de herbicidas que controlarían prácticamente todas las malas hierbas de hoja ancha. AAD-13 puede servir como un excelente rasgo de cultivo tolerante a herbicidas (HTC) para apilar con otros rasgos de HTC [p. ej., resistencia a glifosato, resistencia a glufosinato, resistencia al inhibidor de ALS (p. ej., imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina sulfonanilida), resistencia a bromoxinilo, resistencia al inhibidor de HPPD, resistencia al inhibidor de PPO, y otros], y rasgos de resistencia a insectos (*Cry1F*, *Cry1Ab*, *Cry 34/45*, otras proteínas Bt, o proteínas insecticidas de origen no *Bacillus*, y otros) por ejemplo. Adicionalmente, AAD-13 puede servir como un marcador seleccionable para ayudar en la selección de transformantes primarios de plantas genéticamente modificadas con un segundo gen o grupo de genes.

35 Además, el gen microbiano objeto se ha rediseñado de modo que la proteína es codificada por codones que tienen un sesgo hacia el uso de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (hemicot). *Arabidopsis*, maíz, tabaco, algodón, soja, canola y arroz, se han transformado con construcciones que contienen AAD-13 y han demostrado niveles altos de resistencia a los herbicidas auxínicos tanto de fenoxi como de piridiloxi. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a genes "de plantas optimizados" que codifican proteínas de la presente invención.

40 Los grupos oxialcanoato son útiles para introducir un grupo funcional estable en herbicidas. El grupo ácido puede impartir movilidad al floema por "captura del ácido", una propiedad deseable para la acción herbicida y por lo tanto se podría incorporar en nuevos herbicidas con fines de movilidad. Aspectos de la presente invención también proporcionan un mecanismo para crear HTC. Existen muchos potenciales herbicidas comerciales y experimentales que pueden servir como sustratos para la AAD-13. Por lo tanto, el uso de los genes objeto puede dar como resultado también la tolerancia a herbicida a estos otros herbicidas también.

45 Los rasgos de los HTC de la presente invención se pueden usar en nuevas combinaciones con otros rasgos de HTC (incluyendo, pero no limitado a la tolerancia al glifosato). Estas combinaciones de rasgos dan lugar a nuevos métodos de control de especies de malas hierbas (y similares) debido a la resistencia nueva adquirida o la tolerancia a herbicidas (p. ej. glifosato). Por lo tanto, además de los rasgos del HTC, los nuevos métodos para el control de malas hierbas usando herbicidas, para los cuales se ha creado la tolerancia al herbicida por dicha enzima en cultivos transgénicos, están dentro del alcance de la invención.

Esta invención se puede aplicar en el contexto de la comercialización de un rasgo de resistencia al 2,4-D apilado con

los rasgos actuales de resistencia al glifosato en sojas, por ejemplo. Por lo tanto, esta invención proporciona una herramienta para combatir especies de malas hierbas de hoja ancha y/o selección de malas hierbas de hoja ancha resistentes a herbicidas, que da fin a la dependencia extremadamente alta de los cultivadores al glifosato para el control de malas hierbas con diversos cultivos.

- 5 La expresión transgénica del presente gen *ADD-13* se ilustra, por ejemplo, en *Arabidopsis* y el tabaco. Las sojas son un cultivo preferido para la transformación de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, esta invención se puede usar en múltiples otras monocotiledóneas (tales como pastos o césped) y cultivos de dicotiledóneas tales como alfalfa, trébol, especies de árboles, y otros. Igualmente, el 2,4-D (u otros sustratos de la *ADD-13*) se pueden usar de forma más positiva en cultivos de hierbas donde la tolerancia es moderada, y el aumento de tolerancia por este rasgo proporcionaría a los cultivadores la oportunidad de usar estos herbicidas con tasas más eficaces y a lo largo de una temporada de aplicación más amplia sin el riesgo de dañar el cultivo.

- Además también, la presente invención proporciona un solo gen que puede proporcionar resistencia a herbicidas que controlan las malas hierbas de hoja ancha. Este gen se puede usar en múltiples cultivos para permitir el uso de un amplio espectro de combinaciones de herbicidas. La presente invención también puede controlar la resistencia de las malas hierbas a productos químicos actuales, y ayudar en el control del cambio de espectro de malas hierbas que resulta de las prácticas agrícolas actuales. La presente *ADD-13* también se puede usar en esfuerzos para detoxificar eficazmente sustratos de herbicidas adicionales a formas no herbicidas. Por lo tanto, la presente invención proporciona el desarrollo de rasgos de HTC adicionales y/o tecnología de marcador seleccionable.

- Separadamente, o además de, el uso de los presentes genes para producir HTC, los presentes genes también se pueden usar como marcadores seleccionables para la selección satisfactoria de transformantes en cultivos celulares, invernaderos y en el campo. Hay un valor inherente alto para los presentes genes, simplemente como un marcador seleccionable para proyectos de biotecnología. La promiscuidad de *ADD-13* por otros herbicidas auxínicos de ariloxialcanoato proporciona muchas oportunidades para usar este gen para HTC y/o con fines de marcadores seleccionables.

- Proteínas (y aislados de fuentes) de la presente invención. La presente invención proporciona proteínas funcionales. Por "actividad funcional" (o "activa") se entiende en la presente memoria que las proteínas/enzimas para usar de acuerdo con la presente invención tienen la capacidad de degradar o disminuir la actividad de un herbicida (solos o en combinación con otras proteínas). Las plantas que producen proteínas de la presente invención, preferiblemente producirán una "cantidad eficaz" de la proteína, de modo que cuando la planta se trata con un herbicida, el nivel de expresión de proteína es suficiente para hacer a la planta completa o parcialmente resistente o tolerante al herbicida (con una tasa típica, salvo que se especifique otra cosa; las tasas típicas de aplicación se pueden encontrar en el conocido *Herbicide Handbook* (Weed Science Society of America, 8ª edición, 2002), por ejemplo). El herbicida se puede aplicar con tasas que normalmente matarían la planta objetivo, con tasas y concentraciones de uso de campo normales. (Debido a la presente invención, el nivel y/o concentración puede ser opcionalmente mayor que los que se han usado previamente). Preferiblemente, las células de plantas y las plantas de la presente invención están protegidas frente a la inhibición del crecimiento o daño causado por el tratamiento con herbicida. Las plantas y células de plantas transformadas de la presente invención, preferiblemente se hacen resistentes o tolerantes a un herbicida, como se describe en la presente memoria, lo que significa que la planta o células de planta transformadas pueden crecer en presencia de cantidades eficaces de uno o más herbicidas descritos en la presente memoria. Las proteínas preferidas de la presente invención tienen actividad catalítica para metabolizar uno o más compuestos de ariloxialcanoato.

- No se puede discutir fácilmente el término "resistencia" y no usar el verbo "tolerar" o el adjetivo "tolerante". La industria ha pasado innumerables horas debatiendo los cultivos tolerantes a herbicidas (HTC) frente a los cultivos resistentes a herbicidas (HRC). HTC es un término preferido en la industria. Sin embargo, la definición oficial de la Sociedad americana de malherbología (Weed Science Society of America) de resistencia es "la capacidad heredada de una planta a sobrevivir y reproducirse después de exposición a una dosis de un herbicida normalmente letal para el tipo natural. En una planta, la resistencia se puede encontrar de forma natural o se puede inducir mediante técnicas tales como modificación genética o selección de variantes producidas por cultivo de tejido o mutagénesis". Como se usa en la presente memoria, salvo que se indique otra cosa, la "resistencia" a herbicida es heredable y permite que una planta crezca y se reproduzca en presencia de un tratamiento herbicida eficaz típico por un herbicida para una planta dada, como sugiere la edición actual de *The Herbicide Handbook* como la presentación de la presente descripción. Como reconocen los expertos en la técnica, una planta todavía se puede considerar "resistente" incluso aunque sea evidente algún grado de daño en la planta por la exposición al herbicida. Como se usa en la presente memoria, el término "tolerancia" es más amplio que el término "resistencia" e incluye "resistencia" como se define en la presente memoria, así como una capacidad mejorada de una planta particular a aguantar los diferentes grados de daños inducidos por herbicida que típicamente resultarían en plantas naturales del mismo genotipo con la misma dosis herbicida.

- La transferencia de actividad funcional a sistemas vegetales o bacterianos puede implicar una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos para una proteína de la presente invención, integrada en un vector de expresión de proteínas adecuado para el hospedante en el que residirá el vector. Una forma de obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína con actividad funcional, es aislar el material genético

natural de la especie bacteriana que produce la proteína de interés, usando información deducida de la secuencia de aminoácidos de la proteína, como se describe en la presente memoria. Las secuencias naturales se pueden optimizar para la expresión en plantas, por ejemplo, como se describe con más detalle más adelante. Un polinucleótido optimizado también se puede diseñar basándose en la secuencia de proteínas.

5 La presente invención describe clases de proteínas que tienen actividades nuevas identificadas en la presente memoria. Una forma de caracterizar estas clases de proteínas y los polinucleótidos que las codifican, es definiendo un polinucleótido por su capacidad para hibridar, en una variedad de condiciones especificadas, con una secuencia de nucleótidos ejemplificada (su complementaria y/o una sonda o sondas derivadas de cualquier cadena) y/o por su capacidad para la amplificación por PCR usando cebadores obtenidos de estas secuencias ejemplificadas.

10 Hay una serie de métodos para obtener proteínas para usar de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos contra las proteínas descritas en la presente memoria para identificar y aislar otras proteínas de una mezcla de proteínas. Específicamente, se pueden generar anticuerpos contra partes de las proteínas que son las más conservadas o más distintas, comparado con otras proteínas relacionadas. Después, estos anticuerpos se pueden usar para identificar específicamente proteínas equivalentes con la actividad característica por inmunoprecipitación, inmunoensayo de absorción ligado a enzimas (ELISA), o inmunotransferencia. Los anticuerpos contra proteínas descritos en la presente memoria, o contra proteínas equivalentes, o contra fragmentos de esas proteínas, se pueden preparar fácilmente usando procedimientos convencionales. Dichos anticuerpos son un aspecto de la presente invención. Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, preferiblemente producidos en respuesta a una proteína ejemplificada o sugerida.

20 Un experto en la técnica reconocería fácilmente que las proteínas (y genes) de la presente invención se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes. Puesto que se sabe codificar operones de degradación herbicida enteros en elementos transponibles tales como plásmidos, así como integrarlos genómicamente, las proteínas de la presente invención se pueden obtener a partir de una variedad de microorganismos que incluyen, por ejemplo, bacterias recombinantes y/o naturales.

Los mutantes de aislados bacterianos se pueden hacer por procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener mutantes asporógenos por mutagénesis con etilmetanosulfonato (EMS) de un aislado. Las cepas mutantes también se pueden hacer usando luz ultravioleta y nitrosoguanidina por procedimientos bien conocidos en la técnica.

30 Una proteína "de" o "que se puede obtener de" cualquiera de los presentes aislados a los que se hace referencia o sugeridos en la presente memoria, significa que la proteína (o una proteína similar) se puede obtener del aislado o algunas otras fuentes, tales como otra cepa bacteriana o una planta. "Derivado de" también tiene esta connotación, e incluye proteínas que se pueden obtener de un tipo dado de bacteria que son modificadas por la expresión en una planta, por ejemplo. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que, dada la descripción de un gen bacteriano y proteína, se puede modificar genéticamente una planta para producir la proteína. Se puede preparar preparaciones de anticuerpos, sondas de ácidos nucleicos (ADN, ARN o PNA, por ejemplo) y similares, usando las secuencias de polinucleótido y/o aminoácidos descritas en la presente memoria y usadas para cribar y recuperar otros genes relacionados de otras fuentes (naturales).

40 Se pueden usar técnicas de biología molecular convencionales para clonar y secuenciar las proteínas y genes descritos en la presente memoria. Se puede encontrar información adicional en Sambrook et al., 1989, que se incorpora en la presente memoria por referencia.

Polinucleótidos y sondas. La presente invención proporciona además secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas para usar de acuerdo con la presente invención.

45 Se describen métodos de identificación y caracterización de genes que codifican proteínas que tienen la actividad herbicida. Se describen secuencias de nucleótidos únicas que son útiles como sondas de hibridación y/o cebadores para técnicas de PCR. Los cebadores producen fragmentos de genes característicos que se pueden usar en la identificación, caracterización y/o aislamiento de genes específicos de interés. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención codifican proteínas que son distintas de las proteínas previamente descritas.

50 Los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para formar "genes" completos para codificar proteínas o péptidos en una célula hospedante deseada. Por ejemplo, como reconocerá fácilmente el experto en la técnica, los presentes polinucleótidos se pueden poner adecuadamente bajo el control de un promotor en un hospedante de interés, como se conoce fácilmente en la técnica. El nivel de expresión de genes y la expresión específica temporal/tisular puede tener un impacto grande en la utilidad de la invención. En general, niveles mayores de expresión de proteínas de un gen degradante dará como resultado la degradación más rápida y más completa de un sustrato (en este caso un herbicida objetivo). Será conveniente que los promotores expresen el gen objetivo con niveles altos salvo que la expresión alta tenga un impacto negativo resultante en la salud de la planta. Típicamente, se desearía tener el gen *ADD-13* expresado de forma constitutiva para la protección completa de la planta en todas las etapas de crecimiento. Sin embargo, se podría usar alternativamente un gen de resistencia expresado de forma

vegetativa; permitiría el uso del herbicida objetivo en cultivos para el control de malas hierbas y posteriormente controlaría la reproducción sexual del cultivo objetivo por aplicación durante la etapa de floración. Además, los niveles y tiempos de expresión deseados también pueden depender del tipo de planta y del nivel de tolerancia deseado. Algunas realizaciones preferidas usan promotores constitutivos fuertes combinados con potenciadores de la transcripción y similares, para aumentar los niveles de expresión y para potenciar la tolerancia a niveles deseados. Algunas de dichas aplicaciones se describen con más detalle más adelante, antes de la sección de ejemplos.

Como conocen los expertos en la técnica, el ADN típicamente existe en forma bicatenaria. En esta disposición, una cadena es complementaria de la otra cadena y viceversa. Cuando el ADN se replica en una planta (por ejemplo), se producen cadenas complementarias de ADN adicionales. La "cadena codificante" se usa a menudo en la técnica para referirse a la cadena que se une con la cadena de sentido contrario. El ARNm se transcribe desde la cadena de "sentido contrario" del ADN. La cadena de "sentido directo" o "codificante" tiene una serie de codones (un codón son tres nucleótidos que se pueden leer como una unidad de tres restos para especificar un aminoácido particular) que se pueden leer como un marco de lectura abierto (ORF) para formar una proteína o péptido de interés. Con el fin de producir una proteína in vivo, una cadena de ADN típicamente se transcribe en una cadena complementaria de ARNm que se usa como molde para la proteína. Por lo tanto, la presente invención incluye el uso de los polinucleótidos ejemplificados mostrados en la lista de secuencias adjunta y/o equivalentes que incluyen las cadenas complementarias. Los ARN y APN (ácidos peptidonucleicos) que son funcionalmente equivalentes a las moléculas de ADN ejemplificadas están incluidos en la presente invención.

En una realización de la presente invención, se pueden cultivar aislados bacterianos en condiciones que producen una alta multiplicación del microbio. Después de tratar el microbio para proporcionar ácido nucleico genómico monocatenario, el ADN se puede poner en contacto con los cebadores de la invención y someter a amplificación por la PCR. Los fragmentos característicos de los genes de interés se amplificarán por el procedimiento, identificando así la presencia del o de los genes de interés.

Aspectos adicionales de la invención incluyen genes y aislados identificados usando los métodos y secuencias de nucleótidos descritos en la presente memoria. Los genes así identificados pueden codificar proteínas de resistencia a herbicidas de la presente invención.

Las proteínas y genes para usar de acuerdo con la presente invención se pueden identificar y obtener usando sondas de oligonucleótidos, por ejemplo. Estas sondas son secuencias de nucleótidos detectables, que se pueden detectar en virtud de un marcador adecuado o pueden ser inherentemente fluorescentes, como se describe en la solicitud internacional n° WO 93/16094. Las sondas (y los polinucleótidos de la presente invención) pueden ser ADN, ARN o APN. Además de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), y uracilo (U; para las moléculas de ARN), las sondas sintéticas (y polinucleótidos) de la presente invención también pueden tener inosina (una base neutra que puede emparejarse con las cuatro bases; usada a veces en lugar de una mezcla de las cuatro bases en sondas sintéticas) y/u otras bases sintéticas (no neutras). Por lo tanto, cuando se menciona un oligonucleótido degenerado, sintético, en la presente memoria, y se usa "N" o "n" de forma genérica, "N" o "n" pueden ser G, A, T, C o inosina. Los códigos ambiguos como se usan en la presente memoria están de acuerdo con los convenios de nomenclatura convencionales de la IUPAC, como se presenta en la presente solicitud (por ejemplo, R significa A o G, Y significa Co o T; etc.).

Como se conoce bien en la técnica, si una molécula de sonda hibrida con una muestra de ácido nucleico, se puede suponer razonablemente que la sonda y la muestra tienen homología/similitud/identidad sustancial. Preferiblemente, se lleva a cabo primero la hibridación del polinucleótido seguido de lavados en condiciones de restricción baja, moderada o alta, por técnicas bien conocidas en la materia, como se describe, por ejemplo, en Keller, G.H., M.M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, NY, pág. 169-170. Por ejemplo, como se expone en el mismo, se pueden lograr condiciones de restricción bajas lavando primero con 2x SSC (citratato salino estándar)/SDS al 0,1% (dodecilsulfato sódico) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se llevan a cabo típicamente dos lavados. Se puede lograr una restricción mayor disminuyendo la concentración de sal y/o elevando la temperatura. Por ejemplo, al lavado descrito antes le pueden seguir dos lavados con 0,1x SSC/SDS al 0,1% durante 15 minutos cada uno a temperatura ambiente, seguido de posteriores lavados con 0,1x SSC/SDS al 0,1% durante 30 minutos cada uno a 55°C. Estas temperaturas se pueden usar con otros protocolos de hibridación y lavado expuestos en la presente memoria, como conocerán los expertos en la técnica (se puede usar SSPE como la sal en lugar de SSC, por ejemplo). El 2x SSC/SDS al 0,1% se puede preparar añadiendo 50 ml de 20x SSC y 5 ml de SDS al 10% a 445 ml de agua. El 20x SSC se puede preparar combinando NaCl (175,3 g/0,150 M), citrato sódico (88,2 g/0,015 M), y agua, ajustando el pH a 7,0 con NaOH 10 N, y después ajustando el volumen a 1 litro. El SDS al 10% se puede preparar disolviendo 10 g de SDS en 50 ml de agua tratada en autoclave, y después diluyendo a 100 ml.

La detección de la sonda proporciona un medio para determinar de una forma conocida si la hibridación se ha mantenido. Dicho análisis con sonda proporciona un método rápido para identificar genes de la presente invención. Los segmentos de nucleótidos usados como sondas de acuerdo con la invención, se pueden sintetizar usando un sintetizador de ADN y procedimientos convencionales. Estas secuencias de nucleótidos también se pueden usar como cebadores de la PCR para amplificar genes de la presente invención.

Las características de hibridación de una molécula se pueden usar para definir polinucleótidos de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención incluye polinucleótidos (y/o sus complementos, preferiblemente sus complementos enteros) que hibridan con un polinucleótido ejemplificado en la presente memoria. Es decir, una forma de definir un gen (y la proteína que codifica), por ejemplo, es por su capacidad para hibridar (en cualquiera de las condiciones descritas específicamente en la presente memoria) con un gen conocido o ejemplificado específicamente.

Como se usa en la presente memoria, condiciones "restrictivas" para la hibridación, se refieren a condiciones que logran el mismo, o aproximadamente el mismo, grado de especificidad de hibridación que las condiciones usadas por los actuales autores de la invención. Específicamente, la hibridación de ADN inmovilizado en transferencias Southern con sondas específicas de genes marcadas con ³²P, se puede llevar a cabo por métodos convencionales. En general, la hibridación y posteriores lavados se pueden llevar a cabo en condiciones que permiten la detección de secuencias objetivo. Para las sondas de genes de ADN bicatenario, la hibridación se puede llevar a cabo durante la noche a 20-25°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido de ADN en 6x SSPE, 5x solución de Denhardt, SDS al 0,1%, ADN desnaturizado 0,1 mg/ml. La temperatura de fusión se describe por la siguiente fórmula:

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6\text{Log}[\text{Na}^+] + 0,41(\%G+C) - 0,61(\% \text{ formamida}) - 600/\text{longitud del dúplex en pares de bases}.$$

Los lavados típicamente se pueden llevar a cabo como sigue:

(1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 min en 1x SSPE, SDS al 0,1% (lavado de restricción baja).

(2) Una vez a T_m-20°C durante 15 minutos en 0,2x SSPE, SDS al 0,1% (lavado de restricción moderada).

Para las sondas de oligonucleótidos, la hibridación se puede llevar a cabo durante la noche a 10-20°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido en 6x SSPE, 5x solución de Denhardt, SDS al 0,1%, ADN desnaturizado 0,1 mg/ml. La T_m para las sondas de oligonucleótidos se puede determinar con la siguiente fórmula:

$$T_m (^\circ\text{C}) = 2(\text{número de pares de bases T/A}) + 4(\text{número de pares de bases G/C})$$

(Suggs et al., 1981).

Los lavados típicamente se pueden llevar a cabo como sigue:

(1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 min en 1x SSPE, SDS al 0,1% (lavado de restricción baja).

(2) Una vez a la temperatura de hibridación durante 15 minutos en 1x SSPE, SDS al 0,1% (lavado de restricción moderada).

En general, la sal y/o temperatura se pueden alterar para cambiar la restricción. Con un fragmento de ADN marcado de >70 o similar, bases de longitud, se pueden usar las siguientes condiciones:

Baja: 1 o 2x SSPE, temperatura ambiente

Baja: 1 o 2x SSPE, 42°C

Moderada: 0,2 o 1x SSPE, 65°C

Alta: 0,1x SSPE, 65°C.

La formación de dúplex y la estabilidad dependen de la complementariedad sustancial entre las dos cadenas de un híbrido, y como se ha indicado antes, se puede tolerar un cierto grado de apareamiento erróneo. Por lo tanto, las secuencias de sondas de la presente invención incluyen mutaciones (tanto individuales como múltiples), eliminaciones, inserciones de las secuencias descritas, y combinaciones de las mismas, en donde dichas mutaciones, inserciones y eliminaciones permiten la formación de híbridos estables con el polinucleótido objetivo de interés. Las mutaciones, inserciones y eliminaciones se pueden producir en una secuencia de polinucleótido dada de muchas formas, y estos métodos son conocidos para el experto en la técnica. Otros métodos pueden hacerse conocidos en el futuro.

Tecnología de PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una síntesis cebada, enzimática, repetitiva, de una secuencia de ácido nucleico. Este procedimiento es bien conocido y usado habitualmente por los expertos en esta técnica (véase, Mullis, patentes de EE.UU. n° 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159).

La PCR se basa en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN de interés que está flanqueado por dos cebadores oligonucleótidos que hibridan cadenas opuestas de la secuencia objetivo. Los cebadores se obtienen preferiblemente con los extremos 3' dirigiéndose uno hacia otro. Los ciclos repetidos de desnaturización térmica del molde, reasociación de los cebadores a sus secuencias complementarias, y extensión de los cebadores reasociados con una ADN polimerasa, da como resultado la amplificación del segmento definido por los extremos 5'

de los cebadores de la PCR. El producto de extensión de cada cebador puede servir como un molde para el otro cebador, de modo que cada ciclo esencialmente duplica la cantidad del fragmento de ADN producido en el ciclo previo. Esto produce la acumulación exponencial del fragmento objetivo específico, hasta varios millones de veces en unas pocas horas. Usando una ADN polimerasa termoestable tal como la polimerasa *Taq*, aislada de la bacteria termófila, *Thermus aquaticus*, el procedimiento de amplificación puede ser completamente automático. Los expertos en la técnica conocen otras enzimas que se pueden usar.

Las secuencias de ADN ejemplificadas, o segmentos de las mismas, se pueden usar como cebadores para la amplificación por la PCR. Cuando se lleva a cabo la amplificación por PCR, se puede tolerar un cierto grado de apareamiento erróneo entre el cebador y el molde. Por lo tanto, las mutaciones, eliminaciones e inserciones (en especial adiciones de los nucleótidos al extremo 5') de los cebadores ejemplificados, están dentro del alcance de la presente invención. Las mutaciones, eliminaciones e inserciones se pueden producir en un cebador dado por métodos conocidos para el experto en la técnica.

Modificación de genes y proteínas. Los presentes genes y proteínas se pueden fusionar con otros genes y proteínas para producir proteínas quiméricas o de fusión. Los genes y proteínas útiles de acuerdo con la presente invención, incluyen no solo las secuencias de longitud entera ejemplificadas específicamente, sino también partes, segmentos y/o fragmentos (que incluyen fragmentos contiguos y eliminaciones internas y/o terminales, comparado con las moléculas de longitud entera) de esas secuencias, variantes, mutantes, quiméricas y fusiones de los mismos. Las proteínas de la presente invención pueden tener aminoácidos sustituidos con la condición de que retengan la actividad funcional deseada. Los genes "variantes" tienen secuencias de nucleótidos que codifican las mismas proteínas o proteínas equivalentes que tienen actividad equivalente o similar a una proteína ejemplificada.

Las expresiones "proteínas variantes" y "proteínas equivalentes" se refieren a proteínas que tienen la misma o esencialmente la misma actividad biológica/funcional contra los sustratos objetivo y secuencias equivalentes como las proteínas ejemplificadas. Como se usa en la presente memoria, la referencia a una secuencia "equivalente" se refiere a secuencias que tienen sustituciones, eliminaciones, adiciones o inserciones de aminoácidos que mejoran o no tiene una actividad que afecte de forma adversa en una extensión significativa. Los fragmentos que retienen la actividad también están incluidos en esta definición. Los fragmentos y otros equivalentes que retienen la misma o similar función o actividad que un fragmento correspondiente de una proteína ejemplificada, están dentro del alcance de la presente invención. Los cambios, tales como sustituciones o adiciones de aminoácidos, se pueden hacer para una variedad de fines, tales como aumentar (o disminuir) la estabilidad de proteasa de la proteína (sin disminuir material/sustancialmente la actividad funcional de la proteína), eliminar o añadir un sitio de restricción, y similares. Las variaciones de genes se pueden construir fácilmente usando técnicas convencionales para hacer mutaciones puntuales, por ejemplo.

Además, la patente de EE.UU. n° 5.605.793, por ejemplo, describe métodos para generar diversidad molecular adicional usando reasociación de ADN después de fragmentación aleatoria o enfocada. Esto se puede denominar como "barajado", que típicamente implica la mezcla de fragmentos (de un tamaño deseado) de dos o más moléculas de ADN diferentes, seguido de ciclos repetidos de renaturalización. Esto puede mejorar la actividad de una proteína codificada por un gen de partida. El resultado es una proteína quimérica que tiene actividad mejorada, especificidad de sustrato alterada, estabilidad enzimática mayor, estereoespecificidad alterada, u otras características.

El "barajado" se puede diseñar y dirigir después de obtener y examinar las coordenadas atómicas 3D (tridimensionales) y la estructura cristalina de una proteína de interés. Por lo tanto, el "barajado enfocado" se puede dirigir a determinados segmentos de una proteína que son ideales para la modificación, tales como segmentos expuestos en la superficie, y preferiblemente no segmentos internos que están implicados en el plegado de la proteína y la integridad estructuras 3D esencial.

Los cambios específicos para el "sitio activo" de la enzima se pueden hacer para afectar a la funcionalidad inherente con respecto a la actividad o estereoespecificidad (véase el alineamiento en la figura 2).

La estructura cristalina de tauD conocida se usó como un modelo de dioxigenasa para determinar los restos del sitio activo mientras están unidos a su sustrato inherente la taurina. Elkins et al. (2002) "X-ray crystal structure of *Escherichia coli* taurine/alpha-ketoglutarate dioxxygenase complexed to ferrous iron and substrates," *Biochemistry* 41(16):5185-5192. En relación con la optimización de secuencias y designación de sitios activos de enzimas, véase Chakrabarti et al., *PNAS*, (Aug. 23, 2005), 102(34):12035-12040.

Los genes variantes se pueden usar para producir proteínas variantes; se pueden usar hospedantes recombinantes para producir las proteínas variantes. Usando estas técnicas de "barajado de genes", se pueden construir genes y proteínas equivalentes que comprende cualquiera de 5, 10 o 20 restos contiguos (aminoácidos o nucleótidos) de cualquier secuencia ejemplificada en la presente memoria. Como conoce un experto en la técnica, las técnicas de barajado de genes, por ejemplo, se pueden ajustar para obtener equivalentes que tienen, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122,

123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287 o 288 restos contiguos (aminoácidos o nucleótidos), que corresponden a un segmento (del mismo tamaño) en cualquiera de las secuencias ejemplificadas o sugeridas (o los complementos (complementos enteros) de las mismas). También se pueden usar segmentos de tamaños similares, en especial aquellos para las regiones conservadas, como sondas y/o cebadores.

Se pueden hacer fragmentos de genes de longitud entera usando exonucleasas o endonucleasas de acuerdo con procedimientos convencionales. Por ejemplo, se pueden usar enzimas tales como *Ba31* o mutagénesis dirigida, para cortar sistemáticamente nucleótidos de los extremos de estos genes. Además, se pueden obtener genes que codifican fragmentos activos usando una variedad de enzimas de restricción. Se pueden usar proteasas para obtener directamente fragmentos activos de estas proteínas.

Está dentro del alcance de la invención, como se describe en la presente memoria, que las proteínas se pueden truncar y todavía retener actividad funcional. Por "proteína truncada" se entiende que una parte de una proteína se puede escindir mientras que la proteína truncada que queda retiene y presenta la actividad deseada después de la escisión. La escisión se puede lograr por diferentes proteasas. Además, se pueden producir proteínas escindidas eficazmente usando técnicas de biología molecular, en donde las bases de ADN que codifican dicha proteína se eliminan por digestión con endonucleasas de restricción u otras técnicas disponibles para el experto en la técnica. Después de truncado, dichas proteínas se pueden expresar en sistemas heterólogos tales como *E. coli*, baculovirus, sistemas víricos basados en plantas, levaduras, y similares, y después ponerlos en ensayos de insectos como se describe en la presente memoria, para determinar la actividad. Es bien conocido en la técnica que se pueden producir con éxito proteínas truncadas de modo que retienen la actividad funcional, mientras tienen menos de la secuencia entera de longitud completa. Por ejemplo, se pueden usar proteínas *B.t.* en una forma truncada (proteína núcleo).

Como se usa en la presente memoria, el término "proteína" puede incluir truncados funcionalmente activos.

En algunos casos, en especial para la expresión en plantas, puede ser ventajoso usar genes truncados que expresan proteínas truncadas. Los genes truncados preferidos típicamente codificarán 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de la proteína de longitud entera.

Algunas proteínas de la presente invención se han ejemplificado específicamente en la presente memoria. Puesto que estas proteínas son simplemente de ejemplo de las proteínas de la presente invención, será fácilmente evidente que la presente invención comprende proteínas variantes o equivalentes (y secuencias de nucleótidos que codifican los equivalentes de las mismas) que tienen la misma o similar actividad que las proteínas ejemplificadas. Las proteínas equivalentes tendrán similitud de aminoácidos (y/o homología) con una proteína ejemplificada. La identidad de aminoácidos típicamente será al menos 60%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, y puede ser al menos 95%. Las proteínas preferidas de la presente invención también se pueden definir en términos de intervalos de identidad y/o similitud más particulares. Por ejemplo, la identidad y/o similitud puede ser 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%, comparado con una secuencia ejemplificada o sugerida en la presente memoria. Cualquier número citado antes se puede usar para definir los límites superior e inferior.

Salvo que se especifique de otra forma, como se usa en la presente memoria, el porcentaje de identidad y/o similitud de secuencia de dos ácidos nucleicos, se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, modificado en Karlin y Altschul 1993. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST se llevan a cabo con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12. Se puede usar BLAST con huecos como describen Altschul *et al.*, 1997. Cuando se usan los programas BLAST y XBLAST con huecos, se usan los parámetros por defecto de los respectivos programas (NBLAST y XBLAST). Véase el sitio en la red NCBI/NIH. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, se usa la función AlignX de Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., North Bethesda, MD, EE.UU.), usando los parámetros por defecto. Estos eran: una penalización por apertura de hueco de 15, una penalización por extensión de hueco de 6,66, y un intervalo de penalización por separación de huecos de 8.

También se pueden cambiar varias propiedades y características tridimensionales de la proteína, sin afectar de forma adversa a la actividad/funcionalidad de la proteína. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se pueden tolerar/hacer que no afecten de forma adversa a la actividad y/o configuración tridimensional de la molécula. Los aminoácidos se pueden poner en las siguientes clases: no polares, polares no cargados, básicos y ácidos. Las sustituciones conservativas por las cuales un aminoácido de una clase se sustituye por otro aminoácido de la misma

clase, están dentro del alcance de la presente invención, siempre que la sustitución no sea adversa para la actividad biológica del compuesto. La tabla 2 proporciona una lista de ejemplos de aminoácidos que pertenecen a cada clase.

Tabla 2

Clase de aminoácido	Ejemplos de aminoácidos
No polar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polar no cargado	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácido	Asp, Glu
Básico	Lys, Arg, His

- 5 En algunos casos, también se pueden hacer sustituciones no conservativas. Sin embargo, las sustituciones preferidas no disminuyen significativamente la actividad funcional/biológica de la proteína.

Como se usa en la presente memoria, la referencia a polinucleótidos “aislados” y/o proteínas “purificadas” se refiere a esas moléculas, cuando no están asociadas con las otras moléculas con las que se encontrarían en la naturaleza. Por lo tanto, la referencia a “aislado” y/o “purificado” significa la implicación de la “mano del hombre” como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, un “gen” bacteriano de la presente invención puesto en una planta para la expresión, es un “polinucleótido aislado”. Igualmente, una proteína derivada de una proteína bacteriana y producida por una planta es una “proteína aislada”.

Debido a la degeneración/redundancia del código genético, una variedad de secuencias de ADN diferentes puede codificar las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria. Está dentro de la experiencia del experto en la técnica, el crear secuencias de ADN alternativas que codifican la misma o esencialmente la misma proteína. Estas secuencias de ADN variantes están dentro del alcance de la presente invención. Esto también se describe con más detalle más adelante en la sección titulada “Optimización de secuencia para la expresión en plantas”.

Optimización de secuencia para la expresión en plantas. Para obtener la expresión alta de genes heterólogos en plantas, en general se prefiere modificar genéticamente los genes, de modo que sean expresados más eficazmente en (el citoplasma de) las células de plantas. El maíz es una de dichas plantas, donde se puede preferir rediseñar el o los genes heterólogos antes de transformación para aumentar el nivel de expresión de los mismos en dicha planta. Por lo tanto, una etapa adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana es volver a modificar genéticamente un gen heterólogo para la expresión óptima, usando la tendencia de codones alineados más cercanos con la secuencia de la planta objetivo, sea una especie dicotiledónea o monocotiledónea. Las secuencias también se pueden optimizar para la expresión en uno de los tipos de plantas más particulares descritos en otra parte en la presente memoria.

Hospedantes transgénicos. Los genes que codifican proteínas de la presente invención se pueden introducir en una amplia variedad de hospedantes microbianos o plantas. La presente invención incluye células de plantas transgénicas y plantas transgénicas. Las plantas preferidas (y células de plantas) son maíz, *Arabidopsis*, tabaco, sojas, algodón, canola, arroz, trigo, césped, leguminosas, forrajes (p. ej., alfalfa y trébol), pastos, y similares. También se pueden hacer otros tipos de plantas transgénicas de acuerdo con la presente invención, tales como frutas, verduras, plantas ornamentales y árboles. Más en general, se pueden usar dicotiledóneas y/o monocotiledóneas, en diferentes aspectos de la presente invención.

En realizaciones preferidas, la expresión de genes da, directa o indirectamente la producción intracelular (y mantenimiento) de la o las proteínas de interés. Las plantas se pueden hacer resistentes a herbicidas de esta forma. Dichos hospedantes se pueden denominar hospedantes y/o células transgénicos, recombinantes, transformados y/o transfectados. En algunos aspectos de esta invención (cuando se clona y prepara el gen de interés, por ejemplo), se pueden producir células microbianas (preferiblemente bacterianas) y usar de acuerdo con técnicas convencionales, con el beneficio de la presente descripción.

Las células de plantas transfectadas con un polinucleótido de la presente invención, se pueden regenerar en plantas completas. La presente invención incluye cultivos celulares que incluyen cultivos de células de tejidos, cultivos líquidos y cultivos en placa. Las semillas producidas por y/o usadas para generar plantas de la presente invención también están incluidas dentro del alcance de la presente invención. Otros tejidos y partes de plantas también están incluidos en la presente invención. La presente invención incluye igualmente, métodos de producción de plantas o células que comprenden un polinucleótido de la presente invención. Un método preferido de producción de dichas plantas es plantando una semilla de la presente invención.

Aunque se prefieren plantas, la presente invención también incluye la producción de ADD-13 recombinante muy activo en una cepa hospedante de *Pseudomonas fluorescens* (Pf), por ejemplo. La presente invención incluye

temperaturas de crecimiento preferidas para mantener la ADD-13 activa soluble en este hospedante y un procedimiento de formulación que puede almacenar y restablecer la actividad de ADD-13 en solución; y un procedimiento de liofilización que puede retener la actividad de ADD-13 durante el almacenamiento y vida en anaquel a largo plazo.

- 5 Inserción de genes para formar hospedantes transgénicos. Un aspecto de la presente invención es la transformación/transfección de plantas, células de plantas y otras células hospedantes con polinucleótidos de la presente invención, que expresan proteínas de la presente invención. Las plantas transformadas de esta forma se pueden hacer resistentes a una variedad de herbicidas con diferentes modos de acción.

- 10 Está disponible una amplia variedad de métodos para introducir un gen que codifica una proteína deseada en el hospedante objetivo, en condiciones que permitan el mantenimiento y expresión estables del gen. Estos métodos son bien conocidos para los expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.135.867.

- 15 Los vectores que comprenden un polinucleótido de ADD-13 están incluidos en el alcance de la presente invención. Por ejemplo, está disponible un gran número de vectores de clonación que comprenden un sistema de replicación en *E. coli* y un marcador que permite la selección de las células transformadas, para la preparación para la inserción de genes extraños en plantas superiores. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, serie pUC, serie M13mp, pACYC184, etc. Por consiguiente, la secuencia que codifica la proteína se puede insertar en el vector en un sitio de restricción adecuado. El plásmido resultante se usa para la transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutriente adecuado, después se recogen y se lleva a cabo la lisis. El plásmido se recupera purificándolo del ADN genómico. Se llevan a cabo el análisis de secuencia, análisis de restricción, electroforesis y otros métodos de bioquímica-biología molecular, en general como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN usada se puede digerir por restricción y juntar con la siguiente secuencia de ADN. Cada secuencia de plásmido se puede clonar en el mismo u otros plásmidos. Dependiendo del método de inserción de los genes deseados en la planta, pueden ser necesarias otras secuencias de ADN. Si, por ejemplo, se usa el plásmido Ti o Ri para la transformación de la célula de planta, entonces al menos el borde derecho, pero a menudo el borde derecho y el borde izquierdo del ADN-T del plásmido Ti o Ri, debe unirse como la región flanqueadora de los genes que se van a insertar. El uso del ADN-T para la transformación de células de plantas se ha investigado intensivamente y se ha descrito en el documento EP 120516.

- 25 Está disponible un gran número de técnica para insertar ADN en una célula hospedante de planta. Estas técnicas incluyen la transformación con ADN-T usando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agentes de transformación, fusión, inyección, biolística (bombardeo con micropartículas), filamentos de carburo de silicio, haces de aerosol, PEG o electroporación, así como otros métodos posibles. Si se usan *Agrobacteria* para la transformación, el ADN que se va a insertar se debe clonar en plásmido especiales, en concreto en un vector intermedio o en un vector binario. Los vectores intermedios se pueden integrar en el plásmido Ti o Ri por recombinación homóloga debido a secuencias que son homólogas a las secuencias en el ADN-T. El plásmido Ti o Ri también comprende la región vir necesaria para la transferencia del ADN-T. Los vectores intermedios pueden replicarse ellos mismos en *Agrobacteria*. El vector intermedio se puede transferir a *Agrobacterium tumefaciens* mediante un plásmido auxiliar (conjugación). Los vectores binarios se pueden replicar ellos mismos tanto en *E. coli* como en *Agrobacteria*. Comprenden un gen marcador de selección y un conector o policonector que están enmarcados por las regiones borde derecho e izquierdo del ARN-T. Se pueden transformar directamente en *Agrobacteria*.

- 30 La *Agrobacterium* usada como célula hospedante comprende un plásmido que lleva una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia del ADN-T a la célula de la planta. Puede tener contenido ADN-T adicional. La bacteria así transferida se usa para la transformación de células de plantas. Los explantes de plantas se pueden cultivar ventajosamente con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para la transferencia del ADN a la célula de planta. Se pueden regenerar entonces plantas enteras a partir del material de planta infectado (por ejemplo, trozos de hojas, segmentos de tallos, raíces, pero también protoplastos o células cultivadas en suspensión) en un medio adecuado, que puede contener antibióticos o biocidas para la selección. Después se puede ensayar en las plantas así obtenidas la presencia del ADN insertado. No hay demandas especiales de los plásmidos en el caso de inyección y electroporación. Se pueden usar plásmidos ordinarios, tales como, por ejemplo, derivados de pUC.

- 35 Las células transformadas crecen dentro de la plata de la forma habitual. Pueden formar células germinales y transmitir el o los rasgos transformados a las plantas prole. Estas plantas se pueden desarrollar de la forma habitual y cruzar con plantas que tienen los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las correspondientes propiedades fenotípicas.

- 40 En algunas realizaciones preferidas de la invención, los genes que codifican proteína bacteriana son expresados a partir de unidades transcripcionales insertadas en el genoma de la planta. Preferiblemente, dichas unidades transcripcionales son vectores recombinantes capaces de integración estable en el genoma de la planta y permiten la selección de líneas de plantas transformadas que expresan ARNm que codifica las proteínas.

Una vez que el ADN insertado se ha integrado en el genoma, es relativamente estable en él (y no vuelve a salir).

Normalmente contiene un marcador de selección que confiere a las células de la planta transformadas resistencia a un biocida o un antibiótico, tal como la kanamicina, G418, bleomicina, higromicina o cloranfenicol, entre otros. Los marcadores seleccionables de plantas también pueden proporcionar típicamente resistencia a diferentes herbicidas tales como el glufosinato (p. ej., *PAT/bar*), glifosato (*EPSPS*), inhibidores de ALS (p. ej., imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina sulfonanilida, y otros), bromoxinil, resistencia a inhibidor de HPPD, inhibidores de PPO, inhibidores de ACC-asa, y muchos otros. El marcador usado individualmente debería permitir, en consecuencia, la selección de las células transformadas en lugar de las células que no contienen el ADN insertado. El o los genes de interés son expresados preferiblemente por promotores constitutivos o inducibles en la célula de planta. Una vez expresado, el ARNm se traduce en proteínas, incorporando así aminoácidos de interés en la proteína. Los genes que codifican una proteína expresada en las células de plantas pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido o un promotor inducible.

Existen varias técnicas para introducir vectores recombinantes extraños en células de plantas y para obtener plantas que mantienen y expresan establemente el gen introducido. Dichas técnicas incluyen la introducción de material genético como recubrimiento sobre micropartículas directamente en las células (patentes de EE.UU. nº 4.945.050 de Cornell y 5.141.131 de DowElanco, ahora Dow AgroSciences, LLC). Además, las plantas se pueden transformar usando *Agrobacterium* technology, véase las patentes de EE.UU. nº 5.177.010 de la University of Toledo; 5.104.310 de Texas A&M; solicitud de patente europea 0131624B1; solicitudes de patente europea 120516, 159418B1 y 176.112 de Schilperoot; patentes de EE.UU. nº 5.149.645, 5.469.976, 5.464.763 y 4.940.838 y 4.693.976 de Schilperoot; solicitudes de patente europea 116718, 290799, 320500, todas de Max Planck; solicitudes de patente europea 604662 y 627752, y patente de EE.UU. nº 5.591.616, de Japan Tobacco; solicitudes de patente europea 0267159 y 0292435, y patente de EE.UU. nº 5.231.019, todas de Ciba Geigy, ahora Syngenta; patentes de EE.UU. nº 5.463.174 y 4.762.785, ambas de Calgene; y patentes de EE.UU. nº 5.004.863 y 5.159.135, ambas de Agracetus. Otra tecnología incluye la tecnología de filamentos. Véanse las patentes de EE.UU. nº 5.302.523 y 5.464.765, ambas de Zeneca, ahora Syngenta. Otra tecnología de transformación de suministro de ADN directo incluye la tecnología de haz de aerosol. Véase la patente de EE.UU. nº 6.809.232. También se ha usado la tecnología de electroporación para transformar plantas. Véase el documento WO 87/06614 de Boyce Thompson Institute; patentes de EE.UU. nº 5.472.869 y 5.384.253, ambas de Dekalb; y WO 92/09696 y WO 93/21335, ambas de Plant Genetic Systems. Además, también se pueden usar vectores víricos para producir plantas transgénicas que expresan la proteína de interés. Por ejemplo, las plantas monocotiledóneas se pueden transformar con un vector vírico usando los métodos descritos en la patente de EE.UU. nº 5.569.597 de Mycogen Plant Science y Ciba-Geigy (ahora Syngenta), así como las patentes de EE.UU. nº 5.589.367 y 5.316.931, ambas de Biosource, ahora Large Scale Biology.

Como se ha mencionado previamente, la forma en la que se introduce la construcción de ADN en el hospedante de planta no es crítico en esta invención. Se puede usar cualquier método que proporcione la transformación eficaz. Por ejemplo, se describen diferentes métodos para la transformación de células de plantas en la presente memoria, e incluyen el uso de plásmidos Ti o Ri, y similares para llevar a cabo la transformación mediada por *Agrobacterium*. En muchos, será conveniente tener la construcción usada para la transformación bordeada por uno o ambos lados por bordes de ADN-T, más específicamente el borde derecho. Esto es particularmente útil cuando la construcción usa *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como un modo para la transformación, aunque los bordes de ATN-T pueden tener utilidad con otros modos de transformación. Cuando se usa *Agrobacterium* para la transformación de las células de plantas, se puede usar un vector que se puede introducir en el hospedante para la recombinación homóloga con ADN-T o el plásmido Ti o Ri presente en el hospedante. La introducción del vector se puede realizar por electroporación, conjugación triparental y otras técnicas para transformar bacterias Gram negativas que son conocidas para los expertos en la técnica. La forma de la transformación del vector en el hospedante *Agrobacterium* no es crítico en esta invención. El plásmido Ti o Ri que contiene el ADN-T para la recombinación puede ser capaz o no ser capaz de causar la formación de agalla, y no es crítico para dicha invención, siempre que los genes vir estén presentes en dicho hospedante.

En algunos casos, donde se usa *Agrobacterium* para la transformación, la construcción de la expresión que está dentro de los bordes del ADN-T se insertará en un vector de amplio espectro tal como pRK2 o derivados del mismo, como se describe en el documento EPO 0120515. Incluidos dentro de la construcción de expresión y el ADN-T habrá uno o más marcadores como se describen en la presente memoria, que permiten la selección del *Agrobacterium* transformado y células de planta transformadas. El marcador particular usado no es esencial para esta invención, dependiendo el marcador preferido del hospedante y construcción usados.

Para la transformación de las células de planta usando *Agrobacterium*, se pueden combinar explantes e incubarlos con *Agrobacterium* transformada durante suficiente tiempo para permitir la transformación de los mismos. Después de la transformación, se matan las *Agrobacteria* por selección con el antibiótico adecuado y las células de planta se cultivan con el medio selectivo adecuado. Una vez formados los callos, se puede estimular la formación de brotes usando las hormonas vegetales adecuadas de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica del cultivo de tejidos vegetales y regeneración de plantas. Sin embargo, no siempre es necesaria una etapa intermedia de callo. Después de la formación del brote, dichas células vegetales se pueden transferir a medio que estimula la formación de raíces completando así la regeneración de la planta. Las plantas después se pueden desarrollar en semillas y dichas semillas se pueden usar para establecer generaciones futuras. Independientemente de la técnica de transformación, el gen que codifica una proteína bacteriana se incorpora preferiblemente en un vector de

transferencia de genes adaptado para expresar dicho gen en una célula vegetal, por inclusión en el vector de un elemento regulador del promotor de planta, así como regiones de terminación de la transcripción 3' no traducidas tales como Nos y similares.

Además de numerosas tecnologías para la transformación de plantas, el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes extraños también puede variar. Dicho tejido incluiría, pero no estaría limitado a tejido embriogénico, tipos de tejido de callo I, II y III, hipocótilo, meristemo, tejido radicular, tejidos para la expresión en floema, y similares. Prácticamente todos los tejidos de plantas se pueden transformar durante la dediferenciación usando técnicas adecuadas descritas en la presente memoria.

Como se ha mencionado antes, se puede usar una variedad de marcadores seleccionables, si se desea. La preferencia de un marcador particular depende del experto, pero se puede usar cualquiera de los siguientes marcadores seleccionables junto con cualquier otro gen no citado en los mismos, que funcionaría como un marcador seleccionable. Dichos marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan al gen de la aminoglucósido fosfotransferasa del transposón Tn5 (Aph II) que codifica la resistencia a los antibióticos kanamicina, neomicina y G41; resistencia a higromicina; resistencia a metotrexato, así como a aquellos genes que codifican la resistencia o tolerancia al glifosato; fosfinotricina (bialafos o glufosinato); herbicidas que inhiben ALS (herbicidas de imidazolinonas, sulfonilureas y triazolopirimidina), inhibidores de ACC-asa (p. ej., ariloxipropionatos o ciclohexanodionas), y otros tales como bromoxinil, e inhibidores de HPPD (p. ej., mesotriona) y similares.

Además de un marcador seleccionable, puede ser conveniente usar un gen indicador. En algunos casos, se puede usar un gen indicador con o sin un marcador seleccionable. Los genes indicadores son genes que típicamente no están presentes en el organismo o tejido receptor y típicamente codifican proteínas que producen algún cambio fenotípico o propiedad enzimática.

Los genes indicadores preferidos incluyen el de la beta-glucuronidasa (GUS) del locus *uidA* de *E. coli*, el gen de la cloranfenicol acetil transferasa de Tn9 de *E. coli*, la proteína fluorescente verde de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*, y los genes de la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*. Se puede llevar a cabo después un ensayo para detectar la expresión de un gen indicador en un momento adecuado después de haber introducido dicho gen en las células receptoras. Un ensayo de estos preferidos implica el uso de un gen que codifica la beta-glucuronidasa (GUS) del locus *uidA* de *E. coli* para identificar células transformadas.

Además de los elementos reguladores de promotores de la planta, se pueden usar eficazmente elementos reguladores de promotores de una variedad de fuentes para expresar genes extraños. Por ejemplo, se pueden usar elementos reguladores de promotores de origen bacteriano, tales como el promotor de la octopina sintasa; promotor de la manopina; promotores de origen vírico, tales como promotor del virus del mosaico de la coliflor (35S y 19S), 35T (que es un promotor 35S remodelado, véase la patente de EE.UU. nº 6.166.302, en especial el ejemplo 7E) y similares. Los elementos reguladores de promotores de plantas incluyen, pero no se limitan a la subunidad pequeña de la ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP) carboxilasa (ssu), promotor de la beta-conglicina, promotor de la beta-faseolina, promotor de ADH, promotores de choque térmico, y promotores específicos de tejido. Pueden estar presentes otros elementos tales como regiones de unión a la matriz, regiones de unión al almacén, intrones, potenciadores, secuencias de poliadenilación y similares, y así pueden mejorar la eficacia de la transcripción o integración del ADN. Dichos elementos pueden ser necesarios o no para la función del ADN, aunque pueden proporcionar mejor expresión o funcionamiento del ADN afectando a la transcripción, estabilidad del ARNm y similares. Dichos elementos se pueden incluir en el ADN como se desee, para obtener el rendimiento óptimo del ADN transformado en la planta. Los elementos típicos incluyen, pero no se limitan a intrón de Adh-1, intrón de Adh-6, secuencia líder de la proteína de recubrimiento del virus del mosaico de la alfalfa, secuencias UTR de osmotina, secuencia líder de la proteína de recubrimiento del virus del rayado del maíz, así como otros disponibles para un experto en la técnica. También se pueden usar elementos reguladores de promotores constitutivos, dirigiendo así la expresión de gen constitutiva en todos los tipos de células y en todos los tiempos (p. ej., actina, ubiquitina, CaMV 35S, y similares). Los elementos reguladores de promotores específicos de tejidos son responsables de la expresión de genes en tipos de células o tejidos específicos, tales como las hojas o semillas (p. ej., zeína, oleosina, napina, ACP, globulina y similares), y también se pueden usar.

Los elementos reguladores de promotores también pueden estar activos (o inactivos) durante una fase determinada del desarrollo de la planta, así como activos en tejidos y órganos de la planta. Los ejemplos de estos incluyen, pero no se limitan a elementos reguladores de promotores específicos del polen, específicos embrionarios, específicos de la seda del maíz, específicos de la fibra de algodón, específicos de raíces, específicos del endosperma de la semilla o específicos de la fase vegetativa, y similares. En determinadas circunstancias puede ser conveniente usar un elemento regulador del promotor inducible, que es responsable de la expresión de genes en respuesta a una señal específica, tal como: estímulo físico (genes de choque térmico), luz (RUBP carboxilasa), hormona (Em), metabolitos, compuestos químicos (sensible a tetraciclina) y estrés. Se pueden usar otros elementos de la transcripción y traducción convenientes que funcionan en las plantas. Se conocen numerosos vectores de genes específicos de plantas en la técnica.

También se pueden usar sistemas basados en ARN vírico de planta para expresar la proteína bacteriana. Al hacer esto, el gen que codifica una proteína se puede insertar en la región promotora del recubrimiento de un virus de

planta adecuado que afectará a la planta hospedante de interés. Después se puede expresar la proteína proporcionando así protección a la planta para el daño por el herbicida. Los sistemas basados en ARN vírico de planta se describen en la patente de EE.UU. nº 5.500.360 de Mycogen Plant Sciences, Inc. y patentes de EE.UU. nº 5.316.931 y 5.589.367 de Biosource, ahora Large Scale Biology.

- 5 Medios para aumentar más los niveles de tolerancia o resistencia. Se muestra en la presente memoria que se puede dotar a las plantas de la presente invención de nuevos rasgos de resistencia a herbicidas sin efectos adversos observables en el fenotipo, incluyendo el rendimiento. Dichas plantas están dentro del alcance de la presente invención. Las plantas ejemplificadas y sugeridas en la presente memoria pueden aguantar 2X, 3X, 4X, y 5X los niveles de aplicación típicos, por ejemplo, de al menos un herbicida presente. Las mejoras en estos niveles de tolerancia están dentro del alcance de esta invención. Por ejemplo, se conocen diferentes técnicas en la materia, y previsiblemente se pueden optimizar y desarrollar más, para aumentar la expresión de un gen dado.

Uno de dichos métodos incluye aumentar el número de copias de los presentes genes *ADD-13* (en casetes de expresión y similares). También se pueden seleccionar sucesos de transformación para los que tienen múltiples copias de genes.

- 15 Se pueden usar promotores y potenciadores fuertes para la expresión de "supercarga". Los ejemplos de dichos promotores incluyen el promotor 35T preferido que usa potenciadores 35S. Los promotores de 35S, ubiquitina de maíz, ubiquitina de *Arabidopsis*, A.t. actina, y CSMV, están incluidos para dichos usos. También se prefieren otros promotores víricos fuertes. Los potenciadores incluyen potenciador 4 OCS y 35S doble. Las regiones de unión a la matriz (MARS) también se pueden usar para aumentar las eficacias de transformación y la expresión transgénica, por ejemplo.

También se pueden usar el barajado (evolución dirigida) y factores de transcripción para realizaciones de acuerdo con la presente invención.

- 25 También se pueden diseñar diferentes proteínas que difieren en el nivel de secuencia, pero retienen algo o similar estructura tridimensional esencial general, distribución de carga superficial, y similares. Véase, p. ej. patente de EE.UU. nº 7.058.515; Larson et al., *Protein Sci.* 2002 11: 2804-2813, "Thoroughly sampling sequence space: Large-scale protein design of structural ensembles."; Cramer et al., *Nature Biotechnology* 15, 436 - 438 (1997), "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling."; Stemmer, W.P.C.1994. "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751; Stemmer, W.P.C.1994. "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling". *Nature* 370: 389-391; Stemmer, W.P.C.1995. "Searching sequence space". *Bio/Technology* 13: 549-553; Cramer, A., Cwirla, S. y Stemmer, W.P.C.1996. "Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling". *Nature Medicine* 2: 100-103; y Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. y Stemmer, W.P.C. 1996. "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling". *Nature Biotechnology* 14: 315-319.

- 35 La actividad de los polinucleótidos recombinantes insertados en las células vegetales puede depender de la influencia del ADN endógeno de la planta adyacente al inserto. Por lo tanto, otra opción es aprovechar la ventaja de los sucesos que se sabe que son localizaciones excelentes en un genoma de planta para las inserciones. Véase, p. ej. el documento WO 2005/103266 A1, relativo a sucesos en el algodón en *cry1F* y *cry1Ac*; el presente gen *AAD-13* se puede sustituir en estos locus genómicos en lugar de los insertos de *cry1F* y/o *cry1Ac*. Por lo tanto, la recombinación homóloga dirigida, por ejemplo, se puede usar de acuerdo con la presente invención. Este tipo de tecnología es el objeto, por ejemplo, del documento WO 03/080809 A2 y la correspondiente solicitud de EE.UU. publicada (USPA 20030232410), relativa al uso de dedos de zinc para la recombinación dirigida. También se conoce en la técnica el uso de recombinasas (cre-lox y flp-frt por ejemplo).

- 45 La detoxificación por *ADD-13* se cree que se produce en el citoplasma. Por lo tanto, se incluyen medios para estabilizar más esta proteína y ARNm (que incluyen la degradación del ARNm de bloqueo) en los aspectos de la presente invención, y se pueden aplicar técnicas acordadas conocidas en la materia. Las presentes proteínas se pueden diseñar para resistir la degradación por proteasas y similares (se pueden eliminar eficazmente sitios de escisión de proteasas remodificando la secuencia de aminoácidos de la proteína). Dichas realizaciones incluyen el uso de estructuras de tallo-bucle como las UTR de la osmotina, y per5 (secuencias 5' no traducidas ricas en AU). También se pueden usar caperuzas en 5' como grupos 7-metilo o 2'-O-metilo, p. ej., resto de ácido metilguanílico). Véase, p. ej.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 74, No. 7, pág. 2734-2738 (Julio 1977) "Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis". También se pueden usar complejos de proteínas o grupos de bloqueo de ligando.

- 55 También se puede llevar a cabo el diseño computacional de las 5' o 3' UTR más adecuadas para *ADD-13* (horquillas sintéticas) dentro del alcance de la presente invención. La modelización por ordenador, en general, así como el barajado de genes y la evolución dirigida, se describen en otra parte en la presente memoria. Más específicamente, en relación con la modelización por ordenador y las UTR, las técnicas de modelización por ordenador para usar para predecir/evaluar derivados 5' y 3' UTR de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: MFold versión 3.1 disponible en Genetics Corporation Group, Madison, WI (véase, Zucker et al., "Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide". En *RNA Biochemistry and Biotechnology*, 11-43, J.

Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker et al., "Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure". *J. Mol. Biol.* 288, 911-940 (1999); Zucker et al., "RNA Secondary Structure Prediction". En *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* S. Beaucage, D.E. Bergstrom, G.D. Glick, y R.A. Jones eds., John Wiley & Sons, New York, 11.2.1-11.2.10, (2000)), COVE (RNA structure analysis using covariance models (stochastic context free grammar methods)) v.2.4.2 (Eddy & Durbin, *Nucl. Acids Res.* 1994, 22: 2079-2088) que se distribuye libremente como código fuente y que se puede descargar accediendo a la página de internet genetics.wustl.edu/eddy/software/, y FOLDALIGN, también distribuido libremente y disponible para descarga en la página de internet bioinf.au.dk/FOLDALIGN/ (véase "Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences". J. Gorodkin, L. J. Heyer y G. D. Stormo. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, no. 18 pág 3724-3732, 1997; "Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences". J. Gorodkin, L. J. Heyer, y G. D. Stormo. *ISMB* 5;120-123, 1997).

Se pueden usar realizaciones de la presente invención junto con mutantes que han evolucionado de forma natural o inducidos químicamente (los mutantes se pueden seleccionar por técnicas de cribado, después transformar con *ADD-13* y posiblemente otros genes). Las plantas de la presente invención se pueden combinar con resistencia a ALS y/o resistencia a glifosato desarrollada. También se puede combinar o "apilar" la resistencia a aminopiraldina con un gen *ADD-13*.

Las técnicas de reproducción tradicionales también se pueden combinar con la presente invención para la combinación, introgresión y mejora potentes de los rasgos deseados.

Las mejoras adicionales también incluyen el uso de protectores adecuados para proteger además a las plantas y/o añadir resistencia cruzada a más herbicidas. (Los protectores típicamente actúan para aumentar el sistema inmunitario de plantas por activación/expresión de cP450. Los protectores son agentes químicos que reducen la fitotoxicidad de herbicidas a las plantas de cultivo por un mecanismo fisiológico o molecular, sin comprometer la eficacia del control de las malas hierbas).

Los protectores herbicidas incluyen benoxacor, cloquintocet, ciometrinilo, diclormid, diciclonon, dietolato, fenclorazol, fenclorim, flurazol, fluxofenim, furilazol, isoxadifen, mefenpir, mefenato, anhídrido naftálico y oxabetrinilo. Los activadores de plantas (una nueva clase de compuestos que protegen a las plantas activando sus mecanismos de defensa) también se pueden usar en realizaciones de la presente invención. Estos incluyen acibenzolar y probenazol.

Los protectores comercializados se pueden usar para la protección de cultivos herbáceos de siembra grande, tales como maíz, sorgo de grano y arroz sembrado en húmedo, frente a herbicidas incorporados en pre-plantación o aplicados pre-brotación de las familias de tiocarbamato y cloroacetanilida. También se han desarrollado protectores para proteger cultivos de cereales de invierno tales como el trigo frente a aplicaciones pre-brotación o herbicidas de ariloxifenoxipropionato y sulfonilurea. El uso de protectores para la protección del maíz y el arroz frente a herbicidas de sulfonilurea, imidazolinona, ciclohexanodiona, isoxazol y tricetona también está bien establecido. Una potenciación inducida por el protector de la detoxificación de herbicida en las plantas protegidas, está ampliamente aceptado como el mecanismo principal implicado en la acción protectora. Los protectores inducen cofactores tales como enzimas de glutatión y detoxificadoras de herbicidas tales como glutatión S-transferasas, citocromo P450 monooxigenasas, y glucosil transferasas. Hatzios KK, Burgos N (2004) "Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners," *Weed Science*: Vol. 52, No. 3 pág. 454-467.

El uso de un gen de citocromo p450 monooxigenasa apilado con *ADD-13* es una realización preferida. Hay P450 implicados en el metabolismo herbicida; cP450 puede proceder de mamífero o de planta, por ejemplo. En las plantas superiores la citocromo p450 monooxigenasa (P450) se sabe que lleva a cabo un metabolismo secundario. También tiene una función importante en el metabolismo oxidativo de xenobióticos en cooperación con la NADPH-citocromo P450 oxidoreductasa (reductasa). La resistencia a algunos herbicidas se ha descrito como resultado del metabolismo de la P450 así como de la glutatión S-transferasa. Se ha caracterizado una serie de especies de P450 microsomaes implicadas en el metabolismo xenobiótico en mamíferos por clonación molecular. Se ha descrito que algunos de ellos metabolizan varios herbicidas de forma eficaz. Por lo tanto, las plantas transgénicas con P450 de planta o mamífero pueden mostrar resistencia a varios herbicidas.

Una realización preferida de lo anterior, es el uso de cP450 para la resistencia al acetoclor (los productos basados en acetoclor incluyen los herbicidas Surpass®, Keystone®, Keystone LA, FulTime® y TopNotch®) y/o trifluralina (tal como Treflan®). Dicha resistencia en las soja y/o maíz está incluida en algunas realizaciones preferidas. Para una guía adicional en relación con dichas realizaciones, véase, p. ej. Inui et al., "A selectable marker using cytochrome P450 monooxygenases for *Arabidopsis* transformation," *Plant Biotechnology* 22, 281-286 (2005) (en relación con un sistema de selección para la transformación de *Arabidopsis thaliana* por *Agrobacterium tumefaciens* que usa las citocromo P450 monooxigenasas que metabolizan herbicidas; plantones tolerantes a herbicidas se transformaron y seleccionaron con los herbicidas acetoclor, amiprofos-metilo, clorprofam, clorsulfuron, norflurazon y pendimetalina); Siminszky et al., "Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides," *PNAS* Vol. 96, Issue 4, 1750-1755, 16 de Febrero, 1999; Sheldon et al, *Weed Science*: Vol. 48, No. 3, pp. 291-295, "A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers

resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*"; y "Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19," *J Agric Food Chem.* 19 de abril de 2006; 54(8):2985-91 (en relación con el ensayo de una citocromo p450 monooxigenasa en arroz, donde las plantas de arroz mostraron repetidamente alta tolerancia a las cloroacetomidas (acetoclor, alaclor, metoaclor, pretilaclor, y tenilclor), oxiacetamidas (mefenacet), piridazinonas (norflurazón), 2,6-dinitroanilinas (trifluralina y pendimetalina), fosfamidados (amiprofos-metil, tiocarbamatos (piributicarb), y ureas (clortolurón)).

También hay la posibilidad de alterar o usar diferentes productos de 2,4-D para hacer al gen *ADD-13* más eficaz. Dichos posibles cambios incluyen crear mejores sustratos y mejores grupos lábiles (mayor electronegatividad).

Los inhibidores de transporte de auxinas (p. ej., diflufenzopyr) también se pueden usar para aumentar la actividad herbicida con el 2,4-D.

Salvo que se indique o esté implícita específicamente otra cosa, "un", "una" y "el", "la" significan "al menos uno" como se usa en la presente memoria.

A continuación se dan ejemplos que ilustran procedimientos para la práctica de la invención. Estos ejemplos no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención que se indica solo por las reivindicaciones adjuntas. Todos los porcentajes están en peso y todas las proporciones de mezclas de disolventes son en volumen salvo que se indique otra cosa.

Ejemplo 1 - Método para identificar genes que imparten resistencia a herbicida en la planta

Una forma de identificar genes que tienen actividades de degradación de herbicidas en la planta, es buscar en bases de datos públicas actuales tales como NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para empezar el procedimiento, es necesario tener una secuencia de gen funcional ya identificada que codifique una proteína con las características deseadas (es decir, actividad de α -cetoglutarato dioxigenasa). Esta secuencia de proteína después se usa como la entrada para el algoritmo de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) para comparar frente a las secuencias de proteínas del NCBI depositadas. Usando los parámetros por defecto, esta búsqueda devuelve más de 100 secuencias de proteínas homólogas a diferentes niveles. Estas varían desde identidad alta (85-98%) hasta identidad muy baja (23-35%) a nivel de aminoácidos. Tradicionalmente se esperaría que solo secuencias con alta homología retuvieran propiedades similares a la secuencia de introducida. En este caso, se elegirían solo secuencias con $\leq 50\%$ de homología. Como se ha ilustrado antes, se puede usar la clonación y expresión recombinante de homólogos con tan poco como 35% de conservación de aminoácidos (con respecto a *tfdA* de *Ralstonia eutropha*) para impartir niveles comerciales de resistencia no solo al herbicida previsto, sino también a sustratos no ensayados nunca previamente con estas enzimas.

Se identificó un solo gen (*sdpA*) de la base de datos de NCBI (véase la página de internet ncbi.nlm.nih.gov; nº de acceso AJ628860) como un homólogo con solo 35% de identidad de aminoácidos con *tfdA*. El porcentaje de identidad se determinó primero traduciendo las secuencias de ADN tanto de *sdpA* como *tfdA* depositadas en la base de datos de proteínas, y después usando ClustalW en el paquete de programas VectorNTI, para llevar a cabo múltiples alineamientos de secuencias.

Ejemplo 2 - Optimización de secuencia para la expresión en plantas y bacterias

2.1 - Antecedentes

Para obtener niveles más altos de expresión de genes heterólogos en plantas, se puede preferir remodelar la secuencia de los genes que codifican la proteína, de forma que sean expresados más eficazmente en células vegetales. El maíz es una de dichas plantas donde se puede preferir remodelar la región que codifica la proteína heteróloga antes de transformación para aumentar el nivel de expresión del gen y el nivel de la proteína codificada en la planta. Por lo tanto, una etapa adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana es remodelar un gen heterólogo para la expresión óptima.

Una razón para la remodelación de un gen bacteriano para la expresión en el maíz es por el contenido de G+C no óptimo en el gen natural. Por ejemplo, el contenido muy bajo de G+C de muchos genes bacterianos naturales (y el consiguiente sesgo hacia el contenido alto de A+T) da como resultado la generación de secuencias que implican o duplican las secuencias de control de genes de la planta que se sabe que son muy ricas en A+T. La presencia de algunas secuencias ricas en A+T dentro del ADN del gen o genes introducidos en las plantas (p. ej., regiones de caja TATA encontradas habitualmente en promotores de genes) puede dar como resultado la transcripción aberrante del gen o genes. Por otra parte, la presencia de otras secuencias reguladoras que residen en el ARNm transcrito (p. ej., secuencias de señal de poliadenilación tales como AAUAAA, o secuencias complementarias a ARN nucleares pequeños implicados en el corte y empalme pre-ARNm) puede conducir a la inestabilidad del ARN. Por lo tanto, un objetivo en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana para la expresión en el maíz, más preferiblemente denominado gen o genes optimizados para planta, es generar una secuencia de ARN que tiene un contenido de G+C preferiblemente cercano al de los genes del maíz que codifican enzimas metabólicas. Otro objetivo en el diseño del gen o genes optimizados para la planta que codifican una proteína bacteriana es generar una secuencia de ADN en la que las modificaciones de la secuencia no impiden la traducción.

La tabla Ej2-1 presenta el contenido de G+C de genes del maíz. Para los datos en la tabla Ej2-1, las regiones codificantes de los genes se extrajeron de las entradas en GenBank (versión 71), y las composiciones de bases se calcularon usando el programa MacVector™ (Accelrys, San Diego, California). Se ignoraron las secuencias de intrones en los cálculos.

Tabla Ej2-1: Recopilación de los contenidos de G + C de regiones que codifican proteínas de genes del maíz

Clase de proteína ^a	Intervalo de % de G + C	% medio de G + C ^b
Enzimas metabólicas (76)	44,4-75,3	59,0 (± 8,0)
Proteínas estructurales (18)	48,6-70,5	63,6 (± 6,7)
Proteínas reguladoras (5)	57,2-68,8	62,0 (± 4,9)
Proteínas no caracterizadas (9)	41,5-70,3	64,3 (± 7,2)
Todas las proteínas (108)	44,4-75,3	60,8 (± 5,2) ^c

^a Número de genes en la clase dado entre paréntesis.

^b Desviaciones estándar dadas entre paréntesis.

^c Media de grupos combinados ignorados en el cálculo medio

- 5 Existen múltiples bases de datos de secuencias de ADN disponibles al público en donde se puede encontrar información sobre los contenidos de G+C de los genomas de las plantas o las regiones que codifican proteínas de los diferentes genes de plantas. Una de dichas bases de datos está en internet en la URL <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. En este sitio, se puede encontrar que el contenido medio de G+C de, por ejemplo, secuencias que codifican proteínas del tabaco (*Nicotiana tabacum*) es 43,3% (análisis de 1268 secuencias que comprenden 453.797 codones). Se puede encontrar que el contenido medio de G+C de secuencias que codifican proteínas el maíz (*Zea mays*) es 54,9% (análisis de 2280 que comprenden 973.578 codones). En comparación, el contenido de G+C de la secuencia que codifica la proteína AAD-13 de *Sphingobium herbicidovorans* descrita en la SEQ ID NO: 2 es 67,2%. Por lo tanto, puede ser ventajoso cuando se diseña un gen AAD-13 para la expresión en el maíz o dicotiledóneas disminuir el contenido de G+C de la región que codifica la proteína a un intervalo de 40-55%.
- 10 Por lo tanto, un objetivo en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana para la expresión en plantas, más preferiblemente denominados gen o genes optimizados para la planta, es generar una secuencia de ADN que tenga un contenido de G+C preferiblemente cercano al de los genes de la planta hospedante natural que codifican enzimas metabólicas.

- 20 Debido a la plasticidad proporcionada por la redundancia/degeneración del código genético (es decir, algunos aminoácidos son especificados por más de un codón), la evolución de los genomas en diferentes organismos o clases de organismos ha dado como resultado en uso diferencial de codones redundantes. Este “sesgo de codones” se refleja en la composición de bases media de regiones que codifican proteínas. Por ejemplo, organismos con contenidos relativamente bajos de G+C usan codones que tienen A o T en la tercera posición de los codones redundantes, mientras que los que tienen contenidos de G+C mayores usan codones que tienen G o C en la
- 25 tercera posición. Se cree que la presencia de codones “minoritarios” dentro de un ARNm puede reducir la relación de traducción absoluta de ese ARNm, en especial cuando la abundancia relativa del ARNt cargado correspondiente al codón minoritario es baja. Una extensión de esto es que la disminución de la tasa de traducción por codones minoritarios individuales sería al menos una suma para los codones minoritarios múltiples. Por lo tanto, los ARNm que tienen contenidos relativos altos de codones minoritarios tendrían tasas de traducción correspondientemente
- 30 bajas. Esta tasa se reflejaría por los posteriores niveles bajos de la proteína codificada.

- En genes modificados que codifican una proteína bacteriana para la expresión en el maíz (u otras plantas, tales como el algodón o la soja), es útil si se ha determinado el sesgo de codones de la posible planta o plantas hospedantes. El sesgo de codones se puede calcular como la frecuencia con la que se usa un solo codón con respecto a los codones para todos los aminoácidos. Alternativamente, como se describe en la tabla Ej2-2, columnas C, D, I y J, el sesgo de codones se puede calcular como la frecuencia con la que se usa un codón individual para codificar un aminoácido particular, con respecto a todos los demás codones para ese aminoácido (codones sinónimos). El sesgo de codones para el maíz es la distribución estadística de codones que usa la planta para codificar sus proteínas, y el uso de codones calculado a partir de 706 genes del maíz se muestra en la tabla Ej2-2, columnas C e I. Cuando se diseñan regiones codificantes para genes que codifican proteínas bacterianas dirigidos a la expresión en plantas, deben determinarse los primeros codones (“primera elección”) preferidos por la planta, así como la segunda, tercera, cuarta, etc. elecciones de codones preferidos cuando existen múltiples elecciones. Después se puede diseñar una secuencia de ADN nueva que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína bacteriana, pero la nueva secuencia de ADN difiere de la secuencia de ADN bacteriana natural (que codifica la proteína) por la sustitución de codones de la planta (primeros preferidos, segundos preferidos, terceros preferidos o
- 40 cuartos preferidos, etc.) para especificar el aminoácido en cada posición dentro de la secuencia de aminoácidos de
- 45

la proteína. Después se analiza en la nueva secuencia los sitios de enzimas de restricción que se pueden haber creado por la modificación. Los sitios identificados se modifican además sustituyendo los codones por los codones preferidos de primera, segunda, tercera o cuarta elección. Otros sitios en la secuencia que podrían afectar a la transcripción o traducción del gen de interés son las uniones exón:intrón (5' o 3'), señales de adición poli A, o señales de terminación de ARN polimerasa. La secuencia se analiza y modifica además para reducir la frecuencia de dobles TA o CG. Además de los dobles, los bloques de secuencias de G o C que tienen más de aproximadamente seis restos que son iguales, pueden afectar a la transcripción o traducción de la secuencia. Por lo tanto, estos bloques se ventajosamente se modifican para sustituir los codones de la primera o segunda elección, etc., por el siguiente codón de elección preferido.

Por lo tanto, con el fin de diseñar genes optimizados para plantas que codifican una proteína bacteriana, se diseña una secuencia de ADN para codificar la secuencia de aminoácidos de dicha proteína usando un código genético redundante establecido a partir de una tabla de sesgo de codones compilada a partir de las secuencias de genes para la planta o plantas particulares. La secuencia de ADN resultante tiene un grado mayor de diversidad de codones, una composición de base deseable, puede contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción colocados estratégicamente, y carece de secuencias que pueden interferir con la transcripción del gen o traducción del ARNm producto. Dichos genes sintéticos que son funcionalmente equivalentes a los genes/proteínas de la presente invención se pueden usar para transformar hospedantes, que incluyen plantas. Se puede encontrar una guía adicional en relación con la producción de genes sintéticos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5.380.831 y solicitud PCT WO 97/13402.

Para modificar un gen optimizado para planta que codifica una proteína ADD-13, se diseñó una secuencia de ADN para codificar la secuencia de aminoácidos de *ADD-13*, usando el código genético redundante establecido a partir de tablas de sesgo de codones compiladas a partir de secuencias codificantes de proteínas para las plantas hospedantes particulares (maíz y dicotiledóneas). En la tabla Ej2-2, columnas C, D, I y J, se presentan las distribuciones (en % de uso para todos los codones para esos aminoácidos) de codones sinónimos para cada aminoácido, encontrados en 706 regiones codificantes de *Zea mays* (maíz) y 154 genes de dicotiledóneas [REF: Murray, E. E., Lotzer, J., Eberle, M. (1989) "Codon usage in plant genes". *Nucl. Acids Res.* 17:477-497]. Los codones más preferidos para cada tipo de planta se indican en negrilla, y se pueden identificar la segunda, tercera y cuarta elecciones de codones cuando existen múltiples elecciones. Es evidente que algunos codones sinónimos para algunos aminoácidos se encuentran solo raramente en genes de plantas (p. ej. AGT en maíz y CCG en dicotiledóneas). Además, el maíz y las plantas dicotiledóneas difieren en el uso de codones individuales (p. ej. el codón de alanina GCG se encuentra con más frecuencia en genes del maíz que en genes de dicotiledóneas, mientras que el codón de arginina AGA es usado con más frecuencia en genes de dicotiledóneas que en genes del maíz). Por lo tanto, es obvio que una región que codifica una proteína diseñada para reflejar la composición de codones óptima de genes de una especie de planta puede tener una composición de codones subóptima para la expresión en otra especie de planta. En el procedimiento de diseño para crear una secuencia de ADN que codifica proteína que se aproxima a una distribución de codones media de genes tanto del maíz como de dicotiledóneas, se excluyó cualquier codón que se usa con poca frecuencia con respecto a los otros codones sinónimos para ese aminoácido en otro tipo de planta (indicado por DNU en las columnas F y L de la tabla Ej2-2). Normalmente, se considera que un codón se usa raramente cuando está representado aproximadamente 10% o menos veces para codificar el aminoácido relevante en genes de cualquier tipo de planta (indicado por NA en las columnas E y K de la tabla Ej2-2). Para equilibrar la distribución de las elecciones de codones que quedan para un aminoácido, se calculó una representación media ponderada para cada codón, usando la fórmula:

% medio ponderado de C1 = $1/(\%C1 + \%C2 + \%C3 + \text{etc.}) \times \%C1 \times 100$ donde C1 es el codón en cuestión y %C2, %C3, etc. representan los valores medios en % para el maíz y dicotiledóneas de los demás codones sinónimos (los valores medios de % para los codones relevantes se toman de las columnas E y K) de la tabla Ej2-2.

El valor del % medio ponderado para cada codón se da en las columnas F y L de la tabla Ej2-2.

Tabla Ej2-2. Representación de codones sinónimos en regiones codificantes de 706 genes de *Zea mays* (maíz) genes (Columnas C y I), y 154 genes de dicotiledóneas (Columnas D y J). Los valores para una representación de codones equilibrada-sesgada establecidos para un diseño de gen sintético optimizado para planta, están en las columnas F y L.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Amino-ácido	Codón	Maíz %	Dicot. %	Media Maíz-Dicot.	Media ponderada	Amino-ácido	Codón	Maíz %	Dicot. %	Media Maíz-Dicot.	Media ponderada
ALA (A)	GCA	18	25	21,7	25,5	LEU (L)	CTA	8	8	NA	DNU
	GCC	34	27	30,3	35,6		CTC	26	19	22,5	34,3
	GCG	24	6	NA	DNU		CTG	29	9	NA	DNU

	GCT	24	42	33,2	39,0		CTT	17	28	22,5	34,3
ARG (R)	AGA	15	30	22,4	27,4		TTA	5	10	NA	DNU
	AGG	26	25	25,7	31,5		TTG	15	26	20,6	31,4
	CGA	9	8	NA	DNU	LYS (K)	AAA	22	39	30,6	30,6
	CGC	24	11	17,7	21,7		AAG	78	61	69,4	69,4
	CGG	15	4	NA	DNU	MET (M)	ATG	100	100	100	100
	CGT	11	21	15,8	19,4	PHE (F)	TTC	71	55	63,2	63,2
ASN (N)	AAC	68	55	61,4	61,4		TTT	29	45	36,8	36,8
	AAT	32	45	38,6	38,6	PRO (P)	CCA	26	42	33,8	41,4
ASP (D)	GAC	63	42	52,6	52,6		CCC	24	17	20,7	25,3
	GAT	37	58	47,4	47,4		CCG	28	9	NA	DNU
CYS (C)	TGC	68	56	61,8	61,8		CCT	22	32	27,2	33,3
	TGT	32	44	38,2	38,2	SER (S)	AGC	23	18	20,4	26,0
END	TAA	20	48	33,8			AGT	9	14	NA	DNU
	TAG	21	19	20,1			TCA	16	19	17,5	22,4
	TGA	59	33	46,1			TCC	23	18	20,6	26,3
							TCG	14	6	NA	DNU
GLN (Q)	CAA	38	59	48,4	48,4		TCT	15	25	19,9	25,4
	CAG	62	41	51,6	51,6						
GLU (E)	GAA	29	49	38,8	38,8	THR (T)	ACA	21	27	23,8	28,0
	GAG	71	51	61,2	61,2		ACC	37	30	33,6	39,5
GLY (G)	GGA	19	38	28,5	28,5		ACG	22	8	NA	DNU
	GGC	42	16	29,1	29,0		ACT	20	35	27,7	32,5
	GGG	20	12	16,1	16,0	TRP (W)	TGG	100	100	100	100
	GGT	20	33	26,7	26,6	TYR (Y)	TAC	73	57	65,0	65,0
HIS (H)	CAC	62	46	54,1	54,1		TAT	27	43	35,0	35,0
	CAT	38	54	45,9	45,9	VAL (V)	GTA	8	12	NA	DNU
ILE (I)	ATA	14	18	15,9	15,9		GTC	32	20	25,8	28,7
	ATC	58	37	47,6	47,9		GTG	39	29	34,1	38,0
	ATT	28	45	36,4	36,4		GTT	21	39	29,9	33,3

Se diseñó una nueva secuencia de ADN que codifica esencialmente la secuencia de aminoácidos de la proteína AAD-13 de *Sphingobium herbicidovorans* de SEQ ID NO: 2 para la expresión óptima tanto en células de maíz como de dicotiledóneas usando una distribución de codones equilibrada de codones usados con frecuencia, encontrada en los genes del maíz y dicotiledóneas.

2.2 - Análisis de reconstrucción de AAD-13 para planta

El análisis extenso de los 861 pares de bases (pb) de la región que codifica la secuencia de ADN natural de AAD-13 (SEQ ID NO: 1) puso de manifiesto la presencia de varios motivos de secuencias que se cree que son perjudiciales para la expresión óptima en la planta, así como la composición de codones no óptima. La proteína codificada por la SEQ ID NO: 1 (AAD-13) se presenta como la SEQ ID NO: 2. Para mejorar la producción de la proteína recombinante en el maíz, así como en dicotiledóneas, se desarrolló una secuencia de ADN "optimizada para la planta" (AAD-13 v1) (SEQ ID NO: 3) que codifica una proteína (SEQ ID NO: 4) que es la misma que la proteína natural descrita en la SEQ ID NO: 2 excepto por la adición de un resto de alanina en la segunda posición (subrayado en la SEQ ID NO: 4). El codón de alanina adicional (GCT; subrayado en la SEQ ID NO: 3) codifica parte de un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Nco I (CCATGG) que abarca el codón de inicio de la traducción ATG. Por lo tanto, sirve para el doble propósito de facilitar las posteriores operaciones de clonación a la vez que se mejora el contexto de la secuencia del codón de inicio ATG para optimizar el inicio de la traducción. Las proteínas codificadas por las regiones codificantes naturales y optimizadas para la planta (v1) son 99,3% idénticas, y difieren solo en el aminoácido número 2. En cambio, las secuencias de ADN naturales y optimizadas para la planta (v1) de las regiones codificantes son solo 77,3% idénticas. La tabla Ej2-3 muestra las diferencias en las composiciones de codones de las secuencias natural (columnas A y D) y optimizada para la planta (columnas B y E), y permite la comparación con una secuencia optimizada para la planta teórica (columnas C y F) que tendría precisamente la composición de codones dictada por las columnas F y L de la tabla Ej2-2.

Tabla Ej2-3. Comparaciones de composiciones de codones de regiones codificantes de AAD-13 natural, versión optimizada para la planta (v1) y versión optimizada para la planta teórica.

		A	B	C			D	E	F
Amino-ácido	Codón	Natural	Opt. planta v1 n°	Opt. planta teórico n°	Amino-ácido	Codón	Natural	Opt. planta v1 n°	Opt. planta teórico n°
ALA (A)	GCA	1	10	9	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	24	11	13		CTC	11	11	10
	GCG	10	0	0		CTG	17	0	0
	GCT	1	16	14		CTT	0	10	10
ARG (R)	AGA	0	4	4	LYS (K)	TTA	0	0	0
	AGG	0	5	5		TTG	2	9	9
	CGA	1	0	0		AAA	0	3	3
	CGC	10	4	3		AAG	10	7	7
ASN (N)	CGG	4	0	0	MET (M)	ATG	9	9	9
	CGT	1	3	3		TTC	8	6	6
	AAC	3	2	2		TTT	1	3	3
	AAT	1	2	2		CCA	2	7	7
ASP (D)	GAC	19	13	13	PRO (P)	CCC	5	5	5
	GAT	5	11	11		CCG	10	0	0
	TGC	2	1	1		CCT	1	6	6
	TGT	0	1	1		AGC	9	4	4
END	TAA	0	0		SER (S)	AGT	1	0	0
	TAG	0	0			TCA	1	3	3
	TGA	1	1	1		TCC	1	4	4
	CAA	0	7	7		TCG	3	0	0
GLN (Q)	CAG	14	7	7		TCT	0	4	4

GLU (E)	GAA	3	5	5	THR (T)	ACA	0	3	3
	GAG	11	9	9		ACC	7	4	4
GLY (G)	GGA	1	6	6	TRP (W)	ACG	4	0	0
	GGC	16	6	6		ACT	0	4	4
	GGG	3	3	3		TGG	7	7	7
	GGT	1	6	6		TAC	5	4	5
HIS (H)	CAC	7	7	8	TYR (Y)	TAT	2	3	2
	CAT	7	7	6		GTA	0	0	0
ILE (I)	ATA	0	2	2	VAL (V)	GTC	6	4	4
	ATC	10	5	5		GTG	7	6	6
	ATT	1	4	4		GTT	2	5	5
	Totales	157	158	158		Totales	131	131	131

Está claro a partir del examen de la tabla Ej2-3 que las regiones codificantes naturales y optimizadas para la planta, aunque codifican proteínas casi idénticas, son sustancialmente diferentes unas de otras. La versión optimizada para la planta (v1) imita estrechamente la composición de codones de una región codificante optimizada para la planta teórica que codifica la proteína de *ADD-13*.

2.3 Reconstrucción para la expresión en *E. coli*

Las cepas modificadas especialmente de *Escherichia coli* y sistemas de vectores asociados, se usan a menudo para producir cantidades relativamente grandes de proteínas para estudios bioquímicos y analíticos. A veces se encuentra que un gen natural que codifica la proteína deseada no es adecuado para la expresión con alto nivel en *E. coli*, incluso aunque el organismo fuente para el gen puede ser otro organismo bacteriano. En dichos casos se puede y es conveniente remodelar la región codificante de la proteína del gen para hacerlo más adecuado para la expresión en *E. coli*. Los genes de clase II de *E. coli* se definen como aquellos que son expresados en gran cantidad y de forma continua durante la fase de crecimiento exponencial de células de *E. coli*. [REF: Henaut, A. y Danchin, A. (1996) en "Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology", vol. 2, pág. 2047-2066. Neidhardt, F., Curtiss III, R., Ingraham, J., Lin, E., Low, B., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M., Schaechter, M. y Umberger, H. (eds.) *American Society for Microbiology*, Washington, DC]. Mediante el examen de las composiciones de codones de las regiones codificantes de los genes de clase II de *E. coli*, se puede idear una composición de codones media para esas regiones codificantes de genes de clase II de *E. coli*. Se cree que una región codificante de proteína que tiene una composición de codones media que imita la de los genes de clase II será favorecida para la expresión durante la fase de crecimiento exponencial de *E. coli*. Usando esta guía, se diseñó una nueva secuencia de ADN que codifica la proteína de *AAD-13* (SEQ ID NO: 4; que incluye la alanina adicional de la segunda posición, mencionada antes), de acuerdo con la composición media de codones de las regiones codificantes de genes de clase II de *E. coli*. La secuencia inicial, cuyo diseño se basó solo en la composición de codones, se modificó además para incluir algunas secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción para la clonación en vectores de expresión de *E. coli*. Se evitaron características de secuencia perjudiciales tales como estructuras de tallo-bucle muy estables, como eran las secuencias intragénicas homólogas al extremo 3' del ARN ribosómico 16S (es decir, secuencias de Shine Dalgarno). La secuencia optimizada para *E. coli* (v2) se describe como la SEQ ID NO: 5 y codifica la proteína descrita en la SEQ ID NO: 4.

Las secuencias de ADN natural y optimizada para *E. coli* (v2) son 80,2% idénticas, mientras que las secuencias de ADN optimizadas para planta (v1) y optimizadas para *E. coli* (v2) son 84,4% idénticas. La tabla Ej2-4 presenta las composiciones de codones de la región codificante de *AAD-13* natural (columnas A y D), la región codificante de *AAD-13* optimizada para la expresión en *E. coli* (v2; columnas B y E) y la composición de codones de una región codificante teórica para la proteína *AAD-13* que tiene una composición de codones óptima de genes de clase II de *E. coli* (columnas C y F).

Tabla Ej2-4. Comparaciones de composición de codones de regiones codificantes de AAD-13 natural, versión optimizada para *E. coli* (v2) y versión optimizada para clase II de *E. coli* teórica.

		A	B	C			D	E	F
Amino-ácido	Codón	Natural	Opt. <i>E. coli</i> v2 n°	Clase II teórico n°	Amino-ácido	Codón	Natural	Opt. <i>E. coli</i> v2 n°	Clase II teórico n°
ALA (A)	GCA	1	11	11	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	24	0	0		CTC	11	0	0
	GCG	10	14	14		CTG	17	30	30
	GCT	1	12	12		CTT	0	0	0
ARG (R)	AGA	0	0	0		TTA	0	0	0
	AGG	0	0	0		TTG	2	0	0
	CGA	1	0	0	LYS (K)	AAA	0	8	8
	CGC	10	7	5		AAG	10	2	2
	CGG	4	0	0	MET (M)	ATG	9	9	9
	CGT	1	9	11	PHE (F)	TTC	8	6	6
ASN (N)	AAC	3	4	4		TTT	1	3	3
	AAT	1	0	0	PRO (P)	CCA	2	3	3
ASP (D)	GAC	19	13	13		CCC	5	0	0
	GAT	5	11	11		CCG	10	15	15
CYS (C)	TGC	2	1	1		CCT	1	0	0
	TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	9	4	4
END	TAA	0	1	1		AGT	1	0	0
	TAG	0	0	0		TCA	1	0	0
	TGA	1	0	0		TCC	1	5	5
GLN (Q)	CAA	0	3	3		TCG	3	0	0
	CAG	14	11	11		TCT	0	6	6
GLU (E)	GAA	3	10	11	THR (T)	ACA	0	0	0
	GAG	11	4	3		ACC	7	7	7
GLY (G)	GGA	1	0	0		ACG	4	0	0
	GGC	16	10	10		ACT	0	4	4
	GGG	3	0	0	TRP (W)	TGG	7	7	7
	GGT	1	11	11		TAC	5	5	5
HIS (H)	CAC	7	10	10	TYR (Y)	TAT	2	2	2
	CAT	7	4	4		GTA	0	3	3
ILE (I)	ATA	0	0	0		GTC	6	0	0
	ATC	10	7	7		GTG	7	5	5

	ATT	1	4	4		GTT	2	7	7
	Totales	157	158	158		Totales	131	131	131

Está claro a partir del examen de la tabla Ej2-4, que las regiones codificantes optimizadas para *E. coli*, aunque codifican proteínas casi idénticas, son sustancialmente diferentes unas de otras. La versión optimizada para *E. coli* (v2) imita estrechamente la composición de codones de una región codificante optimizada para *E. coli* teórica que codifica la proteína AAD-13.

Ejemplo 3 - Clonación de vectores de expresión y transformación

3.1 Construcción de vector de expresión pET, de *E. coli*

Usando las correspondientes enzimas de restricción para los sitios añadidos con los conectores de clonación (Xba 1, Xho 1), se cortó AAD-13 (v2) del vector de Picoscript, y se ligó a un vector de resistencia a estreptomicina/espectinomicina PET280. Los productos ligados después se transformaron en *E. coli* TOP10F', y se cultivaron en placas de agar con caldo Luria + estreptomicina y espectinomicina 50 µg/ml (LB S/S).

Para diferenciar entre los ligados de AAD-13 (v2):pET280 y pCR2.1:pET280, se añadieron aproximadamente 20 colonias aisladas en 6 ml de LB-S/S, y se cultivaron a 37°C durante 4 horas con agitación. Después cada cultivo se aplicó en manchas en placas de LB + Kanamicina 50 µg/ml, que se incubaron a 37°C durante la noche. Se dio por supuesto que las colonias que crecieron en el LB-K tenían ligado el vector pCR2.1 y se descartaron. Se aislaron los plásmidos de los cultivos restantes como antes, y se comprobó la corrección con digestión con Fsp1. La construcción de expresión final se denominó pDAB4115.

3.3 - Terminaciones de vectores binarios

El gen optimizado para planta AAD-13 (v1) se recibió de Picoscript (el diseño de la reconstrucción del gen se había completado (véase antes) y se externalizó a Picoscript para la construcción. El gen AAD-13 (v1) se clonó en pDAB4055 como un fragmento Nco I - Sac I. La construcción resultante se denominó pDAB4113, y contenía: [promotor AtUbi10: AAD-13 (v1): AtuORF1 3'UTR] (verificado con digestiones con enzimas de restricción Nco I y Sac I). Después se clonó un fragmento Not I-Not I que contenía el casete descrito en el sitio de Not I del vector binario pDAB3038. El vector binario resultante, pDAB4114, que contenía el siguiente casete [promotor AtUbi10: AAD-13 (v1): AtuORF1 3'UTR: promotor CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR] se digirió con enzimas de restricción (con SacI) para verificar la orientación correcta. La construcción completada verificada (pDAB4114) se usó para la transformación en *Agrobacterium* (véase el ejemplo 6).

Ejemplo 4 - Expresión y purificación de AAD-13 recombinante en *Pseudomonas fluorescens*

4.1 - Fermentación de *Pseudomonas fluorescens*

Para el experimento en matraz de agitación, se usarán 200 µl de la solución madre en glicerol de la cepa *Pseudomonas fluorescens* que llevaba la construcción AAD-13 (v1) (sec 3.2), para inocular 50 ml de medio LB de nueva aportación complementado con tetraciclina/HCl 30 µg/ml. El cultivo (en un matraz Erlenmeyer con deflectores de 250 ml) se incubará en un agitador (New Brunswick Scientific Modelo Innova 44) a 300 rpm y 30°C durante 16 h. Se transferirán 20 ml de cultivo de siembra a 1 litro de medio de cultivo de *Pseudomonas fluorescens* (extracto de levadura, 5 g/l; K₂HPO₄, 5 g/l; (NH₄)₂PO₄, 7,5 g/l; (NH₄)₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, 1 g/l; KCl, 0,5 g/l; CaCl₂·2H₂O, 0,5 g/l; citratoNa·2H₂O, 15 g/l; glicerol, 95 g/l; solución de oligoelementos, 10 ml/l; solución de oligoelementos: FeCl₃·6H₂O, 5,4 g/l; MnCl₂·4H₂O, 1 g/l; ZnSO₄·7H₂O, 1,45 g/l; CuSO₄·5H₂O, 0,25 g/l; H₃BO₃, 0,1 g/l; (NH₄)₆MO₇O₂₄, 0,1 g/l; HCl concentrado, 13 ml/l) complementado con tetraciclina/HCl 20 µg/ml y 250 µl de Pluronic L61 (antiespumante) en un matraz Erlenmeyer con deflectores de 2,8 litros. Los cultivos se van a incubar a 30°C y 300 rpm durante 24 h. Se añadirá β-D-1-tiogalacto-piranósido de isopropilo (IPTG) hasta 1 mM final en los cultivos y se continuará incubando durante aproximadamente 48 h a 25°C. Las células se recogen por centrifugación a 7 krpm a 4°C durante 15 min, y la pasta celular se almacena a -80°C o se procesa inmediatamente para la purificación.

Para los experimentos en tanque, se inoculará 1 ml de cada solución madre en glicerol en un matraz con deflectores de 1 litro que contiene 200 ml de medio LB complementado con tetraciclina/HCl 30 µg/ml a 300 rpm y 32°C durante 16-24 h. Después, los cultivos combinados de tres matraces (600 ml) se transfirieron asépticamente a un fermentador de 20 litros (B. Braun Bioreactor Systems) que contenía 10 litros de medio definido patentado por Dow (por Teknova, Hollister, CA) diseñado para soportar crecimiento de alta densidad celular. La temperatura del crecimiento se mantiene a 32°C hasta que el pH se controla al punto fijado deseado por la adición de amoniaco acuoso. El oxígeno disuelto se mantendrá a un nivel positivo en el cultivo líquido, regulando el flujo de aire burbujeado y las velocidades de agitación. El procedimiento de fermentación discontinuo alimentado se lleva a cabo durante aproximadamente 24 h hasta que la densidad celular alcanza DO₅₇₅ 170-200. Después se añade IPTG hasta 1 mM para inducir la expresión de proteína recombinante y la temperatura se reduce y se mantiene a 25°C usando circulación de suministro de agua fría. La fase de inducción de la fermentación se dejará continuar durante otras 24

h. Se recogen muestras (30 ml) para diferentes análisis para determinar la densidad celular y el nivel de expresión de proteínas en los puntos de medición de 6, 12 y 18 h después de inducción. Al final de un experimento de fermentación, se recogen las células por centrifugación a 10 krpm durante 30 min. Los sedimentos celulares después se congelan a -80°C para el procesamiento posterior.

5 4.2 - Purificación de AAD-13 para la caracterización bioquímica y producción de anticuerpos.

Aproximadamente 100-200 g de células de *Pseudomonas* congeladas (o frescas) se descongelan y se vuelven a suspender en 1-2 litros de tampón de extracción que contiene Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, y 25 ml de cóctel inhibidor de proteasa (Sigma nº de cat. P8465). Las células se rompen con un microfluidizador (modelo M110L o 110Y) (Microfluidics, Newton, MA) sobre hielo con un paso a 773,4-843,7 kg/cm² (11.000-12.000 psi). El lisato se centrifuga a 24.000 rpm durante 20 min. El líquido sobrenadante se transferirá y dializará frente a 10 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, a pH 8,5 durante la noche a 4°C, o se diafiltrará con este tampón y se filtrará a través de una membrana de 0,45 µm antes de aplicar a las separaciones por columna. Todas las posteriores separaciones de proteínas se llevarán a cabo usando Pharmacia AKTA Explorer 100 y realizadas a 4°C. Antes de la carga, se equilibra una columna de flujo rápido Q Sepharose (Pharmacia XK 50/00, tamaño del lecho de 500 ml) con tampón de Tris-HCl 20 mM, pH 8,5. La muestra se aplica a la columna a 15 ml/min y después se lava con este tampón hasta que la DO₂₈₀ del eluato vuelve a su valor base. Las proteínas se eluyen con 2 litros de gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,3 M con un caudal de 15 ml/min, mientras se recogen fracciones de 45 ml. Se van a juntar las fracciones que contienen actividad de AAD-13, determinado por ensayo enzimático colorimétrico, y también que corresponden al peso molecular previsto de la proteína AAD-13 (banda de aproximadamente 32 kDa en SDS-PAGE). Se añade sulfato amónico sólido hasta 0,5 M final a la muestra y después se aplica a una columna Phenyl HP (Pharmacia XK 50/20, tamaño de lecho 250 ml) equilibrada en sulfato amónico 0,5 M en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Esta columna se lava con el tampón de unión a 10 ml/min hasta que la DO₂₈₀ del eluato vuelve a su valor base, las proteínas se eluyen en 2 volúmenes de columna a 10 ml/min mediante un gradiente lineal de sulfato amónico de 0,5 M a 0 en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, y se recogen fracciones de 12,5 ml. Las fracciones de los picos principales que contienen AAD-13 se juntarán, y si es necesario, se concentrarán usando un dispositivo de filtro centrífugo de membrana de corte de exclusión de peso molecular 10 kDa (Millipore). En algunos casos, la muestra se aplica además a una columna de filtración en gel Superdex 75 (Pharmacia XK 16/60, tamaño del lecho 110 ml) con tampón PBS con un caudal de 1 ml/min. Las fracciones de los picos que contienen AAD-13 pura se juntan y almacenan a -80°C para el uso futuro.

Ejemplo 5 - Ensayos in vitro de la actividad de AAD-13

30 5.1 - Ensayo por detección colorimétrica de fenol

La actividad enzimática se medirá por detección colorimétrica del producto fenólico usando un protocolo modificado del de Fukumori y Hausinger (1993) (*J Biol. Chem.* 268: 24311-24317) para permitir el desarrollo en un formato de microplaca de 96 pocillos. El ensayo colorimétrico se ha descrito para usar en la medición de la actividad de dioxigenasas en la escisión de 2,4-D y dicloroprop para usar el producto 2,4-diclorofenol. La intensidad del color de varios fenoles se comparó con la del 2,4-diclorofenol usando el método de detección descrito previamente para evaluar que productos fenólicos se podrían detectar fácilmente. Los fenoles y análogos de fenol se ensayaron con una concentración final 100 µM en 0,15 ml de MOPS 20 mM pH 6,75 que contiene NH₄(FeSO₄)₂ 200 µM, ascorbato sódico 200 µM. Los piridínoles derivados de fluroxipir y triclopir no produjeron color significativo. La intensidad del color del 2,4-diclorofenol era lineal y proporcionar a la concentración de fenol en el ensayo hasta ~500 µM. Una curva de calibración realizada en condiciones de ensayo convencionales (volumen final de ensayo 160 µl) indicaban que se había obtenido una absorbancia a 510 nm de 0,1 a partir de fenol 17,2 µM.

Los ensayos enzimáticos se llevan a cabo en un volumen total de 0,16 ml de MOPS 20 mM a pH 6,75 que contiene NH₄FeSO₄ 200 µM, ascorbato sódico 200 µM, α-cetoglutarato 1 mM, el sustrato adecuado (añadido de una disolución madre 100 mM hecha en DMSO), y enzima. Los ensayos se inician por adición del sustrato de ariloxialcanoato, enzima o α-cetoglutarato en el tiempo cero. Después de 5 minutos de incubación a 25°C, la reacción se termina por adición de 30 µl de una mezcla 1:1:1 de Na EDTA 50 mM; tampón a pH 10 (ácido bórico 3,09 g + KCl 3,73 g + 44 ml de KOH 1 N) y 4-aminoantipirina al 0,2%. Después se añaden 10 µl de ferricianuro potásico al 0,8% y después de 5 o 10 min, se registra la absorbancia a 510 nm en un lector de microplaca espectrofotométrico. Los blancos contenían todos los reactivos excepto la enzima, para explicar la ligera contaminación ocasional de algunos de los sustratos por pequeñas cantidades de fenoles.

50 5.2 - Ensayo por detección de cloropiridinol

La acción de la AAD-13 sobre potenciales sustratos tales como el herbicida triclopir que contiene una piridina sustituida (en lugar de anillos de benceno) liberará un piridinol en la escisión del enlace de ariloxialcanoato. Los piridinoles no se detectaban usando la detección de fenoles de aminoantipirina/ferricianuro descrito en la sección precedente. Sin embargo, se encontró que los productos cloropiridinóles absorbían fuertemente en el UV cercano con λ_{máx} de 325 nm a pH 7 (coeficiente de extinción ~8.400 M⁻¹.cm⁻¹). Esto se usó para crear un ensayo espectrofotométrico basado en microplaca continuo. Los ensayos se llevan a cabo en un volumen total de 0,2 ml de MOPS 20 mM a pH 6,75 que contiene NH₄FeSO₄ 200 µM, ascorbato sódico 200 µM, α-cetoglutarato 1 mM, el sustrato adecuado (añadido de una disolución madre 100 mM hecha en DMSO), y enzima. Los ensayos se inician

por adición del sustrato ariloxialcanoato, enzima o α -cetoglutarato en el tiempo cero, y se sigue el aumento de absorbancia durante 10 minutos a 325 nm en un lector de microplaca. Los primeros 2 minutos de la reacción se usarán para determinar las velocidades iniciales.

5.3 - Ensayo colorimétrico usando 2-(2-cloro,4-nitrofenoxi)propionato

- 5 Se ideó un ensayo conveniente de la AAD-13 usando 2-(2-cloro,4-nitrofenoxi)propionato (CNPP) como sustrato. La escisión del CNPP por la AAD-13 liberará 2-cloro-4-nitrofenol. Este fenol tiene una absorbancia amarillo brillante a 410 nm a un pH que permite seguir la reacción de forma continua en por análisis en puntos finales. La presencia de la actividad de AAD-13 se puede seguir visualmente sin necesidad de la adición de reactivos adicionales. Se llevaron a cabo ensayos espectrofotométricos basados en microplaca en un volumen total de 0,2 ml de MOPS 20 mM a pH 6,75 que contiene NH_4FeSO_4 200 μM , ascorbato sódico 200 μM , α -cetoglutarato 1 mM, la cantidad adecuada de CNPP (añadido de una disolución madre 100 mM hecha en DMSO), y enzima. Los ensayos se inician por adición de CNPP, enzima o α -cetoglutarato en el tiempo cero, y se sigue el aumento de absorbancia durante 10 minutos a 410 nm en un lector de microplaca. Los primeros 2 minutos de la reacción se usarán para determinar las velocidades iniciales. Una curva de calibración realizada en condiciones de ensayo convencionales (volumen final del ensayo 200 μl) indicaba que se obtenía una absorbancia a 410 nm de 0,1 a partir de 2-cloro-4-nitrofenol 25,1 μM . Usando este ensayo, se determinó que las constantes cinéticas para el CNPP como sustrato eran $K_m = 31 \pm 5,5 \mu\text{M}$ y $k_{cat} = 16,2 \pm 0,79 \text{ min}^{-1}$.

5.4 - Ensayo de acoplamiento

- 20 Con el fin de ensayar una amplia variedad de sustratos, se detectó la producción de succinato a partir de la rotura del α -cetoglutarato espectrofotométricamente usando un protocolo basado en el método de Luo et. al. (2006) (*Anal. Biochem.* 353: 69-74). Como se representa en la figura 3, la rotura concomitante del α -cetoglutarato y el sustrato de interés por la AAD-13, da como resultado la producción de succinato. El succinato después es modificado a succinil-CoA por la succinil-CoA sintetasa que consume ATP y produce ADP. Después el ADP es consumido por el sistema de acoplamiento enzimático de piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa usado habitualmente (Sigma P0294). La conversión resultante del NADH en NAD se sigue espectrofotométricamente a 340 nm.

5.4.1. - Clonación y expresión de succinil-CoA sintetasa y AAD-13 (v2) marcadas con His

- Los dos genes de *E. coli* que codifican la sintetasa, *sucC* y *sucD*, se amplificaron fuera de la cepa Top10 de *E. coli* de Invitrogen como un amplicón individual. El ADN genómico se obtuvo hirviendo una parte alícuota de las células durante 10 min, después centrifugando y reteniendo el líquido sobrenadante que contiene el ADN. Como molde para la AAD-13 (v2), se usó el clon en pET pDAB4115 previamente creado. Para amplificar los genes *sucCD*, se usaron los siguientes cebadores: *suc-Nde* (SEQ ID NO: 8) 5' CATATGAACCTTACATGAATATCAGGCAAAAC 3' y *suc-Xho* (SEQ ID NO: 9) 5' CTCGAGTTTCAGAACAGTTTTCAGTGCTTC 3'. Para AAD-13 (v2), se usaron los siguientes cebadores: *aad-13F* (SEQ ID NO: 10) 5' CATATGGCGAGCCCGGCG 3' y *aad-13R* (SEQ ID NO: 11) 5' CTCGAGGTGTGCCAGTGCGGTCTC 3'. Estos añaden sitios de restricción adecuados para la clonación en dirección 3' y eliminan el codón de parada para permitir el marcaje con His. Para la reacción, las condiciones del ciclador térmico eran: 96°C 2 min, después 35 ciclos a 96°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 1,5 min, seguido de un ciclo final a 72°C 5 min. Los amplicones resultantes se subclonaron para verificar la secuencia correcta. Cada uno de los clones que contenía el inserto correcto se digirió con *Nde*1/*Xba*1 y los insertos después se clonaron en el vector de expresión pET-26b(+). Para la expresión, se raspó un césped de *E. coli* BL-21 en 50 ml de LB + Kan (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se cultivó a 37°C durante 2 h. Se transfirieron 2 ml de este cultivo a 100 ml de LB + Kan. Estos matraces se cultivaron a 37°C durante 4 h. Las células se indujeron con IPTG 50 μM , y se cultivaron durante la noche a 25°C. Los cultivos se centrifugaron y el sedimento celular se usó para la purificación de proteínas.

5.4.2 - Purificación de AAD-13 y succinil-CoA sintetasa marcada con His

- La AAD-13 marcada con His se purificó usando protocolos de cromatografía de afinidad de metales basándose en las indicaciones del fabricante de la columna. Los sedimentos celulares se recogieron de 1 litro de cultivo y se almacenaron a -80°C, se descongelaron y se volvieron a suspender en 20 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, a pH 8; 200-300 μl de cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma P8849), lisozima 1 mg/ml y MgCl_2 1 mM). Las células resuspendidas se incubaron a temperatura ambiente durante 10-15 min antes de tratar con DNasa para reducir la viscosidad. Todas las etapas posteriores se llevaron a cabo a 4°C. El extracto se centrifugó durante 20 min a 20.000 x g para clarificar. Usando un caudal de 1 ml/min, se aplicó el líquido sobrenadante resultante a 2 cartuchos consecutivos de 1 ml de Co-MACTM (EMD/Novagen 71650) previamente equilibrados con tampón A (Tris 25 mM a pH 8,0, NaCl 0,5 M). Después de cargar el extracto, la columna se lavó con imidazol 5 mM en tampón A hasta que la DO_{280} volvió al valor base. La proteína se eluyó con imidazol 50 mM en tampón A. Las fracciones que contenían AAD-13 predominantemente, indicado por una banda a aproximadamente 30 kDa en SDS-PAGE, se intercambiaron en tampón C (Tris 20 mM a pH 8,0, NaCl 100 mM, DTT 2 mM) usando columnas de desalación BG-10 (Bio-Rad). Después se realizó el ensayo espectrofotométrico de AAD-13 en tampón C de acuerdo con el ensayo acoplado in vitro.

La succinil-CoA sintetasa marcada con His se purificó usando cartuchos consecutivos de 1 ml de Co-MACTM

(EMD/Novagen 71650) y protocolos basados en las instrucciones del fabricante. Los sedimentos celulares que se habían almacenado a -80°C se descongelaron y se volvieron a suspender en 50 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, a pH 7,2; 200-300 μl de cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma P8849), lisozima 1 mg/ml y MgCl_2 1 mM) por litro de cultivo celular. Las células resuspendidas se incubaron a temperatura ambiente durante 10-15 min antes de tratar con DNasa para reducir la viscosidad. Todas las etapas posteriores se llevaron a cabo a 4°C , salvo que se indique otra cosa. El extracto se centrifugó durante 20 min a $20.000 \times g$ para clarificar. En este punto el líquido sobrenadante se puede aplicar directamente a cartuchos Co-MACTM previamente equilibrados con tampón de unión (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM a pH 7,9 e imidazol 5 mM) o llevar a sulfato amónico al 80%. La muestra tratada con sulfato amónico se centrifugó durante 20 min a $20.000 \times g$ para sedimentar la proteína. El sedimento se volvió a suspender en tampón A (Tris 25 mM a pH 8,0, NaCl 0,5 M) y se separó el sulfato amónico residual usando columnas de salación BG-10 (Bio-Rad) preequilibradas con tampón A. Las muestras resultantes se aplicaron a cartuchos Co-MACTM previamente equilibrados con tampón de unión y un caudal de 1 ml/min. Después de la aplicación de la proteína extraída, la columna se aclaró con 10 volúmenes de columna de tampón B al 0,5% (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, e imidazol 1 M). A esto le siguió un gradiente por etapas con 5 volúmenes de columna de tampón B al 6% y un gradiente por etapas de 10 volúmenes de columna adicionales de tampón B al 50%. La mayoría de las proteínas deseadas eluyeron con el gradiente de tampón B al 6%. Las fracciones que contenían succinil-CoA sintetasa se identificaron por la presencia de dos bandas correspondientes a las subunidades de la succinil-CoA sintetasa (~40 y 33 kDa) por SDS PAGE y la detección de la correspondiente actividad in vitro. La actividad de la succinil-CoA sintetasa se confirmó usando una versión modificada de ensayo acoplado in vitro, más adelante. Brevemente, el avance de la reacción se siguió espectrofotométricamente a 340 nm en presencia de tris 100 mM pH 8,0, PEP 1 mM, NADH 0,4 mM, MgCl_2 10 mM, CoA 0,2 mM, ATP 0,2 mM, PK 3,5 U/ml, LDH 5 U/ml, y SCS. La reacción se inició por la adición de succinato 1 mM.

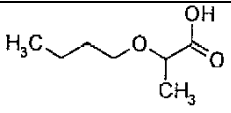
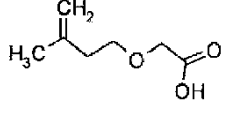
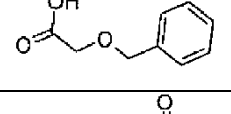
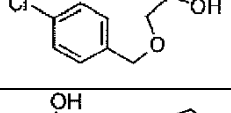
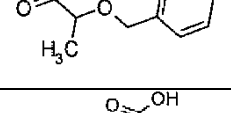
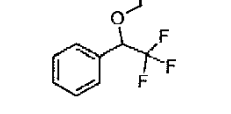
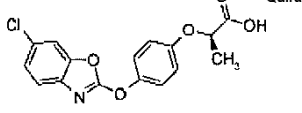
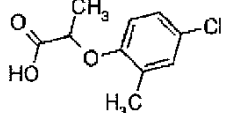
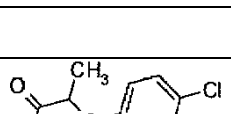
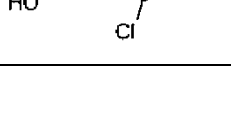
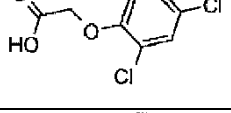
5.4.3 - Ensayo acoplado in vitro

La identificación de los sustratos de la AAD-13 (v2) in vitro se basó en la actividad enzimática detectada durante el seguimiento espectrofotométrico continuo de un volumen de reacción de 0,2 ml en una placa de microvaloración de 96 pocillos. Las condiciones de reacción eran las siguientes: MOPS 100 mM a pH 7,0, NADH 0,4 mM, ATP 0,4 mM, CoA 0,4 mM, PEP 1 mM, MgCl_2 10 mM, FeSO_4 0,1 mM (solubilizado en HCl), y ascorbato 0,1 mM, α -cetoglutarato 1 mM y suficiente AAD-13 (v2) para producir una velocidad observable en presencia de 2,4-D. Las enzimas de acoplamiento (SCS/PK/LDH) se ajustaron por lote para asegurar el acoplamiento adecuado, y los potenciales sustratos se ensayaron en general a 1 mM. Las alteraciones en las concentraciones de sustrato se hicieron según fuera necesaria para ajustar la solubilidad. Las reacciones se iniciaron bien por adición de AAD-13 (v2) o del sustrato potencial. La velocidad de conversión independiente del sustrato del α -cetoglutarato en succinato por la AAD se siguió en las condiciones de ensayo anteriores y se restó de las velocidades de reacción observadas. Las velocidades de reacción observadas con sustratos de propionato se dividieron entre dos para ajustar para la producción de piruvato resultante de la escisión de estos compuestos con la AAD. Adicionalmente, se comprobó en los compuestos de propionato la contaminación por piruvato por seguimiento espectrofotométrico del consumo de NADH en presencia del compuesto y PK/LDH.

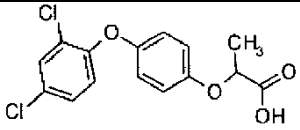
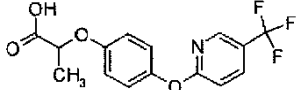
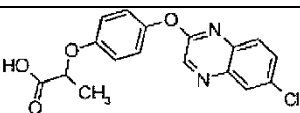
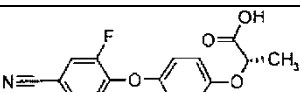
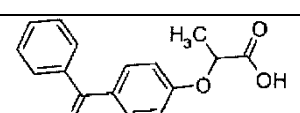
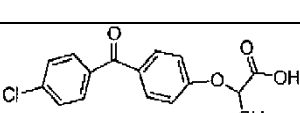
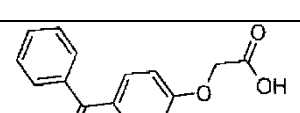
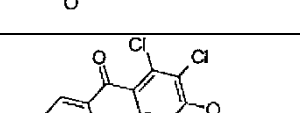
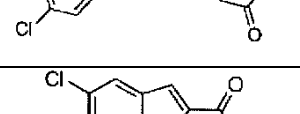
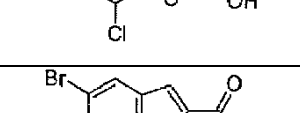
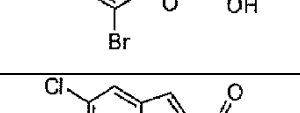
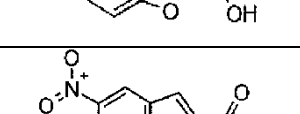
5.4.4 Resultados de cribado in vitro

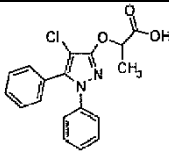
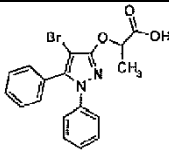
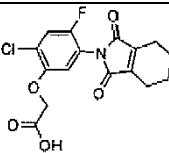
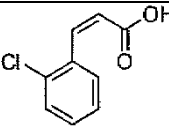
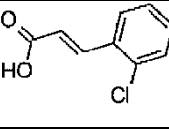
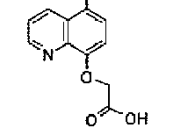
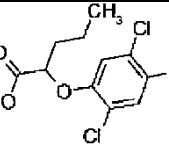
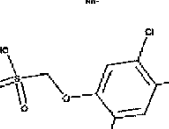
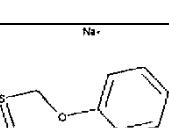
La tabla Ej5 presenta la velocidad de reacción de la AAD-13 (v2) observada con múltiples procesos químicos por el ensayo acoplado in vitro. Las velocidades de reacción se dan como un porcentaje de la velocidad de reacción del 2,4-D obtenida en el mismo conjunto de muestra. Estos datos se pueden usar para separar cualitativamente sustratos de no sustratos, así como para identificar tendencias en la eficacia del sustrato. Debe observarse que velocidades más rápidas pueden ser más difíciles de comparar con precisión dependiendo del porcentaje de sustrato disponible consumido. Esto es particularmente cierto para compuestos de propionato que presentan doble velocidad que los compuestos que no son propionato para el número equivalente de recuperaciones de enzima. Como resultado, se agruparán adecuadamente sustratos muy eficientes cuando se comparen con sustratos de baja eficacia. Sin embargo, dentro del agrupamiento de sustratos muy eficientes, los compuestos no se pueden separar cuantitativamente por un cribado usando velocidades individuales del sustrato y AAD. Los compuestos indicados con un asterisco se ensayaron en concentración 0,5 mM en lugar de 1 mM debido a la interferencia en la absorbancia a mayores concentraciones.

Tabla Ej 5

Nombre	X n°	Sustrato S/N	% de actividad de 24D	ESTRUCTURA MOLECULAR
	191716	S	66	
	571320	S	39	
	93116	S	128	
	475726	S	112	
	118942	S	46	
	470901	S	30	
R-fenoxaprop	11044492	N	2	
Mecoprop	188874	S	169	
r diclorprop			19	
r,s diclorprop	117613	S	195	
S-dihlorprop		S	233	
2,4-D	195517	S	100	
24DB	178577	N	2	

Nombre	X n°	Sustrato S/N	% de actividad de 24D	ESTRUCTURA MOLECULAR
3-amino 24D	11263526	S	151	
	11113675	S	113	
	124988	S	44	
	83293	S	106	
alfa metil florohipir	11182286	S	43	
flurohipir	68316	S	67	
triclopir	156136	N	6	
	93833	S	33	
	66357	S	24	
	91767	S	88	
	116844	S	25	

Nombre	X n°	Sustrato S/N	% de actividad de 24D	ESTRUCTURA MOLECULAR
diclofop	460511	S	>100	
fluazifop	67131	S	~50	
quizalofop	44936*	S		
cihalofop	7466	S		
	66732	S	>100	
	8563	S	64	
	193908	S	56	
	761310*		No detectado	
	11077344*		No detectado	
	198167		No detectado	
	11077347*		No detectado	
	238166*		No detectado	

Nombre	X n°	Sustrato S/N	% de actividad de 24D	ESTRUCTURA MOLECULAR
	657338	N	5	
	657339	N	5	
	11213586	N	2	
	11453845	N	13	
	187507	N	10	
	204558*		No detectado	
	188495	M	19	
	187439		No detectado	
	1190305		No detectado	

La AAD-13 es diferente de otras dioxigenasas dependientes de α -cetoglutarato que tienen actividad degradadora de 2,4-D. Una diferencia clave es la amplia variedad de sustratos ariloxy y alquiloalcanoato, pero una serie de sustitutos piridiloxy son herbicidas y sustratos eficaces (p. ej., fluroxipir) pero otros herbicidas como triclopir son sustratos considerablemente peores. Esto crea una nueva oportunidad para usar herbicidas alternativos para el control de plantas transgénicas con sustratos de la AAD-13. También proporciona la oportunidad de complementar genes similares en la planta, para ampliar la tolerancia o mejorar la variedad de sustratos a los que son tolerantes las plantas.

Ejemplo 6 - Transformación en *Arabidopsis* y selección6.1 - Condiciones de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

Se suspendieron semillas de *Arabidopsis* de tipo natural en solución de agarosa al 0,1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La semilla suspendida se almacenó a 4°C durante 2 días para completar los requisitos de dormancia y asegurar germinación de la semilla sincrónica (estratificación).

La mezcla Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) se cubrió con vermiculita fina y se sub-regó con solución de Hoagland hasta estar húmeda. La mezcla de suelo se dejó drenar durante 24 horas. La semilla estratificada se sembró sobre la vermiculita y se cubrió con cúpulas de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 7 días.

Las semillas germinaron y las plantas se desarrollaron en un Conviron (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) en condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) con una intensidad de luz de 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ a temperatura (22° C) y humedad (40-50%) constante. Las plantas inicialmente se regaron con solución de Hoagland y posteriormente con agua desionizada para mantener la humedad del suelo, pero no mojado.

6.2 - Transformación de *Agrobacterium*

Se usó una placa de LB + agar con eritromicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) que contenía una colonia de DH5 α en estríado, para proporcionar una colonia para inocular 4 ml de cultivos miniprep (líquido LB + eritromicina). Los cultivos se incubaron durante la noche a 37°C con agitación constante. Se usaron Spin Mini Preps de Qiagen (Valencia, CA), realizados por las instrucciones del fabricante para purificar el ADN plasmídico.

Se prepararon células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* (cepas Z707s, EHA101s, y LBA4404s) usando un protocolo de Weigel y Glazebrook (2002). Las células de *Agrobacterium* competentes se transformaron usando un método de electroporación adaptado del de Weigel y Glazebrook (2002). Se descongelaron 50 μl de células competentes de agro se descongelaron sobre hielo, y se añadieron 10-25 ng del plásmido deseado a las células. La mezcla de ADN y células se añadió a cuberas previamente enfriadas de electroporación (2 mm). Se usó un electroporador Eppendorf 2510 para la transformación con las siguientes condiciones, Voltaje: 2,4 kV, Longitud de pulso: 5 ms.

Después de electroporación, se añadió 1 ml de caldo YEP (por litro: 10 g de extracto de levadura, 10 g de Bactopeptona, 5 g de NaCl) a la cubeta y la suspensión de células-YEP se transfirió a un tubo de cultivo de 15 ml. Las células se incubaron a 28°C en un baño de agua con agitación constante durante 4 horas. Después de incubación, los cultivos se pusieron en placas en YEP + agar con eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (250 mg/l). Las placas se incubaron durante 2-4 días a 28°C.

Las colonias se seleccionaron y se aplicaron en estrías en YEP + agar de nueva aportación con eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomina (250 mg/l) y se incubaron a 28°C durante 1-3 días. Las colonias se seleccionaron para el análisis por PCR para verificar la presencia del inserto génico usando cebadores específicos de vector. Se usaron Spin Mini Preps de Qiagen, realizados según las instrucciones del fabricante, para purificar el ADN plasmídico de las colonias de *Agrobacterium* seleccionadas, con la siguiente excepción: se usaron partes alícuotas de 4 ml de un cultivo miniprep de 15 ml de una noche (YEP líquido + eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomina (250 mg/l)) para la purificación del ADN. Una alternativa al uso del ADN de Spin Mini Prep de Qiagen, era la lisis de las células de *Agrobacterium* transformadas, suspendidas en 10 μl de agua, a 100°C durante 5 minutos. El ADN plasmídico del vector binario usado en la transformación de *Agrobacterium* se incluyó como un control. La reacción de PCR se completó usando la ADN polimerasa Taq de Takara Mirus Bio Inc. (Madison, Wisconsin) por las instrucciones del fabricante en concentraciones 0,5x. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico MJ Research programado con las siguientes condiciones 1) 94°C durante 3 minutos, 2) 94°C durante 45 segundos, 3) 55°C durante 30 segundos, 4) 72°C durante 1 minuto, durante 29 ciclos después 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos. La amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó por tinción con bromuro de etidio. Se seleccionó una colonia cuyo producto de la PCR era idéntico al plásmido de control.

6.3 - Transformación de *Arabidopsis*

Arabidopsis se transformó usando el método de inmersión floral. La colonia seleccionada se usó para inocular uno o más precultivos de 15-30 ml de caldo YEP que contenían eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomina (250 mg/l). El o los cultivos se incubaron durante la noche a 28°C con agitación constante a 220 rpm. Cada precultivo se usó para inocular dos cultivos de 500 ml de caldo YEP que contenían eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomina (250 mg/l), y los cultivos se incubaron durante la noche a 28°C con agitación constante. Las células después se sedimentaron a aproximadamente 8700x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y el líquido sobrenadante resultante se descartó. El sedimento celular se volvió a suspender

suavemente en 500 ml de medio de infiltración que contenían: 1/2x sales de Murashige y Skoog/vitaminas B5 de Gamborg, sacarosa al 10% (p/v), bencilaminopurina 0,044 μM (10 μl /litro de solución madre 1 mg/ml en DMSO) y 300 μl /litro de Silwet L-77. Las plantas de aproximadamente 1 mes de edad se sumergieron en el medio durante 15 segundos, asegurándose de sumergir la florescencia más nueva. Después las plantas se tendieron sobre sus lados y se cubrieron (transparente u opaco) durante 25 horas, después se lavaron con agua y se pusieron derechas. Las plantas se desarrollaron a 22°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Aproximadamente 4 semanas después de la inmersión, se recogieron las semillas.

6.4 - Selección de plantas transformadas

Las semillas T_1 recién recogidas [gen *AAD-13* (*v1*)] se dejaron secar durante 7 días a temperatura ambiente. Las semillas T_1 se sembraron en bandejas de germinación de 26,5 x 51 cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), recibiendo cada una, una parte alícuota de 200 mg de semillas T_1 estratificadas (~10.000 semillas) que se habían suspendido previamente en 40 ml de solución de agarosa al 0,1% y se almacenaron a 4°C durante 2 días.

Mezcla Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) se cubrió con vermiculita fina y se regó por abajo con solución de Hoagland hasta estar mojado, después se drenó por gravedad. Se sembraron partes alícuotas de 40 ml de semillas estratificadas uniformemente sobre vermiculita con una pipeta y se cubrieron con cúpulas de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4-5 días. Las cúpulas se retiraron 1 día antes de la selección de transformante inicial usando pulverización post-brotado con glufosinato (selección del gen *PAT* cotransformado).

Siete días después de la plantación (DDP) y de nuevo 11 DDP, las plantas T_1 (cotiledón y fase de 2-4 hojas, respectivamente) se pulverizaron con una solución al 0,2% de herbicida Liberty (200 g ea/l de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) con un volumen de pulverización de 10 ml/bandeja (703 l/ha) usando una boquilla de pulverizador de aire comprimido DeVilbiss para suministrar una tasa eficaz de 280 g ea/ha de glufosinato por aplicación. Las supervivientes (plantas que crecen activamente) se identificaron 4-7 días después de la pulverización final y se trasplantaron individualmente a macetas de 7,6 cm (3 pulgadas) preparadas con medio para macetas (Metro Mix 360). Las plantas trasplantadas se cubrieron con cúpulas de humedad durante 3-4 días y se pusieron en una cámara de crecimiento a 22°C como antes o se llevaron directamente al invernadero. Posteriormente se retiraron las cúpulas y las plantas se criaron en el invernadero (22±5°C, 50±30% HR, 14 h de luz:10 de oscuridad, mínimo 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ natural + luz complementaria) al menos 1 día antes del ensayo de la capacidad de *AAD-13* (*v1*) de proporcionar resistencia a herbicidas auxínicos de fenoxi.

Después, las plantas T_1 se asignaron aleatoriamente a diferentes tasas de 2,4-D. Para *Arabidopsis*, 50 g ea/ha de 2,4-D es una dosis eficaz para distinguir las plantas sensibles de las que tienen niveles significativos de resistencia. También se aplicaron tasas elevadas para determinar los niveles relativos de resistencia (280, 560, 1120, o 2240 g ea/ha). Las tablas 11 y 12 muestran comparaciones hechas con un gen de resistencia a herbicida de ariloxialcanoato (*AAD-12* (*v1*)) descrito previamente en el documento PCT/US20061042133.

Todas las aplicaciones de herbicidas auxínicos se hicieron usando el pulverizador DeVilbiss como se ha descrito antes, para aplicar un volumen de pulverización de 703 l/ha (0,4 ml de disolución/maceta de 7,6 cm (3 pulgadas)) o se aplicaron por pulverización de surco en un volumen de pulverización de 187 l/ha. Se usó 2,4-D de calidad técnica (Sigma, St. Louis, MO) disuelto en DMSO y diluido en agua (concentración final en DMSO <1%) o la formulación de la sal de dimetilamina (456 g ea/l, NuFarm, St Joseph, MO). El diclorprop era de calidad comercial formulado como la sal de potasio de R-diclorprop (600 g ai/l, AH Marks). Cuando las tasas de herbicidas aumentaban más allá de 800 g ea/ha, el pH de la solución de pulverización se hacía demasiado ácida, quemando las hojas de las plantas de *Arabidopsis* tiernas, jóvenes y complicando la evaluación de los efectos principales de los herbicidas.

Algunas T_1 individuales se sometieron a herbicidas comerciales alternativos en lugar de una auxina de fenoxi. Un punto de interés era determinar si los herbicidas auxínicos de piridiloxiacetato, triclopir y fluroxipir, podían ser degradados eficazmente en la planta. Los herbicidas se aplicaron a plantas T_1 usando un pulverizador de surco con un volumen de pulverización de 187 l/ha. Las plantas T_1 que presentaron tolerancia a 2,4-D DMA accedieron además a la generación T_2 .

6.5 - Resultados de la selección de plantas transformadas:

Las primeras transformaciones de *Arabidopsis* se llevaron a cabo usando *AAD-13* (*v1*) (gen optimizado para plantas). Los transformantes T_1 se seleccionaron primero del fondo de semillas no transformadas usando un esquema de selección con glufosinato. Se cribaron alrededor de 160.000 semillas T_1 y se identificaron 238 plantas resistentes al glufosinato (gen *PAT*), que equivale a una frecuencia de transformación/selección de 0,15% lo que está en el intervalo normal de frecuencia de selección de construcciones donde se usaron *PAT* + *Liberty* para la selección. Las plantas T_1 seleccionadas antes posteriormente se trasplantaron a macetas individuales y se pulverizaron con diferentes tasas de herbicidas de ariloxialcanoato comerciales. La tabla 11 compara la respuesta de *AAD-13* (*v1*) y los genes de control para impartir resistencia a 2,4-D a los transformantes de *Arabidopsis* T_1 . La respuesta se presenta en términos de % de daño visual 2 WAT. Los datos se presentan como un histograma de individuos que presentan poco o no presentan daño (<20%), daño moderado (20-40%), o daño grave (>40%). Se

presenta una media aritmética y desviación estándar para cada tratamiento. El intervalo de respuesta individual también se indica en la última columna para cada tasa y transformación. *Arabidopsis* transformada por *PAT/Cry1F* servía como un control transformado sensible a auxinas. El gen *AAD-13 (v1)* impartía resistencia a herbicidas a plantas *Arabidopsis* T₁ individuales. Con un tratamiento dado, el nivel de la respuesta de la planta variaba mucho y se puede atribuir al hecho de que cada planta representa un suceso de transformación independiente. Es importante destacar, con cada tasa de 2,4-D ensayada, había individuos que no se afectaron mientras que otros estaban gravemente afectados. El daño medio por tasa de la población general se presenta en la tabla 11 simplemente para demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con *AAD-13 (v1)* frente a controles transformados con *AAD-12 (v1)* o *PAT/Cry1F*. Con tasas altas la solución de pulverización se volvió muy ácida salvo que se tamponara, por lo que algo del daño se puede atribuir a la acidez de la solución de pulverización. *Arabidopsis* desarrollada principalmente en la cámara de crecimiento tiene una cutícula muy fina y efectos de quemado graves pueden complicar el ensayo a estas tasas elevadas. No obstante, han sobrevivido muchos individuos con 2.240 g ea/ha de 2,4-D con poca o sin daños.

Tabla 11. Respuesta de *Arabidopsis* T₁ transformada con *AAD-13 (v1)* a un intervalo de tasas de 2,4-D aplicadas post-brote, comparado con una población resistente homocigótica *AAD-12 v1 (T4)*, o un control sensible a auxinas, transformado con *Pat-Cry1F* (14 DAT).

plantas T ₁ con gen <i>AAD-13 (v1)</i> Medias	% daño			% daño		
	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. est.	Intervalo (%)
0 g ea/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
280 g ea/ha 2,4-D DMA	12	4	4	21	31	0-90
560 g ea/ha 2,4-D DMA	17	2	0	2	6	0-20
1120 g ea/ha 2,4-D DMA	20	0	0	2	4	0-10
2240 g ea/ha 2,4-D DMA	14	3	3	15	23	0-70
PAT / Cry1F (control transformado) Medias	% daño			% daño		
	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. est.	Intervalo (%)
0 g ea/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
280 g ea/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
560 g ea/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
1120 g ea/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
2240 g ea/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
Plantas T ₄ con gen <i>AAD-12 (v1)</i> homocigóticas Medias	% daño			% daño		
	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. est.	Intervalo (%)
0 g ea/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
280 g ea/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
560 g ea/ha 2,4-D DMA	20	0	0	1	3	0-10
1120 g ea/ha 2,4-D DMA	20	0	0	2	4	0-15
2240 g ea/ha 2,4-D DMA	16	3	1	13	13	0-50

La tabla 12 muestra una respuesta a la dosis llevada a cabo de forma similar de *Arabidopsis* T₁ al ácido fenoxipropiónico, diclorprop. Los datos muestran que el isómero (R) de diclorprop activo como herbicida no sirve como un sustrato adecuado para *AAD-13 (v1)* o *AAD-12 (v1)*. El hecho de que *AAD-1 (v3)* metabolizará R-diclorprop

suficientemente bien para impartir tolerancia comercialmente aceptable es una característica distintiva que separa los tres genes (tabla 12 y ejemplo 7 del documento WO/2007/053482 (Wright et al., presentado el 27 de octubre, 2006), AAD-1 y AAD-13 se consideran α -cetoglutarato dioxigenasas específicas para R y S, respectivamente.

Tabla 12. Respuesta de <i>Arabidopsis</i> T ₁ a un intervalo de tasas de R-diclorprop aplicadas post-brotación. (14 DAT)						
plantas T ₁ con gen AAD-13 (v1)	% daño			% daño		
Medias	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. est.	Intervalo (%)
0 g ea/ha	20	0	0	0	0	0
800 g ea/ha R-diclorprop	0	0	20	100	0	100
Tipo natural (control transformado)	% daño			% daño		
Medias	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. est.	Intervalo (%)
0 g ea/ha	20	0	0	0	0	0
800 g ea/ha R-diclorprop	0	0	20	100	0	100
Plantas T ₄ con gen AAD-12 (v1) homocigóticas	% daño			% daño		
Medias	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. est.	Intervalo (%)
0 g ea/ha	20	0	0	0	0	0
800 g ea/ha R-diclorprop	0	0	20	100	0	100

5 6.6 - AAD-13 (v1) como un marcador seleccionable

Se analizó la capacidad de usar AAD-13 (v1) como un marcador seleccionable usando 2,4-D como el agente de selección con *Arabidopsis* transformadas como se ha descrito antes. Se añadieron aproximadamente 50 semillas de *Arabidopsis* de generación T₄ (homocigótica para AAD-13 (v1)) en aproximadamente 5.000 semillas de tipo natural (sensibles). Se compararán diferentes tratamientos, cada bandeja de plantas recibirá una o dos veces aplicación de 2,4-D en uno de los siguientes esquemas de tratamiento: a los 7 DDP, 11 DDP, o 7 seguido de 11 DDP. Puesto que todos los individuos también contienen el gen *PAT* en el mismo vector de transformación, AAD-13 seleccionado con 2,4-D se puede comparar directamente con *PAT* seleccionado con glufosinato.

Los tratamientos se aplicarán con una boquilla de pulverización DeVilbiss como se ha descrito previamente. Las plantas se identificarán como resistentes o sensibles 17 DDP. El tratamiento óptimo de 75 g ea/ha de 2,4-D aplicado a los 7 y 11 días después de plantación (DDP), es igualmente eficaz en la frecuencia de selección, y produce menos daño herbicida a los individuos transformados que el esquema de selección con Liberty. Estos resultados indicarán que AAD-13 (v1) se puede usar eficazmente como un marcador seleccionable alternativo para una población de *Arabidopsis* transformadas.

6.7 - Heredabilidad

Una variedad de sucesos T₁ autopolinizaron para producir semillas T₂. Se llevó a cabo el ensayo de progenie de estas semillas aplicando Liberty (280 g ea/ha) a 100 hermanos T₂ aleatorios. Cada planta T₂ individual se trasplantó a macetas cuadradas de 7,5 cm antes de la aplicación de la pulverización (pulverización de surco con tasas de aplicación de 187 l/ha). El 50 por ciento de las familias de T₁ (plantas T₂) segregaron en el modelo anticipado de 3 resistentes:1 sensible para un solo locus heredado de forma dominante con herencia mendeliana determinada por análisis de Chi cuadrado (P>0,05).

Se recogieron las semillas de 12 a 20 individuos T₂ (semillas T₃). Se llevó a cabo el ensayo de progenie en 25 hermanos T₃ de cada una de 8 familias T₂ seleccionadas aleatoriamente. La mitad de las familias T₂ ensayadas eran homocigóticas (poblaciones que no se segregan) en cada línea. Estos datos muestran que AAD-13 (v1) es integrado establemente y heredado de forma mendeliana en al menos tres generaciones.

6.8 - Resistencia herbicida en aplicaciones foliares adicionales en *Arabidopsis* AAD-13

La capacidad de AAD-13 (v1) para proporcionar resistencia a otros herbicidas auxínicos de ariloxialcanoato en *Arabidopsis* transgénicas, se determinó por aplicación foliar de diferentes sustratos. Semillas de *Arabidopsis* de generación T₂ se estratificaron, y se sembraron en bandejas de selección muy parecidas a las de *Arabidopsis* (ejemplo 6.4). Se plantó de forma similar una línea de control transformada que contenía PAT y el gen de resistencia a insectos Cry1F. Los plantones se transfirieron a macetas individuales de 7,6 cm (3 pulgadas) en el invernadero. Todas las plantas se pulverizaron usando un pulverizador de surco ajustado a 187 l/ha. Las plantas se pulverizaron con un intervalo de herbicidas de piridiloxiacetato: 200-800 g ea/ha de triclopir (Garlon 3A, Dow AgroSciences) y 200-800 g ea/ha fluroxipir (Starane, Dow AgroSciences). El metabolito 2,4-D resultante de la actividad de la AAD-13, 2,4-diclorofenol (DCP, Sigma) (con un equivalente molar de 280-2240 g ea/ha de 2,4-D, calidad técnica) también se ensayó. Todas las aplicaciones se formularon en agua. Cada tratamiento se repitió 3-4 veces. Las plantas se evaluaron a los 3 y 14 días después de tratamiento.

Las plantas transformadas con AAD-13 también estaban claramente protegidas frente al daño por el herbicida fluroxipir que se vio en la línea de control transformada, Pat/Cry1F (véase la tabla 13); sin embargo, las plantas transformadas con AAD-13 fueron gravemente dañadas por triclopir. Estos resultados confirman que AAD-13 (v1) en *Arabidopsis* proporciona resistencia a las auxinas piridiloxiacéticas ensayadas. El gen AAD-13 (v1) proporcionaba resistencia fuerte hasta 400 g ea/ha de fluroxipir, mientras que el gen AAD-12 (v1) proporcionaba solo un nivel modesto de tolerancia tan bajo como 200 g/ha. El gen AAD-13 (v1) proporcionaba significativamente menos tolerancia al triclopir que el gen AAD-12 (v1) gene. La tolerancia significativamente mayor al fluroxipir es inesperada, y permite distinguir la actividad de tipo AAD-13 (v1) de la de AAD-12 (v1) y es apoyado por los datos enzimáticos del ejemplo 5.

Tabla 13. Comparación de respuesta de la planta *Arabidopsis* T2 AAD-13 (v1) y de control transformada frente a herbicidas auxínicos con aplicación foliar

Auxinas piridiloxiacéticas			
Tratamiento herbicida	% medio de daños 14DAT		
	Plantas T2 AAD-13 (v1) que segregan (pDAB4114.01.094)	Plantas T4 AAD-12(v1) homocigóticas	Control Pat/Cry1f
200g ea/ha triclopir	75	25	100
400 g ea/ha triclopir	90	33	100
800 g ea/ha triclopir	100	79	100
200 g ea/ha fluroxipir	10	48	100
400 g ea/ha fluroxipir	16	55	100
800 g ea/ha fluroxipir	55	60	100

Ejemplo 7 - Transformación de especies de cultivos adicionales

El maíz se puede transformar para proporcionar niveles altos de resistencia al 2,4-D y fluroxipir usando las mismas técnicas descritas previamente en el ejemplo n° 8 del documento WO 2007/053482 (PCT/US2006/042133 (Wright et al.)).

La soja se puede transformar para proporcionar niveles altos de resistencia al 2,4-D y fluroxipir usando las mismas técnicas descritas previamente en el ejemplo n° 11 o ejemplo n° 13 del documento WO 2007/053482 (PCT/US2006/042133 (Wright et al.)).

El algodón se puede transformar para proporcionar niveles altos de resistencia al 2,4-D y fluroxipir usando las mismas técnicas descritas previamente en el ejemplo n° 14 de la solicitud de patente WO/2005/107437 (Wright et al., presentada el 2 de mayo, 2005) o el ejemplo n°12 del documento WO 2007/053482 (Wright et al.).

La canola se puede transformar para proporcionar niveles altos de resistencia al 2,4-D y fluroxipir usando las mismas técnicas descritas previamente en el ejemplo n° 26 de la solicitud de patente WO/2005/107437 (Wright et al., presentada el 2 de mayo, 2005) o el ejemplo n° 22 del documento WO 2007/053482 (Wright et al.).

Ejemplo 8 - Detección de proteínas de las plantas transformadas mediante anticuerpos

Se pueden desarrollar e implementar anticuerpos y los posteriores ensayos ELISA como se describe en el ejemplo 9

del documento WO 2007/053482 (Wright et al.), por ejemplo.

Ejemplo 9 - Transformación de tabaco

La transformación de tabaco con *Agrobacterium tumefaciens* se llevó a cabo por un método similar, pero no idéntico, a los métodos publicados. Para proporcionar el tejido fuente para la transformación, se esterilizó la superficie de semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. KY160) y se plantaron en la superficie de medio TOB, que es un medio de Murashige y Skoog sin hormonas, solidificado con agar. Las plantas se desarrollaron durante 6-8 semanas en una sala incubadora iluminada a 28-30°C, y se recogieron hojas de forma estéril para usar en el protocolo de transformación. Se cortaron de forma estéril trozos de aproximadamente 1 centímetro cuadrado de las hojas, excluyendo la nervadura. Cultivos de las cepas de *Agrobacterium* (EHA101S que contenía pDAB3278, también llamado pDAS1580, AAD-13 (v1) + PAT), cultivadas durante la noche en un matraz en un agitador ajustado a 250 rpm a 28°C, se sedimentaron en una centrífuga y se volvieron a suspender en sales de Murashige y Skoog estériles, y se ajustaron hasta una densidad óptica final de 0,5 a 600 nm. Se sumergieron trozos de hoja en esta suspensión bacteriana durante aproximadamente 30 segundos, después se secaron por absorción sobre toallas de papel estéril y se pusieron boca arriba en medio TOB+ (medio de Murashige y Skoog que contenía ácido indolacético 1 mg/l y benciladenina 2,5 mg/l) y se incubaron en la oscuridad a 28°C. Dos días después, los trozos de hojas se llevaron a medio TOB+ que contenía cefotaxima 250 mg/l (Agri-Bio, North Miami, Florida) y glufosinato amónico 5 mg/l (ingrediente activo en Basta, Bayer Crop Sciences) y se incubaron a 28-30°C con luz. Los trozos de hojas se llevaron a medio TOB+ de nueva aportación con cefotaxima y Basta dos veces por semana durante las dos primeras semanas y después una vez por semana. De 2 a 4 semanas después de tratar los trozos de hojas con *Agrobacteria*, se sacaron de esta preparación tisular pequeñas plantas que surgían de los focos transformados y se plantaron en medio TOB que contenía cefotaxima 250 mg/l y Basta 10 mg/l en recipientes Phytatray™ II (Sigma). Estos plantones se desarrollaron en una sala incubadora iluminada. Después de 3 semanas, se cogieron estacas del tallo y se arraigaron de nuevo en el mismo medio. Las plantas estaban listas para enviarlas al invernadero después de 2-3 semanas adicionales.

Las plantas se llevaron al invernadero lavando el agar de las raíces, se trasplantaron a suelo en macetas cuadradas de 13,75 cm, poniendo la maceta en una bolsa Ziploc® (SC Johnson & Son, Inc.), poniendo agua corriente en el fondo de la bolsa, y poniéndolas con luz indirecta en un invernadero a 30°C durante una semana. Después de 3-7 días, se abrió la bolsa; las plantas se fertilizaron y se dejaron crecer en la bolsa abierta hasta que las plantas se aclimataron al invernadero, momento en el que se retiró la bolsa. Las plantas crecieron en condiciones de invernadero templado ordinarias (30°C, 16 horas de día, 8 horas de noche, luz mínima natural + complementaria = 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$).

Antes de la propagación, se tomaron muestras de las plantas T_0 para el análisis de ADN para determinar el número de copias de inserto. Se ensayó por conveniencia el gen *PAT* que está molecularmente unido a AAD-13 (v1). Se puso tejido reciente en tubos y se liofilizó a 4°C durante 2 días. Después de secar el tejido completamente, se puso un haz de tungsteno (Valenite) en el tubo, y las muestras se sometieron a 1 min de trituración en seco usando un molino de perlas Kelco. Después se siguió el procedimiento convencional de aislamiento de ADN DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). Después se tiñó una parte alícuota del ADN extraído con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se leyó en el fluorómetro (BioTek) con referencias conocidas para obtener la concentración en ng/ μl .

Las muestras de ADN se diluyeron a aproximadamente 9 ng/ μl y después se desnaturalizaron por incubación en un termociclador a 95°C durante 10 minutos. Después se prepara la mezcla Signal Probe usando la mezcla de oligonucleótidos proporcionada y MgCl_2 (Third Wave Technologies). Se pone una parte alícuota de 7,5 μl en cada pocillo de la placa de ensayo Invader seguido de una parte alícuota de 7,5 μl de controles, referencias y 20 ng/ μl de muestras desconocidas diluidas. Cada pocillo se cubrió con 15 μl de aceite mineral (Sigma). Las placas se incubaron a 63°C durante 1,5 horas y se leyeron en el fluorómetro (Biotek). El cálculo del % de señal frente al fondo para la sonda objetivo dividido entre el % de señal frente al fondo de la sonda de control interno, calculará la relación. La relación de referencias de copias conocidas desarrolladas y validadas con análisis de transferencia southern se usó para identificar las copias estimadas de sucesos desconocidos.

También se ensayó en todos los sucesos la presencia del gen AAD-13 (v1) por PCR usando las mismas muestras de ADN extraídas. Se usaron un total de 100 ng de ADN total como molde. Se usó 20 mM de cada cebador con el kit de Takara Ex Taq PCR Polymerase. Los cebadores para AAD-13 para la PCR por unidad de transcripción de planta (PTU) eran (SdpacodF: ATGGCTCA TGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO: 6) y (SdpacodR: CGGGCAGGCCTAACTCCACC AA) (SEQ ID NO: 7). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 64°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 45 segundos seguido de 72°C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con EtBr.

9.1 - Selección de plantas transformadas

Después de la aclimatación en el invernadero, las plantas T_0 se asignaron aleatoriamente a diferentes tasas de 2,4-D DMA en el intervalo de 140 a 2240 g ea/ha en incrementos de 4 veces. Para el tabaco, 140 g ea/ha de 2,4-D es una dosis eficaz para distinguir las plantas sensibles de las que tienen niveles significativos de resistencia. La tabla

14 muestra comparaciones extraídas de plantas T₀ transformadas con un gen de resistencia al herbicida glufosinato (tabaco transformado con *PAT/Cry1F*). Los datos demostraron que AAD-13 (v1) en plantas de tabaco transformadas proporciona una tolerancia fuerte al 2,4-D DMA de al menos 2240 g ea/ha.

Tabla 14. Comparación de la respuesta de plantas de tabaco T₀ AAD-13 (v1) y de control transformadas (*PAT*) a diferentes tasas de 2,4-D DMA 14 días después de la aplicación.

PAT/Cry1F (controles transformados)	% daño			% daño		
Medias	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. est.	Intervalo (%)
0 g ea/ha 2,4-D DMA	3	0	0	0,0	0,0	0
140 g ea/ha 2,4-D DMA	0	1	2	47,0	6,0	40-50
560 g ea/ha 2,4-D DMA	0	0	3	75,0	0,0	75
2240 g ea/ha 2,4-D DMA	0	0	3	97,0	8,0	90-100
plantas T ₀ con gen AAD-13 (v1)	% daño			% daño		
Medias	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. est.	Intervalo (%)
0 g ea/ha 2,4-D DMA	2	0	0	0,0	0,0	0
140 g ea/ha 2,4-D DMA	2	0	0	8,0	11,0	0-15
560 g ea/ha 2,4-D DMA	2	0	0	3,0	4,0	0-5
2240 g ea/ha 2,4-D DMA	2	0	0	5,0	0,0	5

- 5 Se guardaron semillas T₁ de transformantes T₀ individuales y las semillas se estratificaron y se sembraron en bandejas de selección en el invernadero de forma muy similar a la del ejemplo 5. Antes de ensayar las tasas elevadas de 2,4-D DMA, se llevó a cabo el ensayo de la progenie de la línea T₁ aplicando 2,4-D DMA (560 g ea/ha) a 100 hermanos T₁ aleatorios. Las aplicaciones de pulverización se hicieron como se ha descrito previamente con un pulverizador de surco calibrado para una tasa de aplicación de 187 l/ha. El 43 por ciento de las familias T₀ (plantas T₁) segregaron en el modelo previsto de 3 resistentes:1 sensible para un locus solo heredado de forma dominante con herencia mendeliana determinado por análisis de Chi cuadrado ($P > 0,05$).

- 10 Se recogieron las semillas de 12 a 20 individuos T₂ (semillas T₂). Se llevó a cabo el ensayo de progenie en 25 hermanos T₃ de cada una de 8 familias T₂ seleccionadas aleatoriamente, como se ha descrito previamente. Aproximadamente un tercio de las familias T₂ se prevé que sean homocigóticas (poblaciones que no segregan) en cada línea. Estos datos muestran que AAD-13 (v1) es integrado establemente y heredado de forma mendeliana en al menos tres generaciones.

- 15 Después, las plantas T₁ que sobreviven se asignaron aleatoriamente a diferentes tasas de 2,4-D. Para el tabaco 140 g ea/ha de 2,4-D es una dosis eficaz para distinguir plantas sensibles de aquellas con niveles significativos de resistencia. También se aplicaron tasas elevadas para determinar los niveles relativos de resistencia (140, 560 o 2240 g ea/ha). La tabla 15 muestra las comparaciones extraídas de una variedad de tabaco de control no transformada (KY160).

- 20 Todas las aplicaciones de herbicida auxínico se aplicaron mediante pulverizador de surco con un volumen de pulverización de 187 l/ha. El 2,4-D usado era la formulación comercial de la sal de dimetilamina (456 g ae/l, NuFarm, St Joseph, MO). Algunos individuos T₁ se sometieron a herbicidas comerciales alternativos en lugar de una auxina de fenoxi. Un punto de interés era determinar si los herbicidas auxínicos de piridiloxiacetato, triclopir y fluroxipir, podrían ser degradados eficazmente en la planta. Los herbicidas se aplicaron a las plantas T₁ usando un pulverizador de surco con un volumen de pulverización de 187 l/ha. Las plantas T₁ que presentaban tolerancia a 2,4-D DMA después accedieron a la generación T₂.

9.2 - Resultados de la selección de plantas transformadas

- 30 Los transformantes T₁ se seleccionaron primero del fondo de plantas no transformadas usando un esquema de selección con 2,4-D. La tabla 15 compara la respuesta de AAD-13 (v1) y los genes de control para impartir resistencia a 2,4-D a los transformantes de T₁ del tabaco. La respuesta se presenta en términos de % de daño visual 2 WAT. Los datos se presentan como un histograma de individuos que presentan poco o no presentan daño (<20%),

daño moderado (20-40%), o daño grave (>40%). Se presenta una media aritmética y desviación estándar para cada tratamiento. El intervalo de respuesta individual también se indica en la última columna para cada tasa y transformación. El tabaco no transformado KY160 servía como un control sensible a auxinas. El gen *AAD-13* (*v1*) impartía resistencia a herbicidas a plantas de tabaco *T₁* individuales.

Tabla 15. Respuesta del tabaco *T₁* transformado con *AAD-13* (*v1*) a un intervalo de tasas de 2,4-D aplicadas post-brotación a un control no transformado sensible a auxinas.

Tipo natural (control no transformado)	% daño			% daño		
	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. est.	Intervalo (%)
Medias						
Control no tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
140 g ea/ha 2,4-DMA	0	0	3	80,0	0,0	80
560 g ea/ha 2,4-DMA	0	0	3	88,0	1,0	88-89
2240 g ea/ha 2,4-DMA	0	0	3	92,0	3,0	90-95
Plantas <i>T₁</i> con gen <i>AAD-13</i> (<i>v1</i>)	% daño			% daño		
	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. est.	Intervalo (%)
Medias						
Control no tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
140 g ea/ha 2,4-DMA	3	0	0	0,0	0,0	0
560 g ea/ha 2,4-DMA	3	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ea/ha 2,4-DMA	3	0	0	2,0	3,0	0-5

5

9.3 - Resistencia a herbicida en aplicaciones foliares adicionales en el tabaco con *AAD-13*

Se determinó la capacidad de *AAD-13* (*v1*) para proporcionar resistencia a otros herbicidas auxínicos de ariloxialcanoato en el tabaco transgénico, por aplicación foliar de diferentes sustratos. Plantas de generación *T₁* extras después del ensayo de progenie de *T₁* se pulverizaron usando el pulverizador de surco ajustado a 187 l/ha. Las plantas se pulverizaron con una variedad de herbicidas: 140-1120 g ea/ha de triclopir (Garlon 3A, Dow AgroSciences) y 280-1120 g ea/ha de fluroxipir (Starane, Dow AgroSciences). Todas las aplicaciones se formularon en agua. Cada tratamiento se repitió 3 veces. Las plantas se evaluaron 3 y 14 días después de tratamiento.

10

Las plantas transformadas con *AAD-13* eran poco protegidas del triclopir pero estaban bien protegidas del daño por el herbicida fluroxipir que se vio en la línea de control no transformada (véase la tabla 16). Estos resultados confirman que *AAD-13* (*v1*) en el tabaco proporciona resistencia a algunas auxinas piridiloxiacéticas ensayadas. El gen *AAD-13* (*v1*) proporcionaba tolerancia significativa hasta 1120 g ea/ha de fluroxipir, mientras que el gen proporcionaba solo un nivel modesto de tolerancia al triclopir tan bajo como 280 g/ha. Estos datos confirman que *AAD-13* (*v1*) proporciona una selectividad sesgada hacia el fluroxipir frente al triclopir de las auxinas de piridiloxi en múltiples especies. Esta observación inesperada distingue además el gen *AAD-13* (*v1*) de otras enzimas de tolerancia a herbicidas de mecanismo similar y se observa en múltiples especies de plantas.

15

20

Tabla 16. Comparación de la respuesta de plantas de tabaco *T₁* con *AAD-13* (*v1*) y de control transformadas a diferentes herbicidas auxínicos por aplicación foliar 14 días después de la aplicación.

Auxinas piridiloxiacéticas		
Tratamiento con herbicida	Plantas que segregan <i>T₁</i> <i>AAD-13</i> (<i>v1</i>) (pDAB4114[1]003.006)	KY160 (control no transformado)
280 g ea/ha triclopir	53,0	82,0
560 g ea/ha triclopir	65,0	88,0
1120 g ea/ha triclopir	75,0	92,0
280 g ea/ha fluroxipir	7,0	100,0

560 g ea/ha fluroxipir	25,0	100,0
1120 g ea/ha fluroxipir	37,0	100,0

Ejemplo 10 - AAD-13 (v1) en canola y transformación de otros cultivos

10.1 - Transformación de canola

5 El gen AAD-13 (v1) que confiere resistencia al 2,4-D se puede usar para transformar *Brassica napus* con la transformación mediada por *Agrobacterium* usando PAT como un marcador seleccionable.

Se esterilizó la superficie de las semillas con lejía comercial al 10% durante 10 minutos y se aclararon 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas se pusieron en medio basal MS a mitad de concentración y se mantuvieron en régimen de crecimiento ajustado a 25°C, y un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad.

10 Se cortarán segmentos de hipocótilo (3-5 m) de plántones de 5-7 días de edad y se pondrán en medio de inducción de callo K1D1 (medio MS con kinetina 1 mg/l y 2,4-D 1 mg/l) durante 3 días como pretratamiento. Después los segmentos se transferirán a una placa petri tratada con la cepa de *Agrobacterium* Z707S o LBA4404 que contiene pDAB3759. El *Agrobacterium* se cultivará durante la noche a 28°C en la oscuridad en un agitador a 150 rpm y posteriormente se volverá a suspender en el medio de cultivo.

15 Después de 30 min de tratamiento de los segmentos de hipocótilo con *Agrobacterium*, estos se pondrán de nuevo en el medio de inducción de callo durante 3 días. Después de cocultivo, los segmentos se pondrán en K1D1TC (medio de inducción de callo que contiene carbenicilina 250 mg/l y timentina 300 mg/l) durante una semana o dos semanas de recuperación. Alternativamente, los segmentos se pondrán directamente en medio de selección K1D1H1 (el medio anterior con Herbiace 1 mg/l). Los antibióticos carbenicilina y timentina se usarían para matar la *Agrobacterium*. El agente de selección Herbiace permite el crecimiento de las células transformadas.

20 Los segmentos de hipocótilos del callo se pondrán en medio de regeneración de brote B3Z1H1 (medio MS, bencilaminopurina 3 mg/l, zeatina 1 mg/l, MES 0,5 gm/l [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico], nitrato de plata 5 mg/l, Herbiace 1 mg/l, carbenicilina y timentina). Después de 2-3 semanas se regeneran los brotes y los segmentos de hipocótilo junto con los brotes se transfieren a medio B3Z1H3 (medio MS, bencilaminopurina 3 mg/l, zeatina 1 mg/l, MES 0,5 gm/l [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico], nitrato de plata 5 mg/l, Herbiace 3 mg/l, carbenicilina y timentina) durante otras 2-3 semanas.

30 Los brotes se cortarían de los segmentos de hipocótilos y se transferirían a medio de alargamiento de brote MESH5 o MES10 (MS, MES 0,5 gm/l, Herbiace 5 o 10 mg/l, carbenicilina, timentina) durante 2-4 semanas. Los brotes alargados se cultivan para la inducción de raíces en MSI.1 (MS con ácido indolbutírico 0,1 mg/l). Una vez que las plantas tienen el sistema de raíces bien establecido, estas se trasplantarán al suelo. Las plantas se aclimatan en condiciones ambientales controladas en Conviron durante 1-2 semanas antes de la transferencia al invernadero.

10.2 - Transformación con *Agrobacterium* de otros cultivos

A la luz de la presente descripción, se pueden transformar cultivos adicionales de acuerdo con la presente invención usando técnicas que son conocidas en la materia.

35 Se dan a continuación los nombres en latín de estas y otras plantas. Debe quedar claro que se pueden usar estas y otras (no tipo *Agrobacterium*) técnicas de transformación para transformar con AAD-13 (v1), por ejemplo en estas y otras plantas, que incluyen, pero no se limitan a maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum* spp.), arroz (*Oryza* spp. y *Zizania* spp.), cebada (*Hordeum* spp.), algodón (*Abroma augusta* y *Gossypium* spp.), soja (*Glycine max*), remolachas de azúcar y de mesa (*Beta* spp.), caña de azúcar (*Arenga pinnata*), tomate (*Lycopersicon esculentum* y otras spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* y otras spp., y *Cyphomandra betacea*), patata (*Solanum tuberosum*), batata (*Ipomoea batatas*), centeno (*Secale* spp.), pimientos (*Capsicum annuum*, *sinense*, y *frutescens*), lechuga (*Lactuca sativa*, *perennis*, y *pulchella*), col (*Brassica* spp), apio (*Apium graveolens*), berenjena (*Solanum melongena*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), sorgo (todas las especies de *Sorghum*), alfalfa (*Medicago sativa*), zanahoria (*Daucus carota*), judías (*Phaseolus* spp. y otros géneros), avenas (*Avena sativa* y *strigosa*), guisantes (*Pisum*, *Vigna*, y *Tetragonolobus* spp.), girasol (*Helianthus annuus*), calabacín (*Cucurbita* spp.), pepino (*Cucumis sativa*), tabaco (*Nicotiana* spp.), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), césped (*Lolium*, *Agrostis*, *Poa*, *Cynodon*, y otros géneros), trébol (*Tifolium*), alverja (*Vicia*). Dichas plantas con genes AAD-13 (v1), por ejemplo, están incluidas en la presente invención.

50 AAD-13 (v1) tiene el potencial de aumentar la aplicabilidad de herbicidas auxínicos clave para el uso en la temporada en muchos sistemas de cultivo de madera caducifolios y de hoja perenne. Las especies de madera resistentes a triclopir, 2,4-D, y/o fluroxipir aumentarían la flexibilidad del uso excesivo de estos herbicidas sin problemas de daños. Estas especies incluirían, pero no se limitan a: aliso (*Alnus* spp.), fresnos (*Fraxinus* spp.), especies de chopos y álamos (*Populus* spp.), haya (*Fagus* spp.), abedul (*Betula* spp.), cerezo (*Prunus* spp.),

eucalipto (*Eucalyptus* spp.), nogal (*Carya* spp.), arce (*Acer* spp.), roble (*Quercus* spp.), y pino (*Pinus* spp.). El uso de resistencia a auxinas para el control selectivo de malas hierbas en especies ornamentales y de frutas, también está dentro del alcance de esta invención. Los ejemplos podrían incluir, pero no se limitan a, rosa (*Rosa* spp.), bonetero (*Euonymus* spp.), petunia (*Petunia* spp.), begonia (*Begonia* spp.), rododendro (*Rhododendron* spp.), manzano silvestre o manzano (*Malus* spp.), peral (*Pyrus* spp.), melocotonero (*Prunus* spp.), y tagetes (*Tagetes* spp.).

Ejemplo 11 - Evidencia adicional de resultados sorprendentes AAD-13 frente a AAD-2

Semillas de *Arabidopsis* T₁ recién recogidas transformadas con un gen AAD-13 (v1) optimizado para planta o AAD-2 (v1) natural (véase el documento WO/2005/107437) se plantaron y se seleccionaron por la resistencia al glufosinato como se ha descrito previamente. Después, las plantas se asignaron aleatoriamente a diferentes tasas de 2,4-D (50-3200 g ea/ha). Las aplicaciones de herbicidas se hicieron con pulverizador de surco con un volumen de pulverización de 187 l/ha. El 2,4-D usado era la formulación comercial de sal de dimetilamina (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO) mezclada con tampón de Tris 200 mM (pH 9,0) o tampón de HEPES 200 mM (pH 7,5).

AAD-13 (v1) y AAD-2 (v1) proporcionaron resistencia detectable al 2,4-D frente a las líneas de control transformadas y no transformadas; sin embargo, los individuos variaban en su capacidad para impartir resistencia al 2,4-D a plantas de *Arabidopsis* T₁ individuales. Sorprendentemente, los transformantes de AAD-2 (v1) y AAD-2 (v2) eran bastante menos resistentes al 2,4-D que el gen AAD-13 (v1), todos de una frecuencia de plantas muy tolerantes, así como de daño medio general. No sobrevivieron plantas transformadas con AAD-2 (v1) a 200 g ea/ha de 2,4-D, relativamente dañadas (<20% de daño visual), y el daño general de la población era 83% (véase el documento PCT/US2005/014737). En cambio, AAD-13 (v1) tenía una media de daño de la población de aproximadamente 15% cuando se trataron con 2.240 g ea/ha de 2,4-D (Tabla 11). La comparación de los genes optimizados para plantas tanto AAD-13 como AAD-2 indica una ventaja significativa para AAD-13 (v1) en la planta.

Estos resultados son inesperados dado que la comparación in vitro de AAD-2 (v1) (documento WO/2005/107437) y AAD-13 (v2) indicaba que ambos eran muy eficaces en la degradación de 2,4-D y ambos compartían una especificidad de tipo S con respecto a sustratos de ariloxialcanoato quirales. AAD-2 (v1) es expresada en plantas T₁ individuales en diferentes niveles; sin embargo, esta proteína expresada proporciona poca protección del daño por 2,4-D. No eran evidentes diferencias sustanciales en el nivel de expresión de proteínas (en la planta) para los genes naturales y optimizados para la planta (véase el documento WO/2005/107437). Estos datos corroboran descubrimientos anteriores que hacen la expresión funcional de AAD-13 (v1) en la planta, y la resistencia a herbicida resultante al 2,4-D y herbicidas de piridiloxiacetato seleccionados, es inesperada.

Ejemplo 12 - Aplicaciones de efecto quemado antes de plantar

Este y los siguientes ejemplos son ejemplos específicos de nuevos usos de herbicidas hechos posibles por AAD-13 de la presente invención.

Las aplicaciones de herbicidas de efecto quemado antes de plantar están previstas para matar malas hierbas que han brotado a lo largo del invierno o a principios de la primavera antes de plantar un cultivo dado. Típicamente, estas aplicaciones se aplican en sistemas de gestión sin labranza o con labranza reducida donde la eliminación de las malas hierbas no es completa antes de la plantación. Por lo tanto, un programa herbicida debe controlar un espectro muy amplio de malas hierbas de hoja ancha y maleza presente en el momento de la plantación. El glifosato, gramoxone y glufosinato son ejemplos de herbicidas no selectivos, no residuales usados para aplicaciones herbicidas de efecto quemando antes de plantar. Sin embargo, algunas malas hierbas son difíciles de controlar en este momento de la temporada debido a uno o más de lo siguiente: insensibilidad inherente de la especie de mala hierba o biotipo al herbicida, malas hierbas anuales de invierno y condiciones de tiempo frío que limitan la absorción y actividad del herbicida. Hay varias opciones de herbicidas disponibles para mezclar en tanque con estos herbicidas, para aumentar el espectro y la actividad sobre las malas hierbas donde los herbicidas no selectivos son débiles. Un ejemplo sería aplicaciones de mezcla en tanque del 2,4-D con glifosato para ayudar a controlar *Conyza canadensis* (erigero del Canadá). El glifosato se puede usar de 420 a 1680 g ea/ha, más típicamente de 560 a 840 g ea/ha, para el control por efecto quemado antes de plantar de la mayoría de las malas hierbas presentes; sin embargo, se pueden aplicar, 280 - 1120 g ea/ha de 2,4-D para ayudar a controlar muchas especies de malas hierbas de hoja ancha (p. ej., erigero del Canadá). El 2,4-D es un herbicida de elección debido a que es eficaz en una amplia variedad de malas hierbas de hoja ancha, eficaz incluso a bajas temperaturas y extremadamente barato. Sin embargo, si el siguiente cultivo es un cultivo de dicotiledónea sensible, los residuos de 2,4-D en el suelo (aunque de vida de corta) pueden tener un impacto negativo en el cultivo. Las soja son un cultivo sensible y requieren que pase un periodo de tiempo mínimo de 7 días (para una tasa de 2,4-D de 280 g ea/ha) a al menos 30 días (para aplicaciones de 2,4-D de 1120 g ea/ha) entre aplicaciones de efecto quemado y la plantación. El 2,4-D está prohibido como tratamiento de efecto quemado antes de plantar algodón (véanse las etiquetas federales, la mayoría están disponibles por CPR, 2005 o en internet en cdms.net/manuf/manuf.asp). Con el algodón o la soja transformados con AAD-13 (v1), estos cultivos podrían sobrevivir a los restos de 2,4-D en el suelo de aplicaciones de efecto quemado, aplicadas hasta e incluso después de plantar antes de brotación del cultivo. La mayor flexibilidad y menor coste de las parejas de mezcla en tanque (o premezcla comercial), mejorará las opciones de control y aumentará la robustez de las aplicaciones de efecto quemado en situaciones importantes sin labranza o con labranza reducida. Este ejemplo es una de las muchas opciones que estarán disponibles. Los expertos en la

técnica del control de las malas hierbas apreciarán una variedad de otras aplicaciones, que incluyen, pero no se limitan a gramoxone + 2,4-D o glufosinato + 2,4-D usando productos descritos en las etiquetas de herbicidas federales (CPR, 2005) y los usos descritos en la Agrilience Crop Protection Guide (2005), como ejemplos. Los expertos en la técnica también reconocerán que el ejemplo anterior se puede aplicar a cualquier cultivo sensible al 2,4-D (u otro herbicida auxínico de fenoxi) que estaría protegido por el gen *AAD-13 (v1)* si se ha transformado establemente. Igualmente, la propiedad única de la *AAD-13* que permite la degradación del fluroxipir aumenta la utilidad permitiendo la sustitución o mezclas en tanque de 35-560 g ea/ha de fluroxipir para aumentar el espectro y/o aumentar la capacidad de control de especies de malezas perennes o anuales.

Ejemplo 13 - Uso en el cultivo de herbicidas auxínicos en sojas, algodón y otros cultivos de dicotiledóneas transformados solo con *AAD-13 (v1)*

AAD-13 (v1) puede permitir el uso de herbicidas auxínicos de fenoxi (p. ej., 2,4-D y MCPA) y auxinas de piridiloxi (fluroxipir) para el control de una amplia variedad de malas hierbas de hoja ancha directamente en cultivos normalmente sensibles al 2,4-D. La aplicación de 280 a 2240 g ea/ha de 2,4-D controlaría la mayor parte de especies de malas hierbas de hoja ancha en entornos agrícolas. Más típicamente, se usan 560 - 1120 g ea/ha. Para el fluroxipir, las tasas de aplicación típicamente estarían en el intervalo de 35-560 g ea/ha, más típicamente 70-280 ae/ha.

Una ventaja de esta herramienta adicional es el coste extremadamente bajo del componente herbicida de hoja ancha y el potencial control de malas hierbas residual de vida corta proporcionado por tasas mayores de 2,4-D y fluroxipir cuando se usan en tasas más altas, mientras que un herbicida no residual como el glifosato no proporcionaría control a las semillas que germinan más tarde. Esta herramienta también proporciona un mecanismo para combinar modos de acción herbicidas con la conveniencia de HTC como una resistencia a herbicidas integrada y estrategia de gestión de desplazamiento de malas hierbas.

Una ventaja adicional que proporciona esta herramienta es la capacidad de mezclar en tanque una amplia variedad de herbicidas de control de malas hierbas de hoja ancha (p. ej., 2,4-D y fluroxipir) con herbicidas residuales de control de malas hierbas usados habitualmente. Estos herbicidas típicamente se aplican antes de o en la plantación, pero a menudo son menos eficaces en malas hierbas que han brotado, establecidas que pueden existir en el campo antes de la plantación. Ampliando la utilidad de estos herbicidas auxínicos de ariloxi para incluir las aplicaciones en la planta, post-brotación o pre-plantación, aumenta la flexibilidad de los programas residuales de control de malas hierbas. Un experto en la técnica reconocerá que el programa de herbicidas residuales diferirá basándose en el cultivo de interés, pero los programas típicos incluirían herbicidas de las familias de herbicidas de cloracetamida y dinitroanilina, pero también incluyen herbicidas tales como clomazona, sulfentrazona, y una variedad de herbicidas inhibidores de ALS, inhibidores de PPO e inhibidores de HPPD.

Beneficios adicionales podrían incluir la tolerancia a 2,4-D o fluroxipir requerida antes de plantar después de la aplicación del herbicida auxínico de ácido ariloxiacético (véase el ejemplo previo); y menos problemas por daño de contaminación a cultivos de dicotiledóneas que resultan de la limpieza incompleta de los tanques que han contenido 2,4-D o fluroxipir. Dicamba, R-diclorprop, y muchos otros herbicidas todavía se pueden usar para el posterior control de plantas de regeneración natural en cultivos de dicotiledóneas transformadas con *AAD-13 (v1)*.

Los expertos en la técnica reconocerán también que el ejemplo anterior se puede aplicar a cualquier cultivo sensible al 2,4-D (o herbicida auxínico de ariloxi) que estaría protegido por el gen *AAD-13 (v1)* si es transformado establemente. Un experto en la técnica del control de malas hierbas ahora reconocerá que el uso de diferentes herbicidas auxínicos de fenoxi o piridiloxi comerciales solos o en combinación con un herbicida, está permitido por la transformación por *AAD-13 (v1)*. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de estos productos químicos se pueden determinar por las etiquetas de los herbicidas recopiladas en el libro CPR (*Crop Protection Reference*) o recopilaciones similares o cualquier referencia de protección de cultivos comercial o académica tal como la *Crop Protection Guide* de Agrilience (2005). Cualquier herbicida alternativo permitido para usar en HTC por el *AAD-13 (v1)*, usado solo, mezclado en tanque o de forma secuencial, se considera que está dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 14 - Uso en cultivo de herbicidas auxínicos de fenoxi y auxínicos de piridiloxi en maíz, arroz y otras especies de monocotiledóneas transformadas solo con *AAD-13 (v1)*

De una forma análoga, la transformación de especies de hierbas (tales como, pero no limitado a maíz, arroz, trigo, cebada o césped y pastos) con *AAD-13 (v1)* permitiría el uso de auxinas de fenoxi y piridiloxi muy eficaces en cultivos donde la selectividad normal no está clara. La mayoría de las especies de hierbas tienen una tolerancia natural a los herbicidas auxínicos tales como las auxinas de fenoxi (es decir, 2,4-D). Sin embargo, un nivel relativamente bajo de selectividad del cultivo ha producido una menor utilidad en estos cultivos debido a la ventana de periodo de aplicación acortada o riesgo de daño inaceptable. Los cultivos de monocotiledóneas transformados con *AAD-13 (v1)*, por lo tanto, permiten el uso de una combinación similar de tratamientos descritos para los cultivos de dicotiledóneas tales como la aplicación de 280 a 2240 g ea/ha de 2,4-D para controlar la mayoría de las especies de malas hierbas de hoja ancha. Más típicamente, se usan 560 - 1120 g ea/ha. Para el fluroxipir, las tasas de aplicación típicamente estarían en el intervalo de 35-560 g ea/ha, más típicamente 70-280 ae/ha.

Una ventaja de esta herramienta adicional es el coste extremadamente bajo del componente herbicida de hoja ancha y el potencial control de malas hierbas residual de vida corta con tasas mayores de 2,4-D y fluroxipir. En cambio, un herbicida no residual como el glifosato no proporcionaría control a las semillas que germinan más tarde. Esta herramienta también proporcionaría un mecanismo para rotar modos de acción herbicidas con la conveniencia de HTC como una resistencia a herbicidas integrada y estrategia de gestión de desplazamiento de malas hierbas en una estrategia de combinación de cultivo tolerante a glifosato/HTC con AAD-13 (v1), se roten o no especies de cultivos.

Una ventaja adicional que proporciona esta herramienta es la capacidad de mezclar en tanque una amplia variedad de herbicidas de control de malas hierbas de hoja ancha (p. ej., 2,4-D y fluroxipir) con herbicidas residuales de control de malas hierbas usados habitualmente. Estos herbicidas típicamente se aplican antes de o en la plantación, pero a menudo son menos eficaces en malas hierbas que han brotado, establecidas que pueden existir en el campo antes de la plantación. Ampliando la utilidad de estos herbicidas auxínicos de ariloxi para incluir las aplicaciones en la planta, post-brotación o pre-plantación, aumenta la flexibilidad de los programas residuales de control de malas hierbas. Un experto en la técnica reconocerá que el programa de herbicidas residuales diferirá basándose en el cultivo de interés, pero los programas típicos incluirían herbicidas de las familias de herbicidas de cloracetamida y dinitroanilina, pero también incluyen herbicidas tales como clomazona, sulfentrazona, y una variedad de herbicidas inhibidores de ALS, inhibidores de PPO e inhibidores de HPPD.

La mayor tolerancia del maíz, arroz y otras monocotiledóneas a las auxinas de fenoxi o piridiloxi permitirá el uso de estos herbicidas en cultivo sin restricciones de la fase de crecimiento o potencial inclinación del cultivo; fenómenos de despliegue tales como en "cola de rata", fragilidad del tallo inducido por reguladores del crecimiento en el maíz, o raíces de refuerzo deformadas. Cada herbicida alternativo permitido para usar en HTC por el AAD-13 (v1), usado solo, mezclado en tanque o de forma secuencial, se considera que está dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 15 - AAD-13 (v1) apilado con rasgo de tolerancia al glifosato en cualquier cultivo

La amplia mayoría de acres de algodón, canola, maíz y soja plantados en América del Norte contienen un rasgo de tolerancia al glifosato (GT), y aumenta la adopción de maíz con GT. Se han desarrollado cultivos con GT adicionales (p. ej., trigo, arroz, remolacha azucarera y césped) pero hasta la fecha no se han comercializado. Muchas otras especies resistentes al glifosato están en etapa de desarrollo experimental (p. ej., alfalfa, caña de azúcar, girasol, remolacha, guisantes, zanahoria, pepino, lechuga, cebolla, fresa, tomate y tabaco; especies forestales como el álamo y el liquidámbar; y especies hortícolas como caléndula, petunia y begonias; isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005 en internet). Los GTC son herramientas valiosas por la amplitud de malas hierbas controlada y la conveniencia y eficacia de coste proporcionado por este sistema. Sin embargo, la utilidad del glifosato como un tratamiento de base ahora estándar está seleccionando las malas hierbas resistentes al glifosato. Además, las malas hierbas en las que el glifosato es inherentemente menos eficaz producen desplazamiento a las especies dominantes en los campos donde se han estado practicando programas químicos solo con glifosato. Mediante el apilamiento de AAD-13 (v1) con un rasgo de GT, sea por reproducción convencional o junto con suceso de transformación nuevo, se podría mejorar la eficacia del control de malas hierbas, la flexibilidad y la capacidad para gestionar los desplazamientos de malas hierbas y el desarrollo de resistencia a herbicidas. Como se ha mencionado en ejemplos previos, mediante cultivos que se transforman con AAD-13 (v1), los cultivos de monocotiledóneas tendrán un margen mayor de seguridad frente a auxinas de fenoxi o piridiloxi, y las auxinas de fenoxi se pueden aplicar selectivamente en cultivos de dicotiledóneas. Se pueden prever varios escenarios de opciones de control mejorado de malas hierbas donde el AAD-13 (v1) y un rasgo de GT están apilados en cualquier especie de cultivo de monocotiledónea o dicotiledónea:

a) El glifosato se puede aplicar con una tasa de aplicación post-brotación estándar (de 420 a 2160 g ea/ha, preferiblemente de 560 a 840 g ea/ha) para el control de la mayoría de las especies de hierbas y malas hierbas de hoja ancha. Para el control de las malas hierbas de hoja ancha resistentes al glifosato como *Conyza canadensis* o malas hierbas inherentemente difíciles de controlar con el glifosato (p. ej., *Commelina* spp, *Ipomoea* spp, etc.), se pueden aplicar 280-2240 g ea/ha (preferiblemente 560-1120 g ea/ha) de 2,4-D de forma secuencial, mezclado en tanque o como una premezcla con glifosato para proporcionar control eficaz. Para el fluroxipir, las tasas de aplicación típicamente estarían en el intervalo de 35-560 g ea/ha, más típicamente 70-280 ae/ha.

b) Actualmente, las tasas de glifosato aplicadas en GTC en general están en el intervalo de 560 a 2240 g ea/ha por periodo de aplicación. El glifosato es mucho más eficaz en especies de hierbas que en especies de malas hierbas de hoja ancha. Los rasgos apilados de AAD-13 (v1) + GT permitirían tasas eficaces para las hierbas de glifosato (105-840 g ea/ha, más preferiblemente 210-420 g ea/ha). El 2,4-D (con 280-2240 g ea/ha, más preferiblemente 560-1120 g ea/ha) se podría aplicar entonces de forma secuencial, mezclado en tanque o como una premezcla con tasas de aplicación de glifosato eficaces para hierbas para proporcionar el necesario control de malas hierbas de hoja ancha. El fluroxipir con las tasas mencionadas antes sería un componente aceptable en el régimen de tratamiento. La tasa baja de glifosato también proporcionaría algún beneficio en el control de malas hierbas de hoja ancha; sin embargo, el control principal sería por el 2,4-D o fluroxipir.

Un experto en la técnica de control de malas hierbas reconocerá que el uso de uno o más herbicidas auxínicos de ariloxi comerciales solos o en combinación (de forma secuencial o independiente) está permitido por la

transformación con *AAD-13 (v1)* en los cultivos. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de estos productos químicos se puede determinar por las etiquetas de los herbicidas recopiladas en el libro CPR (*Crop Protection Reference*) o recopilaciones similares, etiquetas recopiladas en internet (p. ej., cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier referencia de protección de cultivos comercial o académica tal como la *Crop Protection Guide* de Agrilience (2005). Cualquier herbicida alternativo permitido para usar en HTC por el *AAD-13 (v1)*, usado solo, mezclado en tanque o de forma secuencial, se considera que está dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 16 - *AAD-13 (v1)* apilado con el rasgo de tolerancia al glufosinato en cualquier cultivo

La tolerancia al glufosinato (*PAT*, *bar*) está actualmente presente en una serie de cultivos plantados en América del Norte sea como marcador seleccionable para un rasgo introducido como proteínas de resistencia a insectos o específicamente como un rasgo de HTC. Los cultivos incluyen, pero no se limitan a canola, maíz y algodón resistentes a glufosinato. Se han estado desarrollando cultivos adicionales tolerantes al glufosinato (p. ej., arroz, remolacha de azúcar, soja y césped) pero hasta la fecha no se ha comercializado ninguno. El glufosinato, como el glifosato, es un herbicida de hierbas y malas hierbas de hoja ancha de amplio espectro, relativamente no selectivo. El modo de acción del glufosinato difiere de la del glifosato. Es de acción más rápida, dando como resultado la desecación y “quemado” de las hojas tratadas 24-48 horas después de la aplicación del herbicida. Esto es ventajoso para el aspecto del control rápido de malas hierbas. Sin embargo, esto también limita la traslocación del glufosinato a regiones meristémicas de las plantas objetivo dando como resultado un control peor de las malas hierbas, como se pone de manifiesto por las tasas relativas de rendimiento de control de malas hierbas de los dos componentes en muchas especies (Agrilience, 2005).

Mediante el apilamiento de *AAD-13 (v1)* con un rasgo de tolerancia al glufosinato, sea por reproducción convencional o junto con suceso de transformación nuevo, se podría mejorar la eficacia del control de malas hierbas, la flexibilidad y la capacidad para gestionar los desplazamientos de malas hierbas y el desarrollo de resistencia a herbicidas. Se pueden prever varios escenarios de opciones de control mejorado de malas hierbas donde el *AAD-13 (v1)* y un rasgo de tolerancia al glufosinato están apilados en cualquier especie de cultivo de monocotiledónea o dicotiledónea:

a) El glufosinato se puede aplicar con una tasa de aplicación post-brotación estándar (de 200 a 1700 g ea/ha, preferiblemente de 350 a 500 g ea/ha) para el control de la mayoría de las especies de hierbas y malas hierbas de hoja ancha. Hasta la fecha no se han confirmado malas hierbas no resistentes al glufosinato; sin embargo, el glufosinato tiene un mayor número de malas hierbas que son inherentemente más tolerantes que para el glifosato.

i) Especies de malas hierbas de hoja ancha inherentemente tolerantes (p. ej., *Cirsium arvensis*, *Apocynum cannabinum*, y *Conyza canadensis*) se podrían controlar por mezcla en tanque de 280-2240 g ea/ha, más preferiblemente 560-2240 g ea/ha, de 2,4-D para el control eficaz de estas especies perennes de control más difícil, y mejorar la robustez del control en especies de malas hierbas de hoja ancha anuales. El fluroxipir sería un componente aceptable para considerar en el régimen de control de malas hierbas. Para el fluroxipir, las tasas de aplicación típicamente estarían en el intervalo de 35-560 g ea/ha, más típicamente 70-280 ae/ha.

b) Una combinación múltiple de glufosinato (200-500 g ea/ha) +/- 2,4-D (280-1120 g ea/ha) +/- fluroxipir (con las tasas citadas antes), por ejemplo, podría proporcionar un espectro de control de malas hierbas que se solapa, más robusto. Además, el espectro que se solapa proporciona un mecanismo adicional para la gestión o retraso de las malas hierbas resistentes a herbicida.

Un experto en la técnica de control de malas hierbas reconocerá que el uso de uno o más herbicidas auxínicos ariloxiacéticos comerciales solos o en combinación (de forma secuencial o independiente) está permitido por la transformación con *AAD-13 (v1)* en los cultivos. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de estos productos químicos se puede determinar por las etiquetas de los herbicidas recopiladas en el libro CPR (*Crop Protection Reference*) o recopilaciones similares, etiquetas recopiladas en internet (p. ej., cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía de protección de cultivos comercial o académica tal como la *Crop Protection Guide* de Agrilience (2005). Cualquier herbicida alternativo permitido para usar en HTC por el *AAD-13 (v1)*, usado solo, mezclado en tanque o de forma secuencial, se considera que está dentro del alcance de esta invención.

La presente invención incluye, por lo tanto, una planta transgénica (y células de planta) que comprenden un gen *AAD-13 (v1)* de la presente invención “apilado” con un gen *DSM-2* del documento WO/2008/070845 (presentado el 7 de diciembre, 2007). Dichos genes *DSM-2* incluyen la SEQ ID NO: 1 y 3 de esta solicitud. Estos genes codifican las proteínas que comprenden las SEQ ID NO: 2 y 4 de esta solicitud. Además también, se pueden incluir genes de tolerancia a herbicida adicionales en “apilamientos” múltiples que comprenden tres o más de dichos genes.

Ejemplo 17 - *AAD-13 (v1)* apilado con el rasgo *AAD-1 (v3)* en cualquier cultivo

Las plantas homocigóticas para *AAD-13 (v1)* y *AAD-1 (v3)* (véase el documento WO/2005/107437 para este último) se pueden cruzar recíprocamente y recoger las semillas F_1 . Las semillas F_1 de dos cruces recíprocos de cada gen se estratificaron y se trataron 4 repeticiones de cada cruce en el mismo régimen de pulverización usado para los

otros ensayos con uno de los siguientes tratamientos: 70, 140, 280 g ea/ha de fluroxipir (selectivo para el gen *AAD-12* (*v1*)); 280, 560, 1120 g ea/ha de R-dicloroprop (selectivo para el gen *AAD-1* (*v3*)); o 560, 1120, 2240 g ea/ha de 2,4-D DMA (para confirmar la tolerancia a 2,4-D). Las plantas homocigóticas *T₂* para cada gen también se plantaron para usar como controles. Las plantas se clasificaron en 3 y 14 DAT. Los resultados de pulverización se muestran en la tabla 24.

Los resultados confirman que *AAD-13* (*v1*) puede apilarse satisfactoriamente con *AAD-1* (*v3*), aumentando así el espectro de herbicidas que se pueden aplicar al cultivo de interés (ácidos fenoxiacéticos, ácidos fenoxipropiónicos frente a ácidos fenoxiacéticos + ácidos piridiloxiacéticos para *AAD-1* y *AAD-13*, respectivamente). La naturaleza complementaria de los patrones de resistencia cruzada a herbicidas permite el uso conveniente de estos dos genes como marcadores complementarios y de campo seleccionables apilables. En los cultivos donde la tolerancia con un solo gen puede ser marginal, un experto en la técnica reconoce que se puede aumentar la tolerancia apilando un segundo gen de tolerancia para el mismo herbicida. Esto se puede hacer usando el mismo gen con el mismo o diferentes promotores; sin embargo, como se observa aquí el apilamiento y seguimiento de dos rasgos complementarios puede ser facilitado por la protección cruzada distintiva para ácidos fenoxipropiónicos [de *AAD-1* (*v3*)] o ácidos piridiloxiacéticos [de *AAD-13* (*v1*)].

La presente invención incluye por lo tanto una planta transgénica (y células de planta) que comprenden un gen *AAD-13* de la presente invención "apilado" con un gen *AAD-1* del documento WO 2005/107437 (publicado el 17 de noviembre, 2005; WO/2005/107437 (presentado el 2 de mayo, 2005)). Dichos genes *AAD-1* incluyen las SEQ ID NO: 3, 4, 5, y 12 de esta solicitud. Estos genes codifican proteínas que comprenden las SEQ ID NO: 9, 10, 11, y 13 de esta solicitud. Además también, se pueden incluir genes de tolerancia a herbicida adicionales en "apilamientos" múltiples que comprenden tres o más de dichos genes.

Ejemplo 18 - *AAD-13* (*v1*) apilado con el rasgo *AAD-12* (*v1*) en cualquier cultivo

Las plantas homocigóticas para *AAD-13* (*v1*) y *AAD-12* (*v1*) (véase el documento WO 2007/053482 para este último) se pueden cruzar y recoger las semillas *F₁*. Las semillas *F₁* de dos cruces recíprocos de cada gen se pueden sembrar y tratar las plantas *F₁* con el mismo régimen de pulverización usado para los otros ensayos con uno de los siguientes tratamientos: 70, 280, 1120 g ea/ha de fluroxipir (selectivo para el gen *AAD-12* (*v1*)); 70, 280, 1120 g ea/ha de triclorpir (selectivo para el gen *AAD-13* (*v1*)); o 560, 1120, 2240 g ea/ha de 2,4-D DMA (para confirmar la tolerancia a 2,4-D).

AAD-13 (*v1*) puede apilarse satisfactoriamente con *AAD-12* (*v1*), aumentando así el espectro de herbicidas que se pueden aplicar al cultivo de interés (ácidos fenoxiacéticos + triclorpir frente a ácidos fenoxiacéticos + fluroxipir para *AAD-12* y *AAD-13*, respectivamente). La naturaleza complementaria de los patrones de resistencia cruzada a herbicidas permite el uso conveniente de estos dos genes como marcadores complementarios y de campo seleccionables apilables. En los cultivos donde la tolerancia con un solo gen puede ser marginal, un experto en la técnica reconoce que se puede aumentar la tolerancia apilando un segundo gen de tolerancia para el mismo herbicida. Esto se puede hacer usando el mismo gen con el mismo o diferentes promotores; sin embargo, como se observa aquí el apilamiento y seguimiento de dos rasgos complementarios puede ser facilitado por la protección cruzada distintiva para fluroxipir [de *AAD-13* (*v1*)] y triclorpir [de *AAD-12* (*v1*)].

La presente invención incluye por lo tanto una planta transgénica (y células de planta) que comprenden un gen *AAD-13* de la presente invención "apilado" con un gen *AAD-12* del documento WO 2007/053482 (publicado el 10 de mayo, 2007; PCT/US2006/042133 (presentado el 27 de octubre, 2006)). Dichos genes *AAD-12* incluyen las SEQ ID NO: 1, 3 y 5 de esta solicitud. Estos genes codifican proteínas que comprenden las SEQ ID NO: 2 y 4 de esta solicitud. Además también, se pueden incluir genes de tolerancia a herbicida adicionales en "apilamientos" múltiples que comprenden tres o más de dichos genes.

Ejemplo 19 - *AAD-13* (*v1*) apilado con el rasgo *AHAS* en cualquier cultivo

La tolerancia a herbicidas de imidazolinona (*AHAS* y otros) está actualmente presente en una serie de cultivos plantados en América del Norte que incluyen, pero no se limitan a maíz, arroz y trigo. Se han estado desarrollando cultivos tolerantes a imidazolinona adicionales (p. ej., algodón y remolacha de azúcar) pero hasta la fecha no se ha comercializado ninguno. Actualmente se usan muchos herbicidas de imidazolinona (p. ej., imazamox, imazetapir, imazaquin, e imazapic) selectivamente en diferentes cultivos convencionales. El uso de imazetapir, imazamox, y el no selectivo imazapir ha sido posible por los rasgos de tolerancia a imidazolinonas como *AHAS* y otros. Esta clase química también tiene una actividad residual en el suelo significativa, pudiendo proporcionar control de malas hierbas prolongado más allá del periodo de aplicación, a diferencia de los sistemas basados en glifosato o glufosinato. Sin embargo, el espectro de malas hierbas controladas por herbicidas de imidazolinona no es tan amplio como el del glifosato. Además, los herbicidas de imidazolinona tienen un modo de acción (inhibición de la acetolactato sintasa, ALS) al cual han desarrollado resistencia muchas malas hierbas. Mediante el apilamiento de *AAD-13* (*v1*) con un rasgo de tolerancia a imidazolinonas, sea por reproducción convencional o junto con suceso de transformación nuevo, se podría mejorar la eficacia del control de malas hierbas, la flexibilidad y la capacidad para gestionar los desplazamientos de malas hierbas y el desarrollo de resistencia a herbicidas. Como se ha mencionado en ejemplos previos, transformando cultivos con *AAD-13* (*v1*), los cultivos de monocotiledóneas tendrán un margen

mayor de seguridad con auxinas de fenoxi o piridiloxi, y estas auxinas se pueden aplicar selectivamente en cultivos de dicotiledóneas. Se pueden prever varios escenarios de opciones de control mejorado de malas hierbas donde el AAD-13 (v1) y un rasgo de tolerancia a las imidazolinonas están apilados en cualquier especie de cultivo de monocotiledónea o dicotiledónea:

- 5 a) El imazetapir se puede aplicar con una tasa de aplicación post-brotación estándar (de 35 a 280 g ea/ha, preferiblemente 70-140 g ea/ha) para el control de muchas especies de hierbas y malas hierbas de hoja ancha.

- 10 i) Las malas hierbas de hoja ancha resistentes a inhibidores de ALS como *Amaranthus rudis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album*, se podrían controlar con mezcla en tanque de 280-2240 g ea/ha, más preferiblemente 560-1120 g ea/ha, de 2,4-D. Para el fluroxipir, las tasas de aplicación estarían típicamente en el intervalo de 35-560 g ea/ha, más típicamente 70-280 ae/ha.

- ii) Las especies de hoja ancha inherentemente más tolerantes a herbicidas de imidazolinona como *Ipomoea spp.* también se pueden controlar por mezcla en tanque de 280-2240 g ea/ha, más preferiblemente 560-1120 g ea/ha, de 2,4-D. Véanse las tasas anteriores para triclopir o fluroxipir.

- 15 b) Una combinación múltiple de imazetapir (de 35 a 280 g ea/ha, preferiblemente 70-140 g ea/ha) +/- 2,4-D (280-1120 g ea/ha) +/- fluroxipir (con las tasas citadas antes), por ejemplo, podría proporcionar un espectro de control de malas hierbas que se solapa, más robusto. Además, el espectro que se solapa proporciona un mecanismo adicional para la gestión o retraso de las malas hierbas resistentes a herbicida.

20 Un experto en la técnica de control de malas hierbas reconocerá que el uso de cualquiera de diferentes herbicidas de imidazolinona comerciales, herbicidas auxínicos fenoxiacéticos o piridiloxiacéticos comerciales solos o en combinaciones múltiples, está permitido por la transformación con AAD-13 (v1) y apilamiento con cualquier rasgo de tolerancia a imidazolinonas sea por reproducción convencional o modificación genética. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de estos productos químicos se pueden determinar por las etiquetas de los herbicidas recopiladas en el libro CPR (*Crop Protection Reference*) o recopilaciones similares, etiquetas recopiladas en internet (p. ej., cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía de protección de cultivos comercial o académica tal como la *Crop Protection Guide* de Agrilience (2005). Cualquier herbicida alternativo permitido para usar en HTC por el AAD-13 (v1), usado solo, mezclado en tanque o de forma secuencial, se considera que está dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 20 - AAD-13 (v1) apilado con resistencia a insectos (IR) u otros rasgos introducidos en cualquier cultivo

30 La resistencia a insectos en cultivos que tienen un rasgo transgénico está extendida en la producción de maíz y algodón en América del Norte y por todo el mundo. Los productos comerciales que tienen combinados rasgos de IR y HT se han desarrollado en múltiples empresas de semillas. Estos incluyen rasgos de Bt IR (p. ej. toxinas Bt citadas en la página de internet lifesci.sussex.ac.uk, 2006) y cualquiera o todos los rasgos de HTC mencionados antes. El valor de esta oferta es la capacidad para controlar múltiples problemas de plagas por medios genéticos en un solo producto. La conveniencia de este producto estaría restringida si el control de malas hierbas y el control de insectos se llevan a cabo independientemente uno de otro. AAD-13 (v1) solo o apilado con uno o más rasgos adicionales de HTC se puede apilar con uno o más rasgos introducidos adicionales (p. ej., resistencia a insectos, resistencia a hongos o tolerancia al estrés, y otros) (isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005) sea por reproducción convencional o junto con un nuevo suceso de transformación. Los beneficios incluyen la conveniencia y flexibilidad descritas en ejemplos previos junto con la capacidad para manejar plagas de insectos y/u otros estreses agrícolas, además del control de malas hierbas mejorado ofrecido por AAD-13 (v1) y tolerancia a herbicida asociada. Por lo tanto, la presente invención se puede usar para proporcionar un paquete agronómico completo de calidad mejorada del cultivo con la capacidad del control flexible y barato de una serie de problemas agrícolas.

45 Los rasgos combinados de IR y HT tienen aplicación en la mayoría de los cultivos agrícolas y de horticultura/ornamentales y forestales. La combinación de AAD-13 y su tolerancia a herbicidas correspondiente y resistencia a insectos proporcionada por cualquiera de una serie de genes de IR Bt o no Bt, se puede aplicar a especies de cultivo citadas (pero no limitado a) en el ejemplo 13. Un experto en la técnica de control de malas hierbas reconocerá que el uso de cualquiera de diferentes herbicidas comerciales descritos en los ejemplos 18-20, herbicidas auxínicos fenoxiacéticos o piridiloxiacéticos solos o en combinaciones múltiples, está permitido por la transformación con AAD-13 (v1) y apilamiento con el correspondiente rasgo de HT o IR, sea por reproducción convencional o modificación genética. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de estos productos químicos se pueden determinar por las etiquetas de los herbicidas recopiladas en el libro CPR (*Crop Protection Reference*) o recopilaciones similares, etiquetas recopiladas en internet (p. ej., cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía de protección de cultivos comercial o académica tal como la *Crop Protection Guide* de Agrilience (2005). Cualquier herbicida alternativo permitido para usar en HTC por el AAD-13 (v1), usado solo, mezclado en tanque o de forma secuencial, se considera que está dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 21 - AAD-13 (v1) como un marcador seleccionable de dicotiledóneas in vitro

La modificación genética de células, tejidos, órganos vegetales y plantas u orgánulos tales como plástidos, empieza con el procedimiento de insertar genes de interés en las células de plantas usando un método de suministro

adecuado. Sin embargo, cuando un gen se suministra a células de plantas, solo un porcentaje extremadamente pequeño de células integra el gen heterogéneo en su genoma. Con el fin de seleccionar esas pocas células que han incorporado el gen de interés, los investigadores ligan un "gen marcador" seleccionable o cribable al gen de interés (GOI) en el vector. Las células que contienen estos marcadores son identificadas de la población entera de células/tejido al cual se ha suministrado el vector plasmídico de ADN. Seleccionado estas células que expresan el gen marcador, los investigadores pueden identificar esas pocas células que pueden haber incorporado el GOI en el genoma. *AAD-13 (v1)* puede funcionar como un marcador seleccionable cuando se usa como en el ejemplo n° 24 de la solicitud de patente WO 2007/053482 (Wright et al.).

Lista de secuencias

- 10 <110> Lira, Justin M
Snodderley, Erika Megan
Robinson, Andrew E.
Wight, Terry R.
Merlo, Donald J.
- 15 <120> Nuevos genes de resistencia a herbicidas
<130> DAS-142XC1 PCT
<150> 60/928.303
<151> 09-05-2007
<160> 7
- 20 <170> Patent In versión 3.3
<210> 1
<211> 864
<212> ADN
<213> nucleótido natural
- 25 <400> 1
atgtcacccg ccttcgacat cgccccgctc gacgccacgt tggcgccgt cgtcacccggc 60
gtgaagctcg ccgatctcga t gatgccgga tggctcgacc tgcaggctgc ctggctcgag 120
tacgcactcc t cgttttccc cgatcagcat ctcaagcgcg agcagcagat cgcctttgcc 180
cgtcgcttcg ggccactcga gttcgagatg gccgcgatca gcaacgtgcg gcccgacggc 240
agcctgcggg tgcagagcga caacgacgac atgatgaaga t cctgaaggg caacatgggc 300
tggcatgccg acagcaccta catgccggtc caggccaagg gcgcggtgtt cagtgccgaa 360
gtggttccat a gcgtcggcgg ccagaccggc ttgcgcgaca tgcgcgcggc ctacgacgcg 420
ctcgacgagg atctgaaggg gcgcgtcgag acgctgcagg cccggcactc gctgcattac 480
agccagt cga agctcggcca ccagaccaag gcggccgacg gtgaatat ag cggctacggg 540
ctgcatgacg ggccgggtgcc gctgcggccg ctggtgaaga tccatcccga gaccggccgc 600
aagtgcgtgc t gatcggccg ccacgcccac gccattcccg gcttggagcc agccgagtcc 660
gaacgcttgc tgcagcagct gatcgacttc gcctgccagc cgccgcgaat ctatcatcac 720
gactgggcgc cgggcgacgc cgtgctgtgg gacaatcgct gcctgctgca ccaggcgacg 780
ccgtgggaca tgacccagaa gcgcatcatg tggcacagcc gcatcgccgg cgacccggcc 840
agcgagaccg cgctggcgca ttga 864
<210> 2
<211> 287
<212> PRT
30 <213> nucleótido natural
<400> 2

ES 2 621 919 T3

Met Ser Pro Ala Phe Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ala Thr Phe Gly Ala
1 5 10 15

Val Val Thr Gly Val Lys Leu Ala Asp Leu Asp Asp Ala Gly Trp Leu
20 25 30

Asp Leu Gln Ala Ala Trp Leu Glu Tyr Ala Leu Leu Val Phe Pro Asp
35 40 45

Gln His Leu Thr Arg Glu Gln Gln Ile Ala Phe Ala Arg Arg Phe Gly
50 55 60

Pro Leu Glu Phe Glu Met Ala Ala Ile Ser Asn Val Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ser Leu Arg Val Glu Ser Asp Asn Asp Asp Met Met Lys Ile Leu Lys
85 90 95

Gly Asn Met Gly Trp His Ala Asp Ser Thr Tyr Met Pro Val Gln Ala
100 105 110

Lys Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val Pro Ser Val Gly Gly Gln
115 120 125

Thr Gly Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Glu Asp
130 135 140

Leu Lys Ala Arg Val Glu Thr Leu Gln Ala Arg His Ser Leu His Tyr
145 150 155 160

Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Gln Thr Lys Ala Ala Asp Gly Glu Tyr
165 170 175

Ser Gly Tyr Gly Leu His Asp Gly Pro Val Pro Leu Arg Pro Leu Val
180 185 190

Lys Ile His Pro Glu Thr Gly Arg Lys Ser Leu Leu Ile Gly Arg His
195 200 205

Ala His Ala Ile Pro Gly Leu Glu Pro Ala Glu Ser Glu Arg Leu Leu
210 215 220

Gln Gln Leu Ile Asp Phe Ala Cys Gln Pro Pro Arg Ile Tyr His His
225 230 235 240

Asp Trp Ala Pro Gly Asp Ala Val Leu Trp Asp Asn Arg Cys Leu Leu
245 250 255

His Gln Ala Thr Pro Trp Asp Met Thr Gln Lys Arg Ile Met Trp His
260 265 270

Ser Arg Ile Ala Gly Asp Pro Ala Ser Glu Thr Ala Leu Ala His
275 280 285

<210> 3

<211> 867

<212> ADN

<213> optimizado para planta (v1)

<400> 3

ES 2 621 919 T3

```

atggcttcac ctgccctcga catcggccca cttgatgcc catctggggc agtctgtcact 60
gggggtcaagt tggctgatct tcatgacgct ggatggctgg acctccaagc tgcctggctt 120
gaatatgccc tctctgtctt cctgaccag cacttgacaa gggaacagca aatagctttc 180
gctcgcagat tccgaccact tgagtctgag atggcagcca tctccaatgt tagaccgat 240
ggcagcttga gggcttgagtc tgacaatgat gacatgatga agatcctcaa aggcaacatg 300
ggatggcacg ctgacagcac ctacatgcc gtgcaagcaa aggggtgcagt gttctcagct 360
gaagtggctc cctctgtggg tggccagact ggttttgctg acatgagagc tgcctatgat 420
gcacttgatg aagacttgaa ggctcgtgtc gagacattgc aagcccgta ctccctccat 480
tactcccaga gcaagctcgg acaccagacc aaggctgcag atggtagtga ctctggttat 540
ggcctccatg atgggctgt tcccttgagg ccacttgatga agatccatcc agagactggc 600
agaaaatccc tctctcatagg ccgtcatgcc catgccattc ctggattgga gccagctgag 660
tcagaaaggt tgcctcagca actcatgat ttgcttgtc aacccctag gatctaccac 720
catgactggg ctctggaga tgcagtgtc tgggacaacc gctgcctcct tcaccaagcc 780
actcctggg acatgacca gaaacgcac atgtggcaca gccgcattgc tggtagccca 840
gcatctgaga ccgcacttgc acattga 867

```

<210> 4

<211> 288

<212> PRT

5 <213> optimizado para planta (v1)

<400> 4

```

Met Ala Ser Pro Ala Phe Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ala Thr Phe Gly
1 5 10 15

Ala Val Val Thr Gly Val Lys Leu Ala Asp Leu Asp Asp Ala Gly Trp
20 25 30

Leu Asp Leu Gln Ala Ala Trp Leu Glu Tyr Ala Leu Leu Val Phe Pro
35 40 45

Asp Gln His Leu Thr Arg Glu Gln Gln Ile Ala Phe Ala Arg Arg Phe
50 55 60

Gly Pro Leu Glu Phe Glu Met Ala Ala Ile Ser Asn Val Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ser Leu Arg Val Glu Ser Asp Asn Asp Asp Met Met Lys Ile Leu
85 90 95

Lys Gly Asn Met Gly Trp His Ala Asp Ser Thr Tyr Met Pro Val Gln
100 105 110

```

ES 2 621 919 T3

Ala Lys Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val Pro Ser Val Gly Gly
115 120 125

Gln Thr Gly Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Glu
130 135 140

Asp Leu Lys Ala Arg Val Glu Thr Leu Gln Ala Arg His Ser Leu His
145 150 155 160

Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Gln Thr Lys Ala Ala Asp Gly Glu
165 170 175

Tyr Ser Gly Tyr Gly Leu His Asp Gly Pro Val Pro Leu Arg Pro Leu
180 185 190

Val Lys Ile His Pro Glu Thr Gly Arg Lys Ser Leu Leu Ile Gly Arg
195 200 205

His Ala His Ala Ile Pro Gly Leu Glu Pro Ala Glu Ser Glu Arg Leu
210 215 220

Leu Gln Gln Leu Ile Asp Phe Ala Cys Gln Pro Pro Arg Ile Tyr His
225 230 235 240

His Asp Trp Ala Pro Gly Asp Ala Val Leu Trp Asp Asn Arg Cys Leu
245 250 255

Leu His Gln Ala Thr Pro Trp Asp Met Thr Gln Lys Arg Ile Met Trp
260 265 270

His Ser Arg Ile Ala Gly Asp Pro Ala Ser Glu Thr Ala Leu Ala His
275 280 285

<210> 5

<211> 867

<212> ADN

5 <213> optimizado para E. coli (v2)

<400> 5

```
atggcgagcc cggcgttcga cattgcgcca ctggatgcta cctttggcgc agttgt aact      60
ggcgtaaaac tggcggatct ggatgacgct ggctggctgg acctgcaggc tgcgtggctg      120
gaatatgcac tgcctggtat tcccgaccag cacctgaccc gtgaacagca gatcgctttc      180
gcacgcccgt tccgtccact ggagttcgaa atggcagcga tctccaacgt tctccggat      240
ggcagcctgc gtgttgaatc tgacaacgat gacatgatga aaatcctgaa aggcaacatg      300
ggttggcacg ctgactctac ctacatgcca gttcaggcaa agggcgcagt gttcagcgt      360
gaagtggttc cgtctgtggg tggccagact ggttttgcgg acatgcgcgc tgcctatgat      420
gcactggatg aagacctgaa agctcgtgtt gaaacctgc aagcgcgtca ctccctgcat      480
tactcccagt ccaagctggg tcaccagacc aaagctgcgg atggtgagta ctctggttac      540
ggcctgcatg atggtccggt tccgctgcgt ccgctggtga aaatccatcc ggaaactggc      600
cgcaaatccc tgcctgatcgg ccgtcatgcg cagcgcgattc cgggcctgga accggctgag      660
tctgaacgtc tgcctgcaaca gctgattgat tttgcttgtc agccgcgcgc tatctaccac      720
cagcactggg cgccgggtga tgcagtgtg tgggacaacc gctgcctgct gcaccaagcg      780
actccgtggg acatgacca gaaacgcata atgtggcaca gccgcat tgc gggtagcccg      840
gcatctgaga ccgcactggc acactaa
```

ES 2 621 919 T3

<210> 6
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> cebador PTU AAD- 13 PTU

5 <400> 6
 Al a Thr Gly Gly Cys Thr Cys Al a Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys
 1 5 10 15

Thr Cys Al a Gly Cys Cys
 20

<210> 7
 <211> 22
 <212> ADN

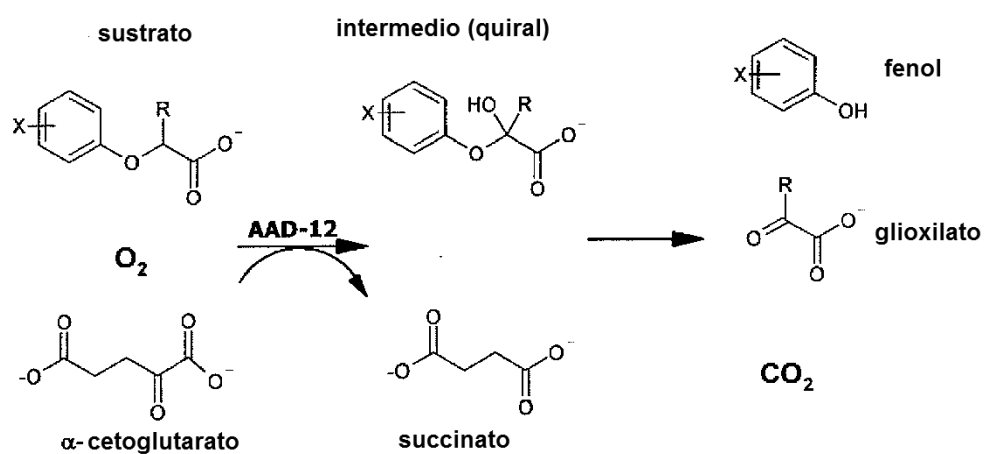
10 <213> cebador PTU AAD- 13 PTU

<400> 7
 cgggcaggcc t aact ccacc aa

22

REIVINDICACIONES

- 1.- Un polinucleótido aislado que codifica una proteína que degrada enzimáticamente una subestructura química de ariloxialcanoato de un herbicida de ariloxialcanoato, en donde dicho polinucleótido está operativamente unido a un promotor de planta o un promotor de virus de planta, y en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína hibrida en condiciones restrictivas con el complemento entero de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5, y en donde la proteína es capaz de degradar herbicidas auxínicos de fenoxiacetato y piridiloxiacetato.
- 2.- El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde dicha proteína es al menos 95% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.
- 3.- El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde dicho polinucleótido comprende una composición de codones no natural que tienen un sesgo hacia el uso de codones de la planta para aumentar la expresión de dicho polinucleótido en una planta.
- 4.- El polinucleótido de la reivindicación 3, en donde dicha composición de codones está sesgada hacia el uso de codones de plantas dicotiledóneas.
- 5.- Una célula de planta que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que degrada enzimáticamente una subestructura química de ariloxialcanoato de un herbicida de ariloxialcanoato, en donde dicho polinucleótido está operativamente unido a un promotor que es funcional en una planta y comprende una composición de codones no natural que tienen un sesgo hacia el uso de codones de la planta para aumentar la expresión de dicho polinucleótido en una planta, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína hibrida en condiciones restrictivas con el complemento entero de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5, y en donde dicha proteína es al menos 95% idéntica con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 y en donde la proteína es capaz de degradar herbicidas auxínicos de fenoxiacetato y piridiloxiacetato.
- 6.- Una planta que comprende una pluralidad de células de planta de acuerdo con la reivindicación 5.
- 7.- La planta de la reivindicación 6, en donde dicha planta es una planta dicotiledónea, y opcionalmente en donde dicha planta es una planta de soja.



- La adición de O_2 es *estereoespecífica*
- La rotura del compuesto intermedio a fenol + glioxilato es espontánea

FIGURA 1

```

10 20 30 40 50 60
aad 13 1 -----MSPAFDIAPLEDAITFCGAVVTGVKLAD-LDDAGWLDLQAAWLEYALLVFPDQ
aad 12 1 -----MQTTLOITPTGATLGATVTGVHLAT-LDDAGFAALHAAWLQHALIIFPGQ
aad 1 1 MHAALSPLSQRFERFIAVOPLTGVLGAFITGVDLRPLDDSTWNEILDAFHTYQVVIYFPGQ
aad 2 1 -----MTIAIRQLQTHFVGQVSGGLDLRKPLTPGGEAREVESAMDKYAVLVFHDQ
tfda 1 -----MSVVANPLHLPLFAAGVEDIDLREALGSTEVREIERLMDKESVLFVRGQ
tauD 1 -----MSERLSITPLGPGYICAGISGADLTRPLESDNQFEQLYHAVLRHQVFLRDLQ

70 80 90 100 110 120
aad 13 50 HLTREQQTAFARREGPLE-----FEMAAISNVRPDGSLRVES--DNDD
aad 12 50 HLSNDQQTIFAKRFGAIER-----IGGGDIVAISNVKADGTVRQHSFAEWDD
aad 1 61 AITNEQHIAFSRRREGVPDP-----VPLKLSIEGYPEVQMIRREA-----
aad 2 49 DITDEQMAFALNFGQREDARGGTVTKEKDYLQ-SGLNDVSNLKGDKGKPLAKD---SR
tfda 49 PLSQDQQTIAFARNFGPLEG--GFIKVNQRPSRFKYAELADISNVSLDGKVAQRD---AR
tauD 51 AITPQQQRALAQREGELHI-----HPVYPHAEGVDEIIVLDTHN-----

130 140 150 160 170 180
aad 13 91 MMKILKGNMGWHAADSTYMPVQAKGAVFSAEVVPSVGGQTGFADMRAAYDALDEDLKARVE
aad 12 97 MMKVIVGNMAWHAADSTYMPVMAQGAVFSAEVVPAVGGRTCFADMRAAYDALDEATRALVH
aad 1 100 NESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAVVMRAIDVPEHGGDTGFLSMYTAWEITLSPMTQATIE
aad 2 104 THLFNLGNCLWHDSSSERPIPAKFSLSARVNVPTGNTGTEFADMRAAYDALDETKAEIE
tfda 103 EVVGNFANQLWHDSSSFOQPAARYSMLSAVVFPSSGGDTFCMDRAAYDALPRDLQSELE
tauD 90 DNPP--DNDNWHTDVTFIETPPAGAILAAKELPSTGGDTLWTSGLIAAYEALSVPFRQLLS

190 200 210 220 230 240
aad 13 151 TLQARHSLHYSQS---KLGHQTKAADGEYSYGLHDGPVPLRPLVKIHPETGRKSLIIGR
aad 12 157 QRSARHSLVYSQS---KLGHVQQAGS-AYIGYGMDDTATPLRPLVKHPETGRPSLLIGR
aad 1 160 GENVVSATRVFGSLYQAQPRVFSNTSVKVMVDVADGREDTEVHLVTVHPGSGRKGLYVNO
aad 2 164 DLVCEHSLMYSGRC---SLGFT-----EYTDEEKQMKFVPLQRLVRTHPVHRRKSLYESS
tfda 163 GLRAEHYALNSRF---LLGDT-----DYSEAQRNAMPPVNWELVRTHAGSGRKFLFIGA
tauD 148 GLRAEHDFRKSFP---EYKYRKTEEEHQWRREAVAKNPPLLHPVVVRTHPVSGKQALFYNE

250 260 270 280 290 300
aad 13 207 -HAHAIFGLPEAESERLLQQLIDFACQPPRIYHHDWAPGDAVLWONRCLLHQATFPWDMTQ
aad 12 212 -HAHAIPGMDAAESERFLEGLVDWAQAPRVHAHQWAAGDVVVWONRCLLHRAEPWDFKL
aad 1 220 VYQRIEGMTDAESKPLQLLYEHATRFDFTCRVRWKKDQVLVWDLCTMHRVVPDYAGK
aad 2 214 -HAGKIASMSVPEGRLLLRDLNEHATQPEFYVVKWKLHDLVMWONRQTMHRVRRYDQSQ
tfda 213 -HASHVEGLPVAEGRMLLALELHATQREFVYRHRWNVGDVLMWONRCVLRHGRRYDISA
tauD 205 GFTTRIVDVSEKESEALLSFLFAHITKPEFQVRWRWQPNDAIADWNRVTVQHYANADYLPQ

310 320
aad 13 267 KRIMWHSRIAGDPASETALAH-
aad 12 272 PRVMWHSRLAGRPETEGAALV-
aad 1 280 FRYLTRITTVGGVVRPAR-----
aad 2 274 PRDMRRATYAGTEPTVQQQAEE
tfda 273 RRELRRATTLDDAVV-----
tauD 265 RRIMHRRATILGDKPFYRAG---

```

FIGURA 2

Ensayo enzimático acoplado para la detección de sustratos de AAD-13

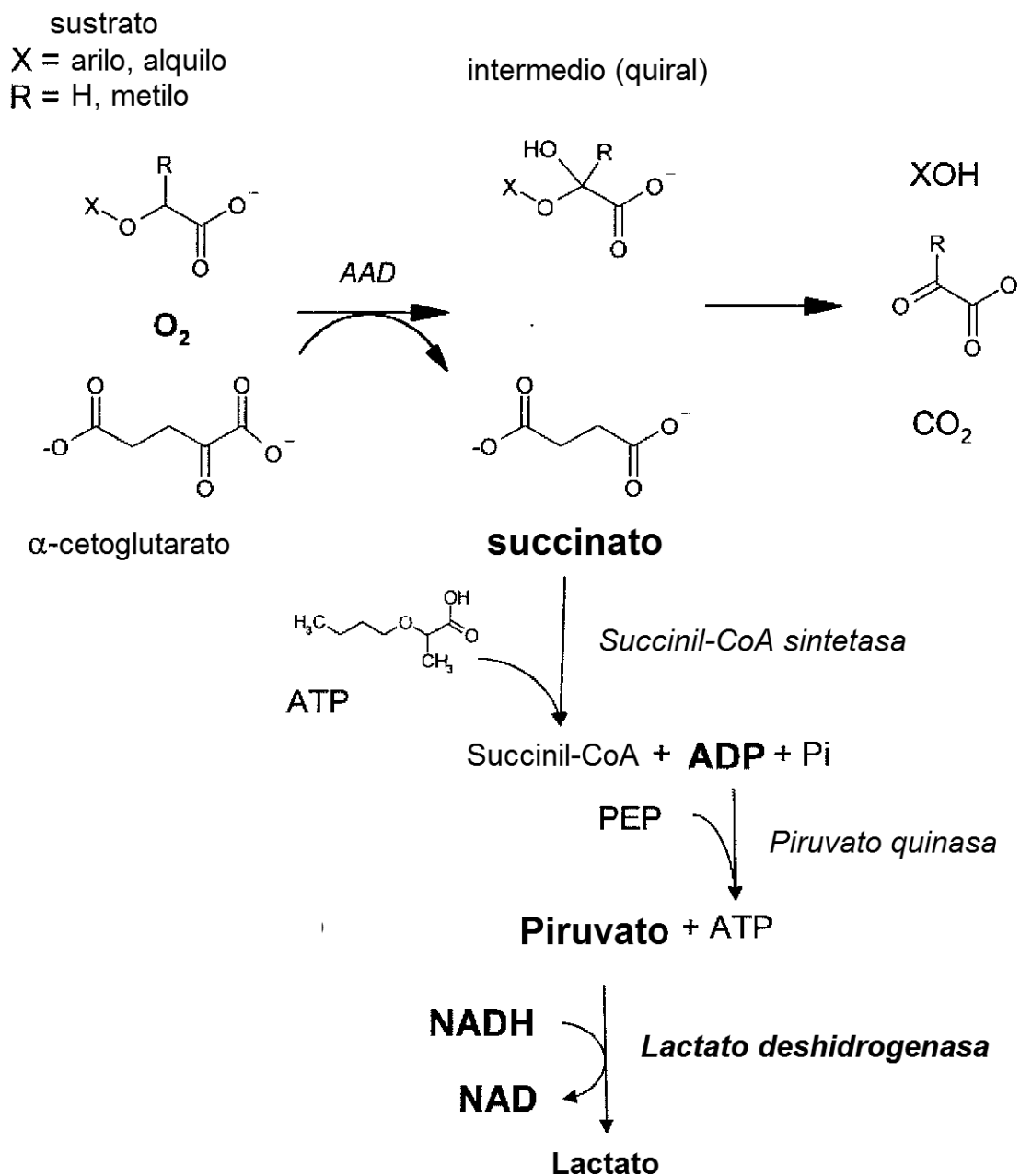


FIGURA 3