

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 948**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2006** **E 11010161 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017** **EP 2484202**

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

30 Prioridad:

28.10.2005 US 731044 P

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

18.10.2017

73 Titular/es:

DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)

**9330 Zionsville Road
Indianapolis IN 46268-1054, US**

72 Inventor/es:

**WRIGHT, TERRY;
LIRA, JUSTIN M.;
WALSH, TERENCE ANTHONY;
MERLO, DONALD;
JAYAKUMAR, PON SAMUEL y
LIN, GAOFENG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 637 948 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 necesitados por los cultivos y otras plantas deseables. Hay muchos tipos diferentes de herbicidas que se utilizan actualmente para reprimir malas hierbas. Un herbicida extremadamente popular es el glifosato.

Se han desarrollado cultivos, tales como maíz, soja, cáñola, algodón, remolacha azucarera, trigo, césped, y arroz, que son resistentes a glifosato. Por lo tanto, los campos con soja resistentes al glifosato de crecimiento activo, por ejemplo, se pueden pulverizar para reprimir las malas hierbas sin dañar significativamente las plantas de soja.

10 Con la introducción de los cultivos tolerantes al glifosato (GTC) modificados genéticamente a mediados de la década de 1990, se proporcionó a los productores una herramienta sencilla, cómoda, flexible y de bajo coste para reprimir un amplio espectro de malas hierbas de hoja ancha y gramíneas sin precedentes en la agricultura. En consecuencia, los productores se apresuraron a adoptar los GTC y en muchos casos a abandonar muchas de las mejores prácticas agronómicas aceptadas, tales como la rotación de cultivos, el modo herbicida de rotación de acción, mezclas de tanque, la incorporación de control mecánico y químico de malas hierbas de cultivo. Actualmente soja, algodón, maíz
15 y cáñola tolerantes al glifosato están disponibles comercialmente en los Estados Unidos y otros países en el hemisferio occidental. La alfalfa fue el primer GTC perenne introducido, promoviendo la oportunidad para el uso repetido del glifosato en el mismo cultivo y campo en forma repetida durante un período de años. Más GTC (por ejemplo, trigo, arroz, remolacha azucarera, césped, etc.) están listos para su introducción en espera de aceptación en el mercado global. Muchas otras especies resistentes al glifosato se encuentran en fase experimental hasta su desarrollo (por ejemplo, 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 la caléndula, petunia, y begonias; ver "isb.vt.edu/kdocs/fieldtestsl.cfin, 2005" sitio web). Además, el coste de glifosato se ha reducido drásticamente en los últimos años hasta el punto de que pocos programas de control de malas hierbas
20 convencionales pueden competir eficazmente en precio y rendimiento con los sistemas GTC glifosato.

El glifosato se ha utilizado con éxito en la quema de plantas y otras áreas no cultivadas para el control total de la vegetación durante más de 15 años. En muchos casos, como en los GTC, el glifosato se ha usado 1-3 veces al año durante 3, 5, 10, hasta 15 años en un surco. Estas circunstancias han dado lugar a un exceso de confianza en la tecnología de glifosato y GTC y han puesto una presión de selección fuerte sobre las especies de malas hierbas
30 nativas de plantas que son naturalmente más tolerante al glifosato o que han desarrollado un mecanismo para resistir la actividad herbicida de glifosato.

El uso extensivo de programas de control de malas hierbas sólo con glifosato está dando como resultado la selección de malas hierbas resistentes al glifosato y está seleccionando la propagación de especies de malezas que son inherentemente más tolerantes al glifosato que la mayoría de las especies objetivo (es decir, cambios de malas hierbas). (Powles and Preston, 2006; Ng et al., 2003; Simarmata et al., 2003; Lorraine-Colwill et al., 2003; Sfiligoj, 2004; Miller et al., 2003; Heap, 2005; Murphy et al., 2002; Martin et al., 2002.) a pesar de que el glifosato ha sido
35 ampliamente utilizado en todo el mundo durante más de 15 años, se ha informado que solo un puñado de malas hierbas ha desarrollado resistencia al glifosato (Heap, 2005); sin embargo, la mayoría de estas se han identificado en los últimos cinco años. Las malas hierbas resistentes incluyen especies gramíneas y de hoja ancha-*Lolium rigidum*, *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica*, *Sorghum halepense*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Conyza canadensis*, *Conyza bonariensis*, *Plantago lanceolata*, *Amaranthus palmerii* y *Amaranthus rudis*. Además, las malas hierbas que previamente no habían sido un problema agronómico antes de la amplia utilización de GTC se están convirtiendo en 'más frecuente y difícil de controlar en el contexto del GTC, que comprenden > 80% de los acres de algodón y soja U.S. y > 20% de acres de maíz U.S. (Gianessi, 2005). Estos cambios de malas hierbas están ocurriendo predominantemente con (pero no exclusivamente) malas hierbas de hoja ancha difíciles de controlar. Algunos
40 ejemplos incluyen especies de *Ipomoea*, *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Taraxacum*, y *Commelina*.

En las áreas donde los productores se enfrentan con las malas hierbas resistentes al glifosato o un cambio a especies de malas hierbas más difíciles de controlar, los productores pueden compensar las debilidades de glifosato mediante mezcla en tanque o alternando con otros herbicidas que controlarán las malas hierbas perdidas. Un
50 compañero de la mezcla de tanque popular y eficaz para el control de los escapes al control de las malas hierbas de hoja ancha en muchos casos ha sido ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). 2,4-D se ha utilizado agronómicamente y en situaciones que no son de cultivo para un control de malas hierbas de hoja ancha de amplio espectro durante más de 60 años. Se han informado casos individuales de especies más tolerantes, pero el 2,4-D aún es uno de los herbicidas más ampliamente utilizados. Una limitación al uso adicional de 2,4-D es que su selectividad en cultivos de dicotiledóneas como la soja o algodón es muy pobre, y por lo tanto 2,4-D no se utiliza típicamente en (y generalmente no cerca de) los cultivos de dicotiledóneas sensibles. Además, el uso de 2,4-D en los cultivos de gramíneas es un poco limitado por la naturaleza del daño al cultivo que se puede producir. 2,4-D en combinación con el glifosato se ha utilizado para proporcionar un tratamiento de quemado más robusto antes de plantar sin labranza soja y algodón; sin embargo, debido a la sensibilidad de estas especies dicotiledóneas al 2,4-D, estos
55

tratamientos de quemados se deben producir al menos 14-30 días antes de la siembra (Agrilience, 2005).

2,4-D está en la clase de herbicidas fenoxiácido, como es MCPA. 2,4-D se ha utilizado en muchos cultivos de monocotiledóneas (tales como maíz, trigo y arroz) para el control selectivo de malas hierbas de hoja ancha sin dañar gravemente las plantas de cultivo deseadas. 2,4-D es un derivado de la auxina sintética que actúa para desregular la homeostasis de las células normales-hormona e impedir el crecimiento equilibrado y controlado; sin embargo, todavía no se sabe el modo exacto de acción. Triclopir y fluroxipir son herbicidas de ácido piridiloxiacético cuyo modo de acción es también como una auxina sintética.

Estos herbicidas tienen diferentes niveles de selectividad en ciertas plantas (por ejemplo, las dicotiledóneas son más sensibles que los pastos). El metabolismo diferencial por diferentes plantas es una explicación de los diversos niveles de selectividad. En general, las plantas metabolizan lentamente 2,4-D, por lo que la variación de la respuesta de la planta al 2,4-D se puede explicar más probablemente por diferentes actividades en el sitio blanco (s) (WSSA, 2002). El metabolismo de la planta del 2,4-D se produce normalmente a través de un mecanismo de dos fases, típicamente hidroxilación seguida por la conjugación con aminoácidos o glucosa (WSSA, 2002).

Con el tiempo, las poblaciones microbianas han desarrollado una vía alternativa y eficiente, para la degradación de este xenobiótico en particular, lo que produce la mineralización completa de 2,4-D. Sucesivas aplicaciones del herbicida seleccionado para los microbios pueden utilizar el herbicida como fuente de carbono para el crecimiento, lo les proporciona una ventaja competitiva en el suelo. Por esta razón, 2,4-D actualmente formulado tiene una vida media en el suelo relativamente corta, y no se encuentra ningún efecto de arrastre significativo para los cultivos subsiguientes. Esto se suma a la utilidad herbicida del 2,4-D.

Un organismo que ha sido ampliamente investigado por su capacidad para degradar el 2,4-D es *Ralstonia eutropha* (Streber et al., 1987). El gen que codifica para la primera etapa enzimática en la vía de la mineralización es *tfdA*. Ver la Patente U.S. Nº 6.153.401 y GENBANK Acc. No. M16730. *TfdA* cataliza la conversión de ácido 2,4-D a diclorofenol (DCP) por medio de una reacción de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (Smejkal et al., 2001). DCP tiene poca actividad herbicida en comparación con el 2,4-D. *TfdA* se ha utilizado en plantas transgénicas para conferir resistencia a 2,4-D en plantas dicotiledóneas (por ejemplo, algodón y tabaco) normalmente sensibles al 2,4-D (Streber et al. (1989), Lyon et al. (1989), Lyon (1993), y la Patente U.S. Nº 5.608.147).

Un gran número de genes de tipo *tfdA* que codifica las proteínas capaces de degradar 2,4-D se han identificados a partir del medio ambiente y se depositan en la base de datos GenBank. Muchos homólogos son similares a *tfdA* (> 85% de identidad de aminoácidos) y tienen propiedades enzimáticas similares a *tfdA*. Sin embargo, hay una cantidad de homólogos que tiene una identidad significativamente menor a *TfdA* (25-50%), pero tienen los restos característicos asociados con α -cetoglutarato dioxigenasa Fe^{2+} dioxigenasas. Por lo tanto, no es obvio cuáles son las especificidades de sustrato de estas dioxigenasas divergentes.

Un ejemplo único con baja homología para *tfdA* (identidad de aminoácidos 31%) es *sdpA* de *Delia acidovorans* (Kohler et al., 1999, Westendorf et al., 2002, Westendorf et al., 2003). Se ha demostrado que esta enzima cataliza la primera etapa en (S)-dicloroprop (y otros ácidos (S)-fenoxipropiónicos), así como 2,4-D (un ácido fenoxiacético) mineralización (Westendorf et al., 2003). Hasta ahora no se ha dado a conocer la transformación de este gen en las plantas.

El desarrollo de nuevas tecnologías de cultivos tolerantes a los herbicidas ha tenido éxito limitado debido en gran parte a la eficacia, bajo coste, y la conveniencia de GTC. En consecuencia, se ha producido una muy alta tasa de adopción para GTC entre los productores. Esto creó pocos incentivos para el desarrollo de nuevas tecnologías de HTC.

Las subestructuras químicas de ariloxialcanoato son una entidad común de muchos herbicidas comercializados incluyendo las auxinas fenoxiacetato (tales como 2,4-D y dicloroprop), auxinas piridiloxiacetato (tales como fluroxipir y tridopir), inhibidores de acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase) inhibidores ariloxifenoxipropionatos (AOPP) (tales como haloxyfop, quizalofop, y diclofop), y los inhibidores de protoporfirinógeno IX oxidasa fenoxiacetato 5-sustituidos (tales como piraflufeno y flumiclorac). Sin embargo, estas clases de herbicidas son todos muy distintos, y no existe evidencia en la literatura actual de las vías de degradación comunes entre estas clases químicas. Recientemente se ha descrito una enzima multifuncional de la degradación de los herbicidas que cubren múltiples modos de acción (PCT U.S./2005/014737; presentada 2 de mayo de 2005). A partir de este momento se describe otra enzima multifuncional único y sus usos potenciales.

Breve síntesis de la invención

La presente invención se basa en nuevas plantas que no sólo son resistentes a 2,4-D, sino también a los herbicidas de piridiloxiacetato. Hasta ahora, no había ninguna expectativa o sugerencia de que una planta con estas propiedades ventajosas podría ser producida por la introducción de un solo gen. La presente invención proporciona métodos de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se basa en la identificación de una enzima que no solo es capaz de degradar 2,4-D, sino también posee sorprendentemente nuevas propiedades, que distinguen, por ejemplo de la enzima de la presente

invención de las proteínas *tfdA* previamente conocidas. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de una enzima que es capaz de degradar ambos herbicidas de 2,4-D y piridiloxiacetato. No se ha informado previamente que una enzima de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato tiene la capacidad de degradar los herbicidas de herbicidas auxínicos de fenoxiacetato y piridiloxiacetatos. La enzima y el gen para usar de acuerdo con la presente invención se denominan en la presente AAD-12 (ArioxiAlcanoato Dioxigenasa). Este descubrimiento altamente novedoso es la base del rasgo significativo del cultivo tolerante a herbicidas y de oportunidades de marcadores seleccionables. Las plantas de la presente invención pueden ser resistentes a lo largo de todo su ciclo de vida.

No había ninguna motivación previa para producir plantas que comprenden un gen AAD-12 (preferiblemente un polinucleótido AAD-12 que tiene una secuencia optimizada para la expresión en uno o más tipos de plantas, como se ejemplifica en la presente), y no se esperaba que tales plantas podrían producir efectivamente una enzima AAD-12 para producir plantas resistentes a un herbicida de ácido fenoxiacético (tales como 2,4-D) y/o uno o más herbicidas de piridiloxiacetatos tales como triclopir y fluroxipir. En consecuencia, la invención presente proporciona muchas ventajas que no eran hasta ahora no se consideraban posibles en la técnica.

La presente invención incluye la degradación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y otros herbicidas de ariloxialcanoato auxina por una enzima AAD-12 expresada de forma recombinante. La presente invención también incluye métodos de control de malas hierbas en donde dichos métodos comprenden la aplicación de uno o más herbicidas de ariloxialcanoato auxina a plantas que comprenden un gen *AAD-12*.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 ilustra la reacción química general que es catalizada por enzimas AAD-12 de la presente invención.

La Figura 2 es un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de una proteína ejemplificada de AAD-12, *TfdA*, AAD-2, AAD-1, y TauD.

La Figura 3 ilustra la actividad de AAD-12 (v2) sobre 2,4-D y los enantiómeros de diclorprop.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO:1 es la secuencia de nucleótidos de AAD-12 de *Defflia acidovorans*.

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

SEQ ID NO:3 es la secuencia de nucleótidos optimizada en la planta de AAD-12 (v1).

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

SEQ ID NO:5 es la secuencia de nucleótidos optimizada en *E.coli* de AAD-12 (v2).

SEQ ID NO:6 es la secuencia del cebador directo M13.

SEQ ID NO:7 es la secuencia del cebador inverso M13.

SEQ ID NO:8 es la secuencia del cebador PTU directo de AAD-12 (v1).

SEQ ID NO:9 es la secuencia del cebador PTU inverso AAD-12 (v1).

SEQ ID NO:10 es la secuencia del cebador de PCR codificador directo de AAD-12 (v1).

SEQ ID NO:11 es la secuencia del cebador de PCR codificador inverso AAD-12 (v1).

SEQ ID NO:12 muestra la secuencia del "sdpacodF" AAD-12 (v1) primer.

SEQ ID NO:13 muestra la secuencia del cebador "sdpacodR" AA.D-12 (v1).

SEQ ID NO:14 muestra la secuencia del cebador "Ncol de Brady".

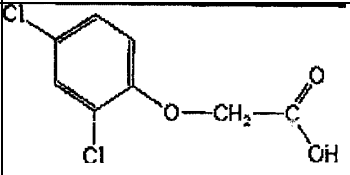
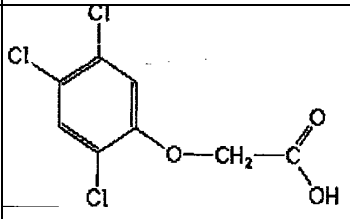
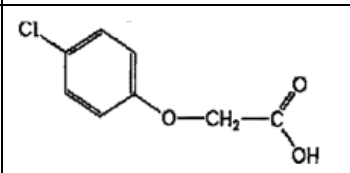
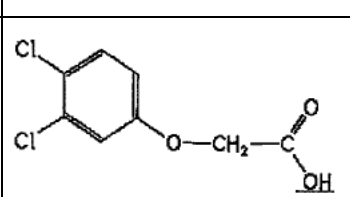
SEQ ID NO:15 muestra la secuencia del cebador "Sacl de Brady".

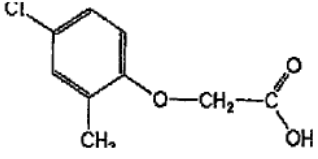
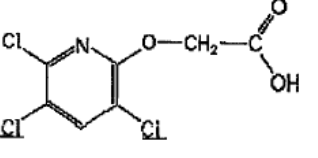
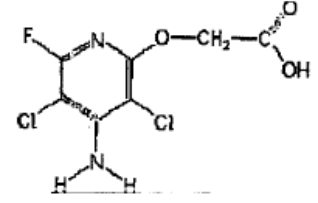
Descripción detallada de la invención

El presente desarrollo de un gen de resistencia a 2,4-D y los cultivos resistentes posteriores ofrece excelentes opciones para controlar especies de malas hierbas de hoja ancha; resistentes al glifosato (o altamente tolerantes y cambiados) para aplicaciones en el cultivo. 2,4-D es herbicida de malas hierbas de hoja ancha de un amplio espectro, relativamente económico y robusto que puede proporcionar excelente utilidad para los productores si se puede proporcionar mayor tolerancia del cultivo en los cultivos de dicotiledóneas y monocotiledóneas similares. Los cultivos de dicotiledóneas transgénicas tolerantes a 2,4-D también pueden tener mayor flexibilidad en el tiempo y

tasa de aplicación. Una utilidad adicional del presente rasgo de tolerancia a los herbicidas para 2,4-D es su utilidad para evitar daños a los cultivos normalmente sensibles a la deriva, volatilización, inversión de de 2,4-D, (o de otro tipo fuera del sitio fenómeno de movimiento fuera del sitio), mala aplicación, vandalismo, y similares. Un beneficio adicional del gen AAD-12 es que a diferencia de todos los homólogos de WA caracterizados hasta la fecha, AAD-12 es capaz de degradar las auxinas de piridiloxiacetatos (por ejemplo, triclopir, fluroxipir) además de auxinas fenoxi aquirales (por ejemplo, 2,4-D, MCPA, ácido 4-clorofenoxiacético). Véase la **Tabla 1**. Una ilustración general de las reacciones químicas catalizadas por la presente enzima AAD-12 se muestra en la **Figura 1**. (La adición de O₂ es estereoespecífica; la degradación del producto intermedio a fenol y glioxilato es espontánea). Se debe entender que las estructuras químicas de la Figura 1 ilustran los esqueletos moleculares y que varios grupos R y similares (tales como los que se muestran en la Tabla 1) se incluyen, pero no se ilustran necesariamente en forma específica en la Figura 1. Se ha usado múltiples mezclas de diferentes combinaciones de fenoxi auxina a nivel mundial a la dirección espectros malas hierbas específica y las condiciones ambientales en las distintas regiones. El uso del gen de AAD-12 en las plantas proporciona protección a un espectro mucho más amplio de los herbicidas de auxina, lo que aumenta la flexibilidad y los espectros de malas hierbas que se pueden controlar. Este también se puede usar para proteger de la deriva o la lesión del herbicida de auxina sintético fuera de sitio para toda la amplitud de las auxinas fenoxi comercialmente disponibles. La Tabla 1 define piridiloxi y fenoxi auxinas disponibles en el comercio y proporciona las estructuras químicas pertinentes.

Tabla 1. Fenoxiacetato y piridiloxiacetato comercialmente disponibles. La referencia a los herbicidas de fenoxi auxina y piridiloxi auxina se hace generalmente al ácido activo pero algunos se formulan comercialmente como cualquiera de una variedad de formulaciones del correspondiente éster y asimismo se consideran como sustratos para la enzima AAD-12 en planta, ya que las esterasas generales de la planta convierten estos ésteres en los ácidos activos en la planta. Asimismo la referencia también puede ser para la sal orgánica o inorgánica correspondiente del ácido correspondiente. Los intervalos de tasa de uso posibles pueden ser tratamientos independientes o en combinación con otros herbicidas en usos para cultivos y no cultivos.

Nombre químico	CAS nº	Intervalos de tasa uso posibles (g ae/ha)	Intervalos de tasa uso preferidos (g ae/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	

Se ha identificado ahora un solo gen (AAD-12) que, cuando se manipula genéticamente para la expresión en plantas, tiene las propiedades que permiten el uso de herbicidas de fenoxi auxina en las plantas donde la tolerancia inherente nunca existió o no era suficientemente alta para permitir el uso de estos herbicidas. Además, AAD-12 puede proporcionar protección en planta a herbicidas de piridiloxiacetatos donde la tolerancia natural tampoco fue suficiente para permitir la selectividad, ampliando la utilidad potencial de estos herbicidas. Las plantas que contienen AAD-12 solo se pueden tratar secuencialmente o mezclar en tanque con uno, dos, o una combinación de varios herbicidas de fenoxi auxina. La tasa para cada herbicida de fenoxi auxina puede variar desde 25 hasta 4000 g ae/ha, y más típicamente de 100 a 2.000 g ae/ha para el control de un amplio espectro de malas hierbas dicotiledóneas. Del mismo modo, uno, dos, o una mezcla de varios compuestos de piridiloxiacetato auxina se puede aplicar a plantas que expresan AAD-12 con un menor riesgo de lesión a partir de dicho herbicidas. La tasa para cada herbicidas de piridiloxiacetato puede variar desde 25 hasta 2.000 g ar/ha, y más típicamente 35 a 840 g ae/ha para el control de malas hierbas dicotiledóneas adicionales.

El glifosato se utiliza ampliamente debido a que controla un espectro muy amplio de especies de malas hierbas de hoja ancha y gramíneas. Sin embargo, el uso repetido del glifosato en los GTC y en aplicaciones no agrícolas tiene y continuará teniendo que seleccionar cambios de las malas hierbas a especies naturalmente más tolerantes o biotipos resistentes al glifosato. Los compañeros del herbicida de mezcla en tanque utilizados en tasas eficaces que ofrecen un control de la misma especie pero que tienen diferentes modos de acción están indicados en la mayoría de las estrategias de manejo de resistencia a los herbicidas como método para retrasar la aparición de malas hierbas resistentes. El apilamiento de AAD-12 con un rasgo de tolerancia a glifosato (y/o con otros rasgos de tolerancia a herbicidas) podría proporcionar un mecanismo para permitir el control de especies de malas hierbas dicotiledóneas resistentes al glifosato en GTCs al permitir el uso de glifosato, herbicidas de fenoxi auxinas (por ejemplo, 2,4-D) y piridiloxiacetatos auxinas (por ejemplo, triclopir) de forma selectiva en el mismo cultivo. Las aplicaciones de estos herbicidas pueden ser simultáneamente en una mezcla de tanque que comprende dos o más herbicidas de diferentes modos de acción; aplicaciones individuales de composición de herbicida único en aplicaciones secuenciales como antes de la plantación, en preemergencia o pos-emergencia y tiempo dividido de aplicaciones que van desde aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 meses; o, alternativamente, cualquier combinación de cualquier número de herbicidas que representan cada clase química se puede aplicar en cualquier momento dentro de aproximadamente 7 meses de la plantación del cultivo hasta la cosecha del cultivo (o el intervalo de antes de la cosecha para el herbicida individual, el que sea más corto).

Es importante disponer de flexibilidad en el control de un amplio espectro de malas hierbas de pastos y hoja ancha en términos de tiempo de la aplicación, tasa de herbicidas individuales, y la capacidad de controlar las malas hierbas difíciles o resistentes. Las aplicaciones de glifosato en un cultivo con un apilamiento de gen de resistencia a glifosato/AAD-12 podrían variar de aproximadamente 250 a 2500 g ae/ha; herbicidas de fenoxi auxina (uno o más) se puede aplicar de aproximadamente 25 a 4000 g ae/ha; y herbicidas de piridiloxiacetatos auxina (uno o más) se puede aplicar de 25-2000 g ae/ha. La combinación y tiempo de estas aplicaciones óptimos dependerán de la situación particular de las especies y el ambiente, y será determinado mejor por una persona experta en la técnica de control de malas hierbas y que tenga el beneficio de la presente descripción.

Las plántulas son típicamente resistentes a largo de todo el ciclo de cultivo. Las plantas transformadas típicamente serán resistentes a la nueva aplicación de herbicidas en cualquier momento que se expresa el gen. La tolerancia se muestra en la presente al 2,4-D en todo el ciclo de vida utilizando los promotores constitutivos probados hasta el

momento (principalmente CsVMV y AtUbi 10). Normalmente se esperaría esto, pero es una mejora sobre otras actividades no metabólicas donde la tolerancia se puede ver afectado significativamente por la reducción de la expresión de un sitio de mecanismo de acción de la resistencia. Un ejemplo es el algodón Roundup Ready, donde las plantas eran tolerantes si se pulveriza temprano, pero si pulverizan demasiado tarde el glifosato se concentra en los meristemas (porque no se metaboliza y se transloca); promotores virales Monsanto utilizado no se expresan bien en las flores. La presente invención proporciona una mejora en estos aspectos.

Las formulaciones herbicidas (por ejemplo, formulación de éster, ácido o sal, o concentrado soluble, concentrado emulsionable, o líquido soluble) y aditivos de mezcla de tanque (por ejemplo, adyuvantes, tensioactivos, retardantes de deriva, o agentes de compatibilidad) pueden afectar significativamente el control de malas hierbas de un herbicida dado o una combinación de uno o más herbicidas.

Un experto en la técnica también puede observar el beneficio de la combinación de dos o más modos de acción para aumentar el espectro de malas hierbas controladas y/o para el control de especies de malas hierbas naturalmente, más tolerantes o resistentes. Esto también podría extenderse a las reacciones químicas por las que la tolerancia a herbicidas fue activada en los cultivos a través de la intervención humana (ya sea en forma transgénica o no transgénica) más allá de GTC. En efecto, los rasgos que codifican la resistencia a glifosato (por ejemplo, EPSPS vegetales o bacterianas resistentes, glifosato oxidorreductasa (GOX), GAT), resistencia al glufosinato (por ejemplo, Pat, bar), resistencia a los herbicidas inhibidores de acetolactato sintasa (ALS) (por ejemplo, imidazolinonas, sulfonilureas, sulfonanilida triazolopirimidina, pirimidiniltiobenzoatos y otras reacciones químicas = AHAS, Csrl, SurA, y otros), resistencia a bromoxinilo (por ejemplo, BxN), resistencia a los inhibidores de HPPD (enzima 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa), resistencia a los inhibidores de la fitoeno desaturasa (PDS), resistencia a herbicidas inhibidores del fotosistema II (por ejemplo, psbA), resistencia a herbicidas inhibidores de fotosistema I, resistencia a los herbicidas inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa IX (PPO) (por ejemplo, PPO-1), resistencia a los herbicidas de fenilurea (por ejemplo, CY.P76B1), enzimas que degradan dicamba (ver, por ejemplo, el documento U.S. 20030135879), y otros se pueden apilar solos o en múltiples combinaciones para proporcionar la capacidad de controlar o prevenir efectivamente los cambios y/o resistencia de las malas hierbas a cualquier herbicida de las clases mencionadas anteriormente. In vivo se puede usar EPSPS modificada, así como los genes de resistencia a glifosato de Clase I, Clase II y Clase III.

En cuanto a herbicidas adicionales, algunos inhibidores de ALS preferidos adicionales incluyen, pero sin limitación sulfonilureas (tales como clorsulfurona, halosulfurona, nicosulfurona, sulfometuron, sulfosulfurona, trifloxisulfurona), imidazolinonas (tales como imazamox, imazetapir, imazaquin), triazolopirimidina sulfonanilidas (tales como cloransulam-metilo, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, y penoxsulam), pirimidiniltiobenzoatos (tal como bispiribac y piritiobac), y flucarbazona. Algunos inhibidores de HPPD preferidos incluyen, pero sin limitación mesotriona, isoxaflutol, y sulcotriona. Algunos inhibidores de PPO preferidos incluyen, pero sin limitación flumiclorac, flumioxazina, flufenpir, piraflufeno, flutiacet, butafenacilo, carfentrazona, sulfentrazona, y los difeniléteres (tales como acifluorfenol, fomesafenol, lactofenol y oxifluorfenol).

Además, AAD-12 solo o apilado con uno o más rasgos HTC se puede apilar con uno o más rasgo de entrada adicionales (por ejemplo, resistencia a insectos, resistencia a los hongos, o tolerancia al estrés, y otros) o de salida (por ejemplo, mayor rendimiento, mejor perfil del aceite, mejora de calidad de la fibra, y otros). Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar para proporcionar un paquete agronómico completa de mejora de calidad del cultivo con la capacidad de controlar de forma flexible y rentable numerosas plagas agronómicas.

La presente invención se basa en la identificación de una enzima que no solo puede degradar 2,4-D, sino que también posee sorprendentemente nuevas propiedades, que distinguen la enzima de la presente invención de, por ejemplo, las proteínas de *tfdA* previamente conocida. A pesar de que esta enzima tiene muy baja homología con *tfdA*, los genes de la presente invención pueden todavía se pueden clasificar generalmente en la misma familia general de dioxigenasas dependiente de α -cetoglutarato. Esta familia de proteínas se caracteriza por tres residuos de histidina conservados en un motivo "HX(D/E)X₂₃₋₂₆(T/S)X₁₁₄₋₁₈₃HX₁₀₋₁₃R" que comprende el sitio activo. Las histidinas coordinan los iones de Fe²⁺ en el sitio activo que es esencial para la actividad catalítica (Hogan et al., 2000). Los experimentos de expresión preliminares in vitro discutidos en la presente se adaptaron para ayudar a seleccionar a los nuevos atributos. Estos experimentos también indican que la enzima AAD-12 es la única de otras enzimas dispares de la misma clase, descrita en una solicitud de patente presentada anteriormente (PCT U.S./2005/014737; presentada el 2 de mayo de 2005). La enzima AAD-1 de esta aplicación comparte solo aproximadamente 25% de identidad de secuencia con la proteína de AAD-12 presente.

Más específicamente, la presente invención se refiere en parte al uso de una enzima que no sólo es capaz de degradar herbicidas 2,4-D, sino también piridiloxiacetatos herbicidas. No se ha informado previamente que la enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato tenga la capacidad de degradar herbicidas de diferentes clases químicas y modos de acción. Las enzimas y los genes para uso de acuerdo con la presente invención se denominan en la presente genes y proteínas de 12-AAD (Arioloxialcanoato dioxigenasa).

Por lo tanto, la presente invención se refiere en parte a la degradación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros ácidos fenoxiacéticos, y herbicidas de ácido piridiloxiacético por una enzima AAD-12 expresada en forma recombinante.

Las proteínas presentes fueron positivas para la conversión de 2,4-D al 2,4-diclorofenol ("DCP"; herbicida inactivos) en ensayos analíticos. Las proteínas parcialmente purificadas de la presente invención pueden convertir rápidamente 2,4-D a DCP in vitro. Una ventaja adicional es que las plantas transformadas con AAD-12 proporcionan herbicidas precursores que se metabolizan en formas inactivas, lo que así reduce el potencial para la recolección de residuos de herbicidas en grano o forraje.

La presente invención también incluye métodos para controlar las malas hierbas en los dichos métodos comprenden la aplicación de una fenoxi auxina y opcionalmente un herbicida de piridiloxiacetato a las plantas que comprenden un gen de AAD-12.

A la luz de estos descubrimientos, ahora se describen nuevas plantas que comprenden un polinucleótido que codifica este tipo de enzima. Hasta ahora, no había ninguna motivación para producir tales plantas, y no había ninguna expectativa de que tales plantas puedan producir efectivamente esta enzima para hacer que las plantas sean resistentes no solo a herbicidas de fenoxi ácido (tales como 2,4-D), sino también a herbicidas de piridiloxiacetato. En consecuencia, la presente invención proporciona muchas ventajas hasta ahora no se consideraban posibles en la técnica.

Las cepas disponibles al público (depositadas en recolecciones de cultivos como ATCC o DSMZ) se pueden adquirir y evaluar, utilizando técnicas descritas en la presente para nuevos genes. Las secuencias descritas en la presente se pueden usar para amplificar y clonar los genes homólogos en un sistema de expresión recombinante para su posterior detección y análisis.

Como se discutió anteriormente en la sección de Antecedentes, un organismo que ha sido ampliamente investigado por su capacidad para degradar el 2,4-D es *Ralstonia eutropha* (Streber et al., 1987). El gen que codifica para la primera enzima en la vía de degradación es OA. Véase la Patente de EE.UU. N.º 6.153.401 y GENBANK Acc. N.º M16730. *TfdA* cataliza la conversión de ácido 2,4-D a DCP inactivo como herbicida a través de una reacción de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (Smejkal et al., 2001). *TfdA* se ha utilizado en plantas transgénicas para conferir resistencia a 2,4-D en las plantas dicotiledóneas (por ejemplo, algodón y tabaco) normalmente sensibles al 2,4-D (Streber et al., 1989; Lyon et al., 1989; Lyon et al., 1993). Un gran número de genes de tipo *tfdA* que codifican las proteínas capaces de degradar 2,4-D se han identificado en el ambiente y depositado en la base de datos GenBank. Muchos homólogos son relativamente similares a *tfdA* (> 85% de identidad de aminoácidos) y tienen propiedades enzimáticas similares a la OA. Sin embargo, actualmente se ha identificado una pequeña colección de homólogos de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato que tienen un bajo nivel de homología con la OA.

La presente invención se basa en sorprendentes descubrimientos de nuevos usos y funciones de una enzima de relación distante, *sdpA*, de *Delfia acidivorans* (Westendorf et al., 2002, 2003) con baja homología con OA (31% de identidad de aminoácidos). Anteriormente se había demostrado que esta enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato purificada en su forma nativa degrada 2,4-D y S-diclorprop (Westendorf et al., 2002 y 2003). Sin embargo, no se ha informado previamente ninguna enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato que tenga la capacidad de degradar herbicidas de la clase química de piridiloxiacetato. *sdpA* nunca se ha expresado en las plantas, ni había ninguna motivación para hacerlo, en parte porque el desarrollo de las nuevas tecnologías de HTC se ha limitado debido en gran parte a la eficacia, bajo coste, y la conveniencia de GTC (Devine, 2005).

A la luz de la nueva actividad, las proteínas y los genes relacionados con la presente invención se denominan en la presente como proteínas y genes de AAD-12. En la actualidad se confirmó que AAD-12 degrada una variedad de herbicidas de fenoxiacetato auxina in vitro. Sin embargo, esta enzima, como se informó por primera vez en el presente documento, se encontró sorprendentemente que también es capaz de degradar sustratos adicionales de la clase de las moléculas de ariloxialcanoato. Los sustratos de significativa importancia agronómica incluyen los herbicidas de piridiloxiacetato auxina. Este descubrimiento sumamente novedoso es la base de las oportunidades del rasgo de cultivo tolerante a los herbicidas (HTC) y marcador seleccionable significativos. Esta enzima es única en su capacidad de administrar actividad de degradación del herbicida a una variedad de herbicidas de malas hierbas hoja ancha amplio espectro (fenoxiacetato y piridiloxiacetato auxinas).

Por lo tanto, la presente invención se refiere en parte a la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros herbicidas de fenoxiacético auxina, y herbicidas piridiloxiacetato por una enzima ariloxialcanoato dioxigenasa expresada de forma recombinante (AAD-12). Esta invención también se refiere, en parte, a la identificación y los usos de los genes que codifican una enzima degradante ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-12) capaz de degradar herbicidas fenoxi y/o piridiloxi auxina.

La enzima presente permite la expresión transgénica resultante de la tolerancia a las combinaciones de herbicidas que pueden controlar casi todas las malas hierbas de hoja ancha. AAD-12 puede servir como un rasgo del cultivo tolerante a herbicida excelente para apilar con otros rasgos HTC [por ejemplo, resistencia a glifosato, resistencia al glufosinato, resistencia al inhibidor de ALS (por ejemplo, imidazolinonas, sulfonilureas, triazolopirimidina sulfonanilida), resistencia a bromoxinilo, resistencia al inhibidor de HPPD, resistencia al inhibidor de PPO, y todos, y la resistencia los rasgos de resistencia a los insectos (Cry1F, Cry1Ab, Cry 34/45, otros Bt, por ejemplo las proteínas o proteínas insecticidas de origen no Bacillus, y otras). Además, AAD-12 puede servir como un marcador seleccionable para ayudar en la selección de transformantes primarios de plantas manipuladas genéticamente con

un segundo gen o grupo de genes.

Además, el presente gen microbiano se ha rediseñado de modo que la proteína está codificada por los codones que tienen un sesgo hacia el uso de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (hemicot). Arabidopsis, maíz, tabaco, algodón, soja, cáñola, y el arroz se han transformado con constructos que contienen AAD-12-y han demostrado altos niveles de resistencia a los herbicidas de fenoxi y piridiloxi auxina. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a genes "optimizados en planta" que codifican las proteínas de la presente invención.

Los grupos oxialcanoato son útiles para la introducción de una funcionalidad de ácido estable en herbicidas. El grupo ácido puede impartir movilidad en el floema por "captura ácida", un atributo deseable para la acción herbicida y por lo tanto se podría incorporar a nuevos herbicidas con fines de movilidad. También se describe aquí un mecanismo de creación de los HTC. Existen muchos potenciales herbicidas comerciales y experimentales que pueden servir como sustratos para AAD-12. Por lo tanto, el uso de los presentes genes también puede producir tolerancia a los herbicidas a los otros herbicidas también.

Los rasgos de HTC de la presente invención se pueden usar en nuevas combinaciones con otros rasgos HTC (que incluyen pero sin limitación la tolerancia al glifosato). Estas combinaciones de rasgos dan origen a nuevos métodos de control de especies de malas hierbas (y similares), debido a la resistencia recién adquirida o tolerancia inherente a los herbicidas (por ejemplo, glifosato). Por lo tanto, además de los rasgos de HTC, se describen nuevos métodos para el control de malas hierbas utilizando herbicidas, para los cuales la tolerancia a los herbicidas fue creada por dicha enzima en cultivos transgénicos..

Esta invención se puede aplicar en el contexto de la comercialización de un rasgo de resistencia 2,4-D apilado con por ejemplo, rasgos de resistencia al glifosato actuales en la soja. Por lo tanto, esta invención proporciona una herramienta para combatir los cambios en las especies de malas hierbas de hoja ancha turnos y/o la selección de malas hierbas de hoja ancha resistentes a los herbicidas, que termina con la dependencia extremadamente alta de los productores sobre el glifosato para el control de malas hierbas con diversos cultivos.

La expresión transgénica de los genes de AAD-12 presentes se ejemplifica en, por ejemplo, Arabidopsis, tabaco, soja, algodón, arroz, maíz y cáñola. La soja es un cultivo preferido para la transformación. Sin embargo, se puede usar en otros múltiples cultivos monocotiledóneos (tales como pastos o césped) y los cultivos de dicotiledóneas como alfalfa, trébol, especies de árboles, y otros. Del mismo modo, 2,4-D (u otros sustratos de AAD-12) se pueden utilizar de manera más positiva en los cultivos de pastos donde la tolerancia es moderada, y el aumento de la tolerancia a través de este rasgo puede proporcionar a los cultivadores la oportunidad de utilizar estos herbicidas a tasas más eficaces y en un tiempo de aplicación más amplio sin el riesgo de daño al cultivo.

Aún más, la presente invención se basa en un único gen que puede proporcionar resistencia a los herbicidas que controlan las malas hierbas de hoja ancha. Este gen se puede usar en múltiples cultivos para permitir el uso de una combinación de herbicidas de amplio espectro. La presente invención puede controlar las malas hierbas resistentes a los productos químicos actuales, y ayuda en el control del cambio de los espectros de malas hierbas como resultado de las prácticas agronómicas actuales. AAD-12 presente también se puede utilizar en los esfuerzos para desintoxicar efectivamente sustratos herbicidas adicionales a las formas no herbicidas. Por lo tanto, se posibilita el desarrollo de rasgos HTC adicionales y/o tecnología del marcador seleccionable.

Aparte de o además del uso de los presentes genes para producir HTC, los presentes genes también se pueden usar como marcadores seleccionables para la selección de transformantes con éxito en cultivos celulares, invernaderos, y en el campo. Hay un alto valor inherente para los presentes genes simplemente como un marcador seleccionable para proyectos de biotecnología. La promiscuidad de AAD-12 para otros herbicidas auxínicos de ariloxialcanoato proporciona muchas oportunidades para utilizar este gen para fines de HTC y/o marcadores seleccionables.

Proteínas (y cepas fuente). Se describen proteínas funcionales. Por "actividad funcional" (o "activo") se entiende en este documento que las proteínas/enzimas para uso de acuerdo con la presente invención tienen la capacidad de degradar o disminuir la actividad de un herbicida (solo o en combinación con otras proteínas). Las plantas productoras de proteínas de acuerdo con la presente invención preferentemente producirán "una cantidad efectiva" de la proteína de modo que cuando la planta se trata con un herbicida, el nivel de expresión de la proteína es suficiente para volver a la planta completa o parcialmente resistentes o tolerantes al herbicida (a una tasa típica, a menos que se especifique lo contrario, las tasas de aplicación típicas se pueden hallar por ejemplo en el Herbicide Handbook bien conocido (Weed Science Society of America, Octava edición, 2002)). El herbicida se puede aplicar a tasas que normalmente eliminarían a la planta blanco, en las tasas de uso y concentraciones de campo normales. (Debido a la presente invención, el nivel y/o la concentración opcionalmente pueden ser superiores a las que se utilizaron previamente). Preferiblemente, las células de plantas y las plantas de la presente invención están protegidas contra la inhibición del crecimiento o lesión causada por el tratamiento herbicida. Las plantas y células de plantas transformadas preferiblemente se convirtieron en resistentes o tolerantes a un herbicida, como se discute en la presente, lo que significa que las plantas y células de plantas transformadas pueden crecer en la presencia de cantidades efectivas de uno o más herbicidas como se discute en la presente. Las proteínas preferidas tienen actividad catalítica para metabolizar uno o más compuestos de ariloxialcanoato.

Se puede discutir fácilmente el término "resistencia" y no utilizar el verbo "tolerar" o el adjetivo "tolerante". La industria ha pasado innumerables horas debatiendo sobre cultivos con tolerancia a herbicidas (HTC) frente a los cultivos resistentes a herbicidas (HRC). HTC es un término preferido en la industria. Sin embargo, la definición de la Weed Science Society of America de resistencia es "la capacidad heredada de una planta para sobrevivir y reproducirse después de la exposición a una dosis de herbicida normalmente letal para el tipo salvaje. En una planta, la resistencia puede ser de origen natural o provocada por técnicas tales como la ingeniería genética o la selección de variantes producidas por cultivo de tejidos o mutagénesis". Tal como se usa en el presente documento a menos que se indique lo contrario, la "resistencia" a herbicidas es heredable y permite a una planta crecer y reproducirse en presencia de un tratamiento efectivo como herbicida típico con un herbicida para una planta dada, como se sugiere en la presente edición de The Herbicide Handbook con respecto a la presentación de la presente descripción. Como es reconocido por los expertos en la técnica, una planta todavía se puede considerar "resistente" aun cuando algún grado de daño a las plantas de la exposición herbicida sea evidente. Tal como se utiliza en la presente, el término "tolerancia" es más amplio que el término "resistencia", e incluye "resistencia" como se define en la presente, así una capacidad mejorada de una planta en particular para soportar los diversos grados de lesión inducidos por el herbicida que normalmente produce plantas de tipo salvaje del mismo genotipo en la misma dosis herbicida.

La transferencia de la actividad funcional a los sistemas de planta o bacterianos puede involucrar una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica la secuencia de aminoácidos para una proteína de la presente invención, integrada en un vector de expresión de la proteína adecuada para el huésped en el que el vector residirá. Una manera de obtener una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína con actividad funcional es aislar el material genético nativo de las especies bacterianas que producen la proteína de interés, usando la información deducida de la secuencia de la proteína de aminoácidos, como se describe en la presente. Las secuencias nativas se pueden optimizar para la expresión en las plantas, por ejemplo, como se describe con más detalle a continuación. Un polinucleótido optimizado también se puede diseñar sobre la base de la secuencia de proteínas.

Se describen clases de proteínas que tienen actividades novedosas como se identifica en la presente. Una manera de caracterizar estas clases de proteínas y los polinucleótidos que los codifican es mediante la definición de un polinucleótido por su capacidad de hibridar, bajo una variedad de condiciones especificadas, con una secuencia de nucleótidos ejemplificada (el complemento de la misma y/o una sonda o sondas derivadas de cualquiera de las cadenas) y/o por su capacidad para ser amplificadas por PCR usando cebadores derivados de las secuencias ejemplificadas.

Existen numerosos métodos para la obtención de proteínas para usar de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos para las proteínas descritas en la presente se pueden usar para identificar y aislar otras proteínas a partir de una mezcla de proteínas. Específicamente, se pueden generar anticuerpos para las porciones de las proteínas que son más conservadas o más distinta, en comparación con otras proteínas relacionadas. Estos anticuerpos luego se pueden usar para identificar específicamente proteínas equivalentes con la actividad característica mediante inmunoprecipitación, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), o inmunotransferencia. Los anticuerpos para estas proteínas descritas en la presente, o a las proteínas equivalentes, o fragmentos de estas proteínas, se pueden preparar fácilmente usando métodos estándar. Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, producidos preferentemente en respuesta a una proteína ejemplificada o sugerida.

Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que las proteínas (y genes) se pueden obtener de una variedad de fuentes. Debido a que se conocen operones de degradación del herbicida entero que se codifican en elementos transponibles tales como plásmidos, así como proteínas genómicamente integradas, las proteínas de la presente invención se pueden obtener a partir de una amplia variedad de microorganismos, por ejemplo, que incluyen bacterias recombinante y/o de tipo salvaje.

Las mutantes de cepas bacterianas se pueden preparar por métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los mutantes asporógenos se pueden obtener a través de la mutagénesis con sulfonato de etilmetano (EMS) de una cepa. Las cepas mutantes también se pueden obtener mediante el uso de luz ultravioleta y nitrosoguanidina por métodos bien conocidos en la técnica.

Una proteína "de" u "obtenible a partir de" cualquiera de las cepas presentes mencionada o sugerida en la presente significa que la proteína (o una proteína similar) se pueden obtener a partir de la cepa o alguna otra fuente, tal como otra cepa bacteriana o una planta. "Derivado de" también tiene esta connotación, e incluye las proteínas obtenibles a partir de un determinado tipo de bacteria que se modifican por ejemplo, para la expresión en una planta. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que, dada la descripción de un gen y la proteína bacteriana, una planta se puede manipular genéticamente para producir la proteína. Las preparaciones de anticuerpos, sondas de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADR, ARN o PNA), y similares se pueden preparar usando las secuencias de polinucleótidos y/o aminoácidos descritas en la presente y se utilizan para detectar y recuperar otros genes relacionados de otras fuentes (naturales).

Se pueden usar técnicas de biología molecular estándares para clonar y secuenciar los genes y proteínas descritos en este documento. Información adicional puede encontrarse en Sambrook et al, 1,989.

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

Los polinucleótidos se pueden utilizar para formar "genes" completos para codificar proteínas o péptidos en una célula huésped deseada. Por ejemplo, como el experto en la técnica reconocerá fácilmente, los presentes polinucleótidos se pueden colocar apropiadamente bajo el control de un promotor en un huésped de interés, tal como se conoce fácilmente en la técnica. El nivel de expresión de genes y la expresión específica temporal/tejido puede afectar en gran medida la utilidad de la invención. Generalmente, mayores niveles de expresión de la proteína de un gen degradativo producirán una degradación más rápida y más completa de un sustrato (en este caso un herbicida blanco). Los promotores desearán expresar el gen blanco a niveles altos a menos que la alta expresión tenga un impacto negativo consecuente en la salud de la planta. Por lo general, se desearía tener el gen AAD-12 expresado constitutivamente en todos los tejidos para la protección completa de la planta en todas las etapas de crecimiento. Sin embargo, se puede usar alternativamente un gen de resistencia expresado vegetativamente; esto permitiría el uso del herbicida blanco en el cultivo para el control de malas hierbas y posteriormente, poder controlar la reproducción sexual del cultivo blanco mediante la aplicación durante la etapa de floración. Además, los niveles y tiempos de expresión deseados también pueden depender del tipo de planta y el nivel de tolerancia deseado. Se pueden usar promotores constitutivos fuertes en combinación con potenciadores de la transcripción y similares para aumentar los niveles de expresión y mejorar la tolerancia a los niveles deseados. Algunas de estas aplicaciones se discuten con más detalle a continuación, antes de la sección de Ejemplos.

Como los expertos en la materia saben, el ADN normalmente existe en una forma de cadena doble. En esta disposición, una cadena es complementaria a la otra cadena y viceversa. A medida que se replica el ADN en una planta (por ejemplo), se producen cadenas complementarias adicionales de ADN. La "cadena codificadora" se utiliza a menudo en la técnica para referirse a la cadena que se une con la cadena anti-sentido. El ARNm se transcribe a partir de las cadenas "anti-sentido" de ADN. La cadena de "sentido" o "codificadora" tiene una serie de codones (un codón es de tres nucleótidos que pueden ser leídos como una unidad de tres residuos 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 utiliza como molde para la proteína. Se describe el uso de los polinucleótidos ejemplificados mostrados en el listado de secuencias adjunto y/o equivalentes que incluyen las cadenas complementarias. Se describen ARN y PNA (ácidos nucleicos peptídicos) que son funcionalmente equivalentes a las moléculas de ADN ejemplificados.

Las cepas bacterianas se pueden cultivar bajo condiciones que producen alta multiplicación del microbio. Después de tratar el microbio para proporcionar el ácido nucleico genómico monocatenario, el ADN se puede contactar con los cebadores de la invención y se sometió a amplificación por PCR. Los fragmentos característicos de genes de interés serán amplificados por el método, de este modo que identifica la presencia del gen de interés.

Las proteínas y los genes para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden identificar y obtener mediante por ejemplo el uso de sondas de oligonucleótidos. Estas sondas son secuencias de nucleótidos detectables que pueden ser detectables en virtud de una marca adecuada o se pueden obtener intrínsecamente 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 PNA. Además de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), y uracilo (U; para las moléculas de ARN), sondas sintéticas (y polinucleótidos) de la presente invención también pueden tener inosina (una base neutra capaz de aparearse con las cuatro bases, a veces utilizado en lugar de una mezcla de las cuatro bases en sondas sintéticas) y/u otras bases sintéticas (no naturales). En consecuencia, cuando un oligonucleótido degenerado sintético se menciona en la presente y "N" o "n" se usa genéricamente, "N" o "n" puede ser G, A, T, C, o inosina. Los códigos de ambigüedad en la presente memoria están de conformidad con los convenios de denominación de IUPAC estándar a partir de la presentación de la presente solicitud (por ejemplo, R significa A o G, Y significa C o T, etc.).

Como es bien conocido en la técnica, si una molécula de sonda se hibrida con una muestra de ácido nucleico, se puede suponer razonablemente que la sonda y la muestra tienen homología/similitud/identidad sustancial. Preferiblemente, la hibridación del polinucleótido se llevo a cabo primero seguido de lavados en condiciones de baja, moderada o alta rigurosidad por técnicas bien conocidas en la materia, como se describe en, por ejemplo, DNA Probes, Stockton Press, New York, NY, pp. 169-170. Por ejemplo, como se indica en la misma, las condiciones de baja rigurosidad se pueden lograr mediante en lavado primero con 2x SSC (solución salina de citrato estándar) SDS 0,1% (dodecil sulfato de sodio) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Dos lavados se realizan normalmente. Luego se puede lograr una mayor rigurosidad mediante la reducción de la concentración de sal y/o elevación de la temperatura. Por ejemplo, el lavado descrito anteriormente puede ser seguido por dos lavados con SSC 0,1x/SDS 0,1% durante 15 minutos cada uno a temperatura ambiente, seguido por lavados posteriores con 0,1x SSC/0,1% SDS durante 30 minutos cada uno a 55 °C. Estas temperaturas se pueden usar con otros protocolos de hibridación y

de lavado expuestas en la presente, y como puede ser conocido por los expertos en la técnica (por ejemplo, se puede usar SSPE como la sal en lugar de SSC). El SSC 2x/SDS 0,1% se puede preparar mediante la adición de 50 ml de 20x SSC y 5 ml de 10% SDS a 445 ml de agua. 20x SSC se puede preparar mediante la combinación de NaCl (175,3 g/0,150 M), citrato de sodio (88,2 g/0,015 M), y agua, ajustando el pH a 7,0 con NaOH 10 N, a continuación, se ajusta el volumen a 1 litro. Se puede preparar SDS 10% disolviendo 10 g de SDS en 50 ml de agua esterilizada en autoclave, posteriormente se diluye hasta 100 ml.

La detección de la sonda proporciona un medio para determinar de una manera conocida si la hibridación se ha mantenido. Tal análisis de la sonda proporciona un método rápido para identificar genes de la presente invención. Los segmentos de nucleótidos utilizados como sondas pueden ser sintetizados utilizando un sintetizador de ADN y métodos estándar. Estas secuencias de nucleótidos también se pueden utilizar como cebadores de PCR para los amplificar genes de la presente invención.

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

Tal como se usa en la presente, las condiciones "rigurosas" para la hibridación se refieren a las condiciones que logran el mismo, o aproximadamente el mismo grado de especificidad de la hibridación que las condiciones empleadas por los solicitantes actuales. Específicamente, la hibridación del ADN inmovilizado en las transferencias Southern con sondas específicas del gen marcadas con ³²P se puede realizar por métodos estándares (véase, por ejemplo, Maniatis et al, 1982). En general, la hibridación y los lavados posteriores pueden llevarse a cabo bajo condiciones que permiten la detección de secuencias blanco. Para las sondas de genes de ADN de cadena doble, 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, solución de Denhardt 5x, SDS 0,1%, ADN desnaturalizado 0,1 mg/ml. La temperatura de fusión se describe mediante la siguiente fórmula (Beltz et al., 1983):

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

Los lavados se pueden llevar a cabo normalmente de la siguiente manera:

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

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

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

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

(Suggs et al., 1981).

Los lavados se pueden llevar a cabo normalmente de la siguiente manera:

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

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

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

Baja: 1 o 2x SSPE, temperatura ambiente

Baja: 1 o 2x SSPE, 42°C

Moderado: 0,2x o 1x SSPE, 65°C

Alto: 0,1x SSPE, 65°C.

La formación y estabilidad del dúplex depende de la complementariedad sustancial entre las dos cadenas de un híbrido, y, como se señaló anteriormente, se puede tolerar un cierto grado de falta de coincidencia. Por lo tanto, las secuencias de la sonda de la presente invención incluyen mutaciones (tanto simples como múltiples), supresiones,

inserciones de las secuencias descritas, y combinaciones de los mismos, donde dichas mutaciones, inserciones y supresiones permiten la formación de híbridos estables con el polinucleótido blanco de interés. Las mutaciones, inserciones, y supresiones pueden producirse en una secuencia de polinucleótidos dada de muchas maneras, y estos métodos son conocidos por los expertos en la materia. Otros métodos se pueden dar a conocer en el futuro.

5 Tecnología PCR. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una síntesis activada, enzimática repetitiva de una secuencia de ácidos nucleicos. Este método es bien conocido y comúnmente utilizado por los expertos en esta técnica (véase, Mullis, patente U.S. Nros 4.683.195, 4.683.202, y 4.800.159; Saiki et al., 1985). PCR se basa en la
10 amplificación enzimática de un fragmento de ADN de interés que está flanqueado por dos cebadores de oligonucleótidos que hibridan con cadenas opuestas de la secuencia blanco. Los cebadores se orientan preferiblemente con los extremos 3' apuntando uno hacia el otro. Los ciclos repetidos de desnaturalización por calor del molde, apareamiento de los cebadores a sus secuencias complementarias, y extensión de los cebadores hibridados con una ADN polimerasa produce la amplificación del segmento definido por los extremos 5' de los
15 cebadores de PCR. El producto de extensión de cada cebador puede servir como un molde para el otro cebador, por lo que cada ciclo duplica esencialmente la cantidad de fragmento de ADN producida en el ciclo anterior. Esto produce la acumulación exponencial del fragmento blanco específico, hasta varios millones de veces en unas pocas horas. Mediante el uso de una ADN polimerasa termoestable tal como polimerasa Taq, aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, el proceso de amplificación puede ser completamente automatizado. Otras enzimas que pueden utilizarse son conocidas por los expertos en la técnica.

20 Las secuencias de ADN ejemplificado, o segmentos de los mismos, se pueden utilizar como cebadores para la amplificación PCR. En la realización de la amplificación por PCR, se puede tolerar un cierto grado de falta de coincidencia entre el cebador y el molde. Por lo tanto, se pueden usar las mutaciones, supresiones e inserciones (especialmente adiciones de nucleótidos al extremo 5') de los cebadores ejemplificados. Las mutaciones, inserciones, y supresiones se pueden producir en un cebador dado mediante métodos conocidos por un experto en la técnica.

25 Modificación de genes y proteínas. Los presentes genes y proteínas se pueden fusionar a otros genes y proteínas para producir proteínas quiméricas o de fusión. Los genes y proteínas útiles incluyen no sólo las secuencias de longitud completa ejemplificadas específicamente, pero también porciones, segmentos y/o fragmentos (que incluyen fragmentos contiguos y supresiones internas y/o terminales en comparación con las moléculas de longitud completa) de estas secuencias, variantes, mutantes, quiméricos y fusiones de los mismos. Las proteínas pueden tener
30 aminoácidos sustituidos siempre que retengan la actividad funcional. Las "variantes" de los genes tienen secuencias de nucleótidos que codifican las mismas proteínas o proteínas equivalentes que tienen actividad equivalente o similar a una proteína ejemplificada.

35 Los dos mejores resultados de las búsquedas BLAST con la secuencia de nucleótidos aad-12 nativa muestran un nivel razonable de homología (aproximadamente 85%) de más de 120 pares de bases de secuencia. Se puede esperar que la hibridación en ciertas condiciones incluya estas dos secuencias. Ver GENBANK Acc. Nos DQ406818.1 (89.329.742; *Rhodospirillum rubrum*). AJ628860.1 y (44903451; *Sphingomonas*). *Rhodospirillum rubrum* es muy similar a *Delftia* pero *Sphingomonas* es una clase filogenética totalmente diferente.

40 Los términos "variantes de proteínas" y "proteínas equivalentes" se refieren a proteínas que tienen la misma o esencialmente la misma actividad biológica/funcional contra los sustratos blanco y secuencias equivalentes a las proteínas ejemplificadas. Tal como se usa en la presente, la referencia a una secuencia de "equivalente" se refiere a secuencias que tienen sustituciones, supresiones, adiciones o inserciones de aminoácidos que mejoran o que no afectan adversamente la actividad en un grado significativo. Los fragmentos que retienen actividad también están incluidos en esta definición. Los fragmentos y otros equivalentes que retienen la misma o similar función o actividad como un fragmento correspondiente de una proteína ejemplificada están dentro del alcance de la presente
45 invención. Los cambios, tales como sustituciones o adiciones de aminoácidos, se pueden realizar para una variedad de propósitos, tales como el aumento (o disminución) de la estabilidad de la proteína de la proteína (sin disminuir material/sustancialmente la actividad funcional de la proteína), eliminación o adición de un sitio de restricción, y similares. Las variaciones de los genes se pueden construirse fácilmente por ejemplo usando técnicas estándares para realizar mutaciones puntuales.

50 Además, la Patente U.S. Nº 5.605.793, por ejemplo, describe métodos para generar diversidad molecular adicional usando el reensamblaje de ADN después de la fragmentación aleatoria o centrada. Esto se puede denominar como "transposición" del gen que típicamente involucra mezclar fragmentos (de un tamaño deseado) de dos o más diferentes moléculas de ADN, seguido de rondas repetidas de renaturalización. Esto puede mejorar la actividad de una proteína codificada por un gen de partida. El resultado es una proteína quimérica que tiene una mejor actividad,
55 especificidad de sustrato alterada, aumento de la estabilidad de la enzima, estereoespecificidad alterada, u otras características.

60 La "transposición" se puede diseñar y dirigir después de obtener y examinar las coordenadas 3D atómicas (tridimensional) y la estructura cristalina de una proteína de interés. Por lo tanto, la "transposición centrada" se puede dirigir a determinados segmentos de una proteína que son ideales para la modificación, tal como los segmentos expuestos en la superficie, y preferiblemente no los segmentos internos que están involucrados con el plegamiento

de proteínas y la integridad estructural 3D esencial.

Los cambios específicos en el "sitio activo" de la enzima se pueden hacer para afectar a la funcionalidad de inherente con respecto a la actividad o la estereoespecificidad (véase el alineamiento de la Figura 2). Muller et. al. (2006). La estructura cristalina tauD conocida fue usada como dioxigenasa modelo para determinar los residuos del sitio activo, mientras que está unido a su taurina del sustrato inherente. Elkins y otros. (2002) "X-ray crystal structure of *Escherichia coli* taurine/alpha-cetoglutarato dioxigenase complexed to ferrous iron and substrates," *Biochemistry* 41(16):5185-5192. En cuanto a la optimización de la secuencia y facilidad de diseño de los sitios activos de enzimas, véase Chakrabarti et al, PNAS, (23 de agosto 2005), 102 (34): 12.035-12.040.

Las variantes de genes se pueden usar para producir variantes de proteínas; huéspedes recombinantes para producir las variantes de proteínas. Mediante el uso de estas técnicas de "transposición de genes", se pueden construir genes y proteínas equivalentes que comprenden los 5, 10, o 20 residuos contiguos (de aminoácidos o nucleótidos) de cualquier secuencia ejemplifica en la presente. Como los expertos en la técnica conocen, las técnicas de transposición 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, 288, 289, 290, 291, 292, o 293 residuos contiguos ((aminoácido o nucleótido), correspondiente a un segmento (del mismo tamaño) en cualquiera de las secuencias ejemplificadas o sugeridas (o los complementos (Complementos completos) de los mismos). Los segmentos de tamaño similar, especialmente los de regiones las conservadas, también se pueden utilizar como sondas y/o cebadores.

Los fragmentos de genes de longitud completa se pueden obtener usando exonucleasas o endonucleasas comercialmente disponibles de acuerdo con los métodos estándares. Por ejemplo, las enzimas tales como Bal31 o mutagénesis dirigida al sitio se pueden utilizar para cortar sistemáticamente nucleótidos de los extremos de estos genes. También, los genes que codifican fragmentos activos se pueden obtener usando una variedad de enzimas de restricción. Las proteasas se pueden usar para obtener directamente fragmentos activos de estas proteínas.

Las proteínas se pueden trincar y todavía retienen la actividad funcional. Por "proteína truncada" se entiende que una porción de una proteína se puede escindir, mientras que la proteína truncada restante conserva y exhibe la actividad deseada después de la escisión. La escisión se puede lograr mediante diversas proteasas. Además, las proteínas escindidas efectivamente se pueden producir usando técnicas de biología molecular en la que las bases de ADN que codifican dicha proteína se eliminan a través de la digestión con endonucleasas de restricción u otras técnicas disponibles para el experto en la materia. Después del truncamiento, dichas proteínas se pueden expresar en sistemas heterólogos tales como *E. coli*, baculovirus, sistemas virales de origen vegetal, levadura, y similares, y posteriormente se coloca en ensayos de insectos descritos en la presente para determinar la actividad. Es bien conocido en la técnica que las proteínas truncadas se pueden producir con éxito de modo de retener la actividad funcional, mientras que tiene menos de la de la secuencia de longitud completa entera. Por ejemplo, las proteínas Bt se pueden usar de forma truncada (proteína del núcleo) (véase, por ejemplo, Höfte et al. (1989), y Adang et al. (1985)). Como se usa en la presente, el término "proteína" puede incluir truncamientos funcionalmente activos.

En algunos casos, especialmente para la expresión en plantas, puede ser ventajoso utilizar genes truncados que expresan proteínas truncadas. Los genes truncados preferidos típicamente codifican 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 completa

Ciertas proteínas se han ejemplificado específicamente en la presente. Como estas proteínas son meramente ilustrativas, debe ser fácilmente evidente qué variantes o equivalentes de proteínas (y secuencias de nucleótidos que codifican equivalentes de las mismas) que tienen la misma o similar actividad de las proteínas ejemplificadas son posibles. Las proteínas equivalentes tendrán semejanza de aminoácidos (y/u homología) con una proteína ejemplificada. La identidad de aminoácidos será típicamente 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 también se pueden definir en términos de intervalos de identidad y/o semejanza particular. Por ejemplo, la identidad y/o semejanza 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% en comparación con una secuencia ejemplificada o sugerida en la presente. Cualquier número que aparece arriba se puede utilizar para definir los límites superior e inferior.

A menos que se especifique lo contrario, como se usa en la presente, el porcentaje de identidad y/o semejanza de secuencia de dos ácidos nucleicos se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, modificado como en Karlin y Altschul 1993. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se realizan con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12.

El BLAST con brecha se puede utilizar como se describe en Altschul et al., 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST y BLAST con brecha, se usan los parámetros por defecto de los respectivos programas (NBLAST y BLAST). Véase el sitio NCBI/NIH. Para obtener alineamientos con brechas con fines comparativos, la función AlignX de Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., North Bethesda, MD, U.S.A), se utilizó empleando los parámetros predeterminados. Estos fueron: una penalización de apertura de brecha de 15, una penalización de extensión de brecha e 6,66 y un intervalo de penalización por separación de la brecha de 8.

Varias propiedades y características tridimensionales de la proteína también se pueden cambiar sin afectar adversamente la actividad/funcionalidad de la proteína. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden ser toleradas/realizadas para no afectar adversamente la actividad y/o configuración de tridimensional de la molécula. Los aminoácidos se pueden colocar en las siguientes clases: no polares, polares sin carga, básicos y ácidos. Las sustituciones conservadoras por las cuales un aminoácido de una clase es reemplazado con otro aminoácido del mismo tipo se hallan dentro del alcance de la presente invención siempre que la sustitución no sea adversa a 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

En algunos casos, también se pueden realizar sustituciones no conservadoras. Sin embargo, las sustituciones preferidas no disminuyen significativamente de la actividad funcional/biológica de la proteína.

Como se usa en la presente, la referencia a polinucleótidos "aislados" y/o proteínas "purificadas" se refiere a estas moléculas cuando no están asociadas con las otras moléculas con las que se pueden encontrar en la naturaleza. Por lo tanto, la referencia a "aislado" y/o "purificado" significa la participación de la "mano del hombre" como se describe en la presente. Por ejemplo, un "gen" bacteriano de la presente invención puesto en una planta para la expresión es un "polinucleótido aislado". Del mismo modo, 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 diferentes secuencias de ADN puede codificar las secuencias de aminoácidos descritas en la presente. Está bien dentro de la experiencia de una persona entrenada en la técnica para crear secuencias de ADN alternativas que codifican las mismas o esencialmente las mismas proteínas. Estas secuencias de variantes de ADN están dentro del alcance de la presente invención. Esto también se discute en más detalle a continuación en la sección titulada "Optimization of sequence for expression in plants."

Optimización de la secuencia para la expresión en las plantas. Para obtener una alta expresión de genes heterólogos en plantas en general se prefiere rediseñar los genes de modo que se expresan de manera más eficiente en (el citoplasma de) las células de la planta. El maíz es una de tales plantas donde se puede preferir volver a diseñar el gen heterólogo antes de la transformación para aumentar el nivel de expresión del mismo en dicha planta. Por lo tanto, una etapa adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana es la reingeniería de un gen heterólogo para la expresión óptima, utilizando el sesgo de codón más estrechamente alineado con la secuencia de planta blanco, sea una especie de dicotiledónea o monocotiledónea. Las secuencias también se pueden optimizar para la expresión en cualquiera de los tipos más particulares de plantas discutidos en otra parte de la presente.

Huéspedes transgénicos. Los genes que codifican proteínas se pueden introducir en una amplia variedad de huéspedes microbianos o de plantas, incluyendo células de plantas transgénicas y plantas transgénicas. Las plantas preferidas (y células de plantas) son maíz, Arabidopsis, tabaco, soja, algodón, cáñola, arroz, trigo, césped, forrajes de leguminosas (por ejemplo, alfalfa y trébol), pastos, y similares. También se pueden obtener otros tipos de plantas transgénicas, tales como frutas, hortalizas, plantas ornamentales y árboles. Más generalmente, las dicotiledóneas y/o monocotiledóneas se pueden utilizar en diversos aspectos de la presente invención.

En realizaciones preferidas, la expresión de los genes genera directa o indirectamente la producción intracelular (y mantenimiento) de la proteína de interés. Las plantas se pueden convertir en resistentes a los herbicidas de esta manera. Tales huéspedes se pueden denominar como huéspedes y/o célula transgénicas, recombinantes, transformadas y/o células transfectadas. En algunos aspectos de esta invención (por ejemplo, cuando se clona y prepara el gen de interés), las células microbianas (preferiblemente bacterianas) se pueden producir y utilizar de acuerdo con las técnicas estándares, con el beneficio de la presente descripción.

Las células de plantas transfectadas con un polinucleótido se pueden regenerar en plantas enteras. Son posibles cultivos de células, que incluyen cultivos de tejidos de células, cultivos líquidos y cultivos sembrados. Se describen semillas producidas por y/o utilizadas para generar plantas, otros tejidos y partes de plantas, y métodos de producción de plantas o células que comprenden un polinucleótido. Un método de producir tales plantas es mediante la plantación de una semilla.

Si bien se pueden preferir las plantas, también se incluye la producción de AAD-12 recombinante muy activa, por ejemplo en una cepa huésped de *Pseudomonas fluorescens* (Pf). También se describen las temperaturas de crecimiento preferidas para mantener AAD-12 activo soluble en este huésped; una condición de fermentación donde se produce AAD-12 como más de 40% de proteína celular total o al menos 10 g/L; un proceso de purificación da como resultado una alta recuperación de AAD-12 recombinante activa de un huésped Pf; un esquema de purificación que produce al menos 10 g AAD-12 activo por kg de células; un esquema de purificación que puede producir 20 g de AAD-12 activo por kg de células; un proceso de formulación que puede almacenar y restaurar la actividad de AAD-12 en la solución; y un proceso de liofilización que puede retener la actividad de AAD-12 para almacenamiento y vida útil a largo plazo.

Inserción de genes para formar huéspedes transgénicos. Un aspecto es la transformación/transfección de plantas, células vegetales, y otras células huésped con los polinucleótidos que expresan proteínas descritas aquí. Las plantas transformadas de esta manera pueden volverse resistentes a una variedad de herbicidas con diferentes modos de acción.

Una amplia variedad de métodos están disponibles para la introducción de un gen que codifica una proteína deseada en el huésped deseado en condiciones que permiten el mantenimiento y la expresión estable del gen. Estos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de U.S. Nº 5.135.867.

Se describen vectores que comprenden un polinucleótido AAD-12. Por ejemplo, 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 están disponibles para la preparación para la inserción de genes extraños en plantas superiores. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, la serie pUC, la 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 utiliza para la transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutriente adecuado, después se recolectaron y se lisaron. El plásmido se recupera mediante purificación del ADN genómico. El análisis de secuencias, análisis de restricción, electroforesis y otros métodos biológicos bioquímico-moleculares se llevan a cabo generalmente como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN usada se puede digerir por restricción y unir a la siguiente secuencia de ADN. Cada secuencia de plásmido se puede clonar en el mismo o en otros plásmidos. De acuerdo con el método de inserción de los genes deseados en la planta, otras secuencias de ADN pueden ser necesarias. Si, por ejemplo, el plásmido Ti o Ri se utiliza para la transformación de la célula de planta, entonces al menos el límite derecho, pero a menudo el límite derecho y el izquierdo del ADN-T del plásmido Ti o Ri, se debe unir como la región flanqueante de los genes por insertar. El uso de T-ADN para la transformación de las células de planta ha sido intensamente investigado y descrito en el documento EP 120 516; Hoekema (1985); Fraley et al. (1986); y An et al. (1985).

Un gran número de técnicas están disponibles para insertar ADN en una célula huésped de la planta. Esas técnicas incluyen la transformación con T-ADN utilizando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformación, fusión, inyección, biolística (bombardeo de micropartículas), filamentos de carburo de silicio, radiación con aerosol, PEG o electroporación, así como otros métodos posibles. Si se usan agrobacterias para la transformación, el ADN para insertar tiene que ser clonado en plásmidos especiales, a saber, en un vector intermedio o en un vector binario. Los vectores intermedios se pueden integrar en el plásmido Ti o Ri mediante 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 no pueden replicarse a sí mismos en agrobacterias. El vector intermedio se puede transferir a *Agrobacterium tumefaciens* por medio de un plásmido auxiliar (conjugación). Los vectores binarios pueden replicarse tanto en *E. coli* como en agrobacterias. Comprenden un gen marcador de selección y un ligador o poliligador que están enmarcados por las regiones límite derecha e izquierda del ADN-T. Se pueden transformar directamente en agrobacterias (Holsters, 1978). El *Agrobacterium* usado como célula huésped es para comprender un plásmido que lleva una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia del ADN-T en la célula de planta. El ADN-T adicional puede estar contenido. La bacteria así transformada se utiliza para la transformación de las células de planta. Los explantes de las plantas se pueden cultivar ventajosamente con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para la transferencia del ADN en la célula de planta. Las plantas enteras después se pueden regenerar a partir del material

vegetal infectado (por ejemplo, trozos de hoja, segmentos de tallo, raíces, pero también protoplastos o células cultivadas en suspensión) en un medio adecuado, que puede contener antibióticos o biocidas para la selección. Las plantas así obtenidas después se pueden analizar para determinar la presencia del ADN insertado. No se realizan exigencias especiales de los plásmidos en el caso de inyección y electroporación. Es posible utilizar plásmidos ordinarios, tales como, por ejemplo, derivados de pUC.

Las células transformadas crecen dentro de las plantas de la manera usual. Pueden formar células germinales y transmitir el rasgo transformado en plantas de la progenie. Tales plantas se pueden cultivar de la manera normal y cruzar con plantas que tienen los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las propiedades fenotípicas correspondientes.

Los genes que codifican la proteína bacteriana se pueden expresar a partir de unidades transcripcionales insertadas en el genoma de la planta. Preferiblemente, dichas unidades transcripcionales son vectores recombinantes capaces de una integración estable en el genoma de la planta y permiten la selección de líneas de plantas transformadas que expresan el ARNm que codifican las proteínas.

Una vez que el ADN insertado se ha integrado en el genoma, es relativamente estable allí (y no sale de nuevo). Normalmente contiene un marcador de selección que confiere a las células de planta transformadas resistencia a un biocida o un antibiótico, tal como kanamicina, G418, bleomicina, higromicina o cloranfenicol, entre otras. Los marcadores seleccionables de planta típicamente también pueden proporcionar resistencia a varios herbicidas tales como glufosinato (por ejemplo, PAT/bar), glifosato (EPSPS), inhibidores de ALS (por ejemplo, imidazolinonas, sulfonilureas, triazopiridina sulfonanilida y otros), bromoxinilo, resistencia al inhibidor de HPPD, inhibidores de la PPO, los inhibidores de la ACC-asa, y muchos otros. El marcador empleado individualmente en consecuencia debe permitir la selección de células transformadas en vez de células que no contienen el ADN insertado. Los genes de interés se expresan preferiblemente mediante promotores constitutivos o inducibles en la célula de planta. Una vez expresado, el ARNm se traduce en proteínas, de este modo incorpora los aminoácidos de interés en la proteína. Los genes que codifican una proteína expresada en las células de planta 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 las células de planta y obtener plantas que mantienen de forma estable y expresan el gen introducido. Tales técnicas incluyen la introducción de material genético recubierto sobre micropartículas directamente en las células (Patentes U.S. Nros. 4,945.050 para Cornell y 5.141.13 para DowElanco, ahora Dow AgroSciences, LLC). Además, las plantas pueden transformarse utilizando la tecnología de *Agrobacterium*, ver las patentes U.S. Nros 5.177.010 para University of Toledo.; 5.104.310 para Texas A & M; Solicitud de Patente Europea 0131624B1; Solicitud de patente europea 120.516, 159418B1 y 176.112 de Schilperoot; patentes U.S. Nros 5.149.645, 5.469.976, 5.464.763 y 4.940.838 y 4.693.976 para Schilperoot.; Solicitudes de patente europea 116.718, 290.799, 320.500, todas para Max Planck; Solicitudes de patente europea 604.662 y 627.752, y patente U.S. N.º 5.591.616, para Japan Tobacco; Solicitudes de patente europea 0267159 y 0292435, y patente U.S. N.º 5.231.019, todas para Ciba Geigy, ahora Syngenta; patentes U.S. Nros. 5.463.174 y 4.762.785, ambas de Calgene.; y patentes U.S. Nros. 5.004.863 y 5.159.135, ambas para Agracetus. Otra tecnología de transformación incluye la tecnología de los filamentos (whiskers). Ver las patentes U.S. Nros. 5.302.523 y 5.464.765, ambas para Zeneca, ahora Syngenta. Otra tecnología de transformación por administración directa de ADN incluye la tecnología de haz de aerosol. Véase la Patente U.S. N.º 6.809.232. La tecnología de electroporación también se ha utilizado para transformar plantas. Véase el documento WO 87/06614 de Boyce Thompson Institute; patentes U.S. Nros. 5.472.869 y 5.384.253, ambas de Dekalb.; y los documentos WO 92/09696 y WO 93/21335, ambos para Plant Genetic Systems. Además, los vectores virales también se pueden usar para producir plantas transgénicas que expresan la proteína de interés. Por ejemplo, las plantas monocotiledóneas se pueden transformar con un vector viral utilizando los métodos descritos en la Patente U.S. N.º 5.569.597 de Mycogen Plant Science y Ciba-Geigy (ahora Syngenta), así como las patentes U.S. Nros. 5.589.367 y 5.316.931, ambas de Biosource, ahora Large Scale Biology.

Como se mencionó previamente, la manera en que se introduce el constructo de ADN en el huésped de planta no es crítica. Se puede emplear cualquier método que proporciona la transformación eficiente. Por ejemplo, diversos métodos para la transformación de células vegetales se describen en el presente documento e incluyen el uso de plásmidos Ti o Ri y similares para realizar la transformación mediada por *Agrobacterium*. En muchos casos, será deseable tener el constructo usado para la transformación limitado en uno o ambos lados por límites de ADN-T, más específicamente el límite derecho. Esto es particularmente útil cuando el constructo utiliza *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como modo para la transformación, aunque los límites de ADN-T se pueden usar con otros modos de transformación. Cuando se utiliza *Agrobacterium* para la transformación de células de planta, se puede usar un vector que se puede introducir en el huésped para la recombinación homóloga con ADN-T o el plásmido Ti o Ri presente en el huésped. La introducción del vector se puede realizar a través de la electroporación, apareamiento triparental y otras técnicas para transformar bacterias gram-negativas que son conocidas para los expertos en la técnica. La manera de transformación del vector en el huésped *Agrobacterium* no es crítica. El plásmido Ti o Ri que contiene el ADN-T para la recombinación puede ser capaz o incapaz de provocar la formación de agallas, y no es crítico para dicha invención siempre que los genes vir estén presentes en dicho huésped.

En algunos casos donde se utiliza *Agrobacterium* para la transformación, el constructo de expresión que está dentro de los límites de T-ADN se insertará en un vector de amplio espectro, como pRK2 o derivados del mismo como se describe en Ditta et al. (1980) y EPO 0 120 515. Se incluye dentro del constructo de expresión y el ADN-T será uno o más marcadores, como se describe en la presente, lo que permite la selección del *Agrobacterium* transformado y las células de planta transformadas. El marcador particular empleado no es esencial, el marcador preferido depende del huésped y el constructo utilizado.

Para la transformación de células de planta utilizando *Agrobacterium*, los explantes se pueden combinar e incubar con el *Agrobacterium* transformado durante un tiempo suficiente para permitir la transformación de los mismos. Después de la transformación, las agrobacterias son destruidas por la selección con los antibióticos apropiados y las células de planta se cultivan con el medio selectivo apropiado. Una vez que se forman los callos, se puede estimular la formación de brotes empleando las hormonas vegetales apropiadas de acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica de cultivo de tejido vegetal y la regeneración de la planta. Sin embargo, una etapa intermedia de callo no siempre es necesaria. Después de la formación de brotes, dichas células de planta se pueden transferir al medio que estimula la formación de raíces de este modo se completa la regeneración de plantas. Las plantas después se pueden dejar crecer a semilla y dicha semilla se puede utilizar para establecer futuras generaciones. Independientemente de la técnica de transformación, el gen que codifica una proteína bacteriana se incorpora preferiblemente en un vector de transferencia de gen adaptado para expresar dicho gen en una célula de planta mediante la inclusión en el vector de un elemento regulador promotor de la planta, así como regiones de terminación transcripcional no traducidas 3' tales como Nos y similares.

Además de numerosas tecnologías para transformar las plantas, también puede variar el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes extraños. Tal tejido puede incluir, pero no estaría limitado a tejido embriogénico, tejido de callo tipos I, II y III, hipocótilo, meristema, raíz de tejidos, tejidos para la expresión en el floema, y similares. Casi todos los tejidos de plana se pueden transformar durante la desdiferenciación utilizando técnicas apropiadas descritas en la presente.

Como se mencionó anteriormente, se puede utilizar, si se desea una variedad de marcadores seleccionables. La preferencia por un marcador particular es a criterio del experto, pero se puede usar cualquiera de los siguientes marcadores seleccionables junto con cualquier otro gen no listado en la presente que puede funcionar como un marcador seleccionable. Tales marcadores seleccionables incluyen, pero sin limitación un gel de aminoglicósido fosfotransferasa del transposón Tn5 (Aph II) que codifica la resistencia a los antibióticos kanamicina, neomicina y G41; resistencia a la higromicina; resistencia a metotrexato, así como los genes que codifican para la resistencia o tolerancia a glifosato; fosfotricina (bialafos o glufosinato); herbicidas inhibidores de ALS (herbicidas de imidazolinonas, sulfonilureas y triazopirimidina), inhibidores de ACC-asa (por ejemplo, ariloxipropionatos o ciclohexanodionas), y otros tales como bromoxinilo, e inhibidores de HPPD (por ejemplo, mesotriona) y similares.

Además de un marcador seleccionable, puede ser deseable utilizar un gen indicador. En algunos casos, un gen indicador se puede utilizar 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 las proteínas resultantes en algún cambio fenotípico o propiedad enzimática. Los ejemplos de tales genes se proporcionan en Weising et al., 1988. Los genes indicadores preferidos incluyen la beta glucuronidasa (GUS) del locus *uidA* de *E. coli*, el gen de acetil transferasa cloranfenicol de Tn9 de *E. coli*, la proteína fluorescente verde de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*, y los genes de luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis*. Un ensayo para detectar la expresión del gen indicador se puede llevar a cabo después en un momento adecuado después de que dicho gen se ha introducido en las células receptoras. Un ensayo preferido implica el uso del gen que codifica de beta-glucuronidasa (GUS) del locus *uidA* de *E. coli* como se describe en Jefferson et al., (1987) para identificar las células transformadas.

Además de los elementos reguladores del promotor de la planta, los elementos reguladores promotores procedentes de una variedad de fuentes se pueden utilizar de manera eficiente en las células de planta para expresar genes extraños. Por ejemplo, se pueden usar los elementos reguladores promotores de origen bacteriano, tales como el promotor de la octopina sintasa, el promotor de la nopalina sintasa, el promotor de manopina sintasa; promotores de origen viral, tales como el virus del mosaico de la coliflor (35S y 19S), 35T (que es un promotor 35S re-manipulado genéticamente, ver la Patente U.S. N.º 6.166.302, especialmente Ejemplo 7E) y similares. Los elementos reguladores promotor de planta incluyen, pero sin limitación ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP) subunidad pequeña de la carboxilasa (ssu), promotor de beta-conglicina, promotor de beta-faseolina, promotor de ADH, promotores de choque térmico, y promotores específicos de tejido. Otros elementos tales como las regiones de unión a la matriz, regiones de unión al andamiaje, intrones, potenciadores, secuencias de poliadenilación y similares pueden estar presentes y por lo tanto puede mejorar la eficiencia de la transcripción o la integración del ADN. Tales elementos pueden o no ser necesarios para la función del ADN, aunque pueden proporcionar una mejor expresión o funcionamiento del ADN al afectar la transcripción, estabilidad de ARNm y similares. Tales elementos pueden estar incluidos en el ADN como se desee para obtener un rendimiento óptimo del ADN transformado en la planta. Los elementos típicos incluyen, pero sin limitación a *Adh*-intrón 1, *Adh*-intrón 6, la secuencia líder de la proteína de cubierta del virus del mosaico de la alfalfa, secuencias UTR de osmotina, la secuencia líder de la proteína de cubierta del virus estriado del maíz, así como otras disponibles para un experto en la técnica. Los elementos reguladores del promotor constitutivo también se pueden usar de este modo dirigiendo la expresión génica continua en todos los tipos de células y en todo momento (por ejemplo, actina, ubiquitina, CaMV 35S, y similares). Los elementos

reguladores del promotor específico de tejido son responsables de la expresión génica en tipos de células o tejidos específicos, tales como las hojas o las semillas (por ejemplo, zeína, oleosina, napina, ACP, globulina y similares) y estos también se pueden usar.

Los elementos reguladores del promotor también puede ser activos (o inactivos) durante una determinada etapa de desarrollo de la planta, así como activos en tejidos y órganos de las plantas. Los ejemplos de estos incluyen, pero sin limitación elementos reguladores del promotor específico del polen, específico del embrión, específica de los filamentos del maíz, específicos de la fibra de algodón, específicos de raíz, específicos del endospermo de semilla, o específicos de la fase vegetativa y similares. Bajo ciertas circunstancias, puede ser deseable utilizar 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, productos químicos (respuesta a la tetraciclina), y estrés. Se pueden usar otros elementos de transcripción y traducción deseables que funcionan en las plantas. Numerosos vectores de transferencia génica específicos de plantas son conocidos en la técnica.

Los sistemas basados de ARN virales de planta también se pueden usar para expresar la proteína bacteriana. Al hacerlo de ese modo, el gen que codifica una proteína se puede insertar en la región promotora de cubierta de un virus de planta adecuado que infectará la planta huésped de interés. La proteína después se puede expresar de este modo lo que proporciona una protección de la planta del daño herbicida. Los sistemas basados en ARN viral de planta se describen en la patente U.S. N° 5.500.360 a Mycogen Plant Sciences, Inc. y las patentes U.S. Nos 5.316.931 y 5.589.367 a Biosource, ahora Large Scale Biology.

Medios de aumentar adicionalmente los niveles de tolerancia o tolerancia. En la presente se muestra que a las plantas descritas aquí se le pueden impartir nuevos rasgos de resistencia a herbicidas sin efectos adversos observables en el fenotipo que incluyen rendimiento. Las plantas ejemplificadas y sugeridas en la presente pueden soportar niveles de aplicación típicos 2X, 3X, 4X y 5X, por ejemplo, de al menos un herbicida presente. Se consideran mejoras en estos niveles de tolerancia Por ejemplo, varias técnicas se conocen en la materia, y se pueden optimizar previsiblemente) y desarrollar adicionalmente, para aumentar la expresión de un gen dado.

Uno de tales métodos incluye el aumento del número de copias de los presentes genes AAD-12 (en casetes de expresión y similares). Los eventos de transformación también se pueden seleccionar para los que tienen múltiples copias de los genes.

Los promotores y potenciadores fuertes se pueden usar para "sobrecargar" la expresión. Los ejemplos de tales promotores incluyen el promotor 35T preferido que utiliza potenciadores 35S. Los promotores 35S de ubiquitina de maíz, ubiquitina de Arabidopsis, actina de A.T. y de CSMV se incluyen para tales usos. También se prefieren Otros promotores virales fuertes. Los potenciadores incluyen 4 OCS y el doble potenciador 35S. Las regiones de unión a la matriz (MARs) también se pueden usar por ejemplo, para aumentar la eficiencia de transformación y expresión de los transgenes.

La transposición (evolución dirigida) y los factores de transcripción también se pueden usar.

Las variantes de proteínas también se pueden diseñar de forma que difieren en el nivel de secuencia, pero que retienen la misma o similar estructura tridimensional esencial total, distribución de carga de superficie, y similares. Véase, por ejemplo Patente de U.S. N° 7.058.515; Larson et al., Protein Sci. 2002 11: 2804-2813, "Thoroughly sampling sequence space: Large-scale protein design of structural ensembles."; Cramer y otros., 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. and Stemmer, W.P.C.1996. Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. Nature Medicine 2: 100-103; and Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P.C. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. Nature Biotechnology 14: 315-319.

La actividad de los polinucleótidos recombinantes insertados en células de plantas puede depender de la influencia de ADN de planta endógena adyacente al inserto. Por lo tanto, otra opción es tomar ventaja de los eventos que se sabe que son excelentes ubicaciones en un genoma de la planta para las inserciones. Véase, por ejemplo, documento WO 2005/103266 A1, relativa a eventos de algodón cry1F y cry1Ac; el gen AAD-12 presente se puede sustituir en los loci genómico en lugar de las inserciones cry1F y/o Cry1Ac. Por lo tanto, la recombinación homóloga dirigida, por ejemplo, se puede utilizar de acuerdo con la presente invención. Este tipo de tecnología es el tema de, por ejemplo, documento WO 03/080809 A2 y la correspondiente solicitud U.S publicada (USPA 20030232410), en relación con el uso de dedos de zinc para la recombinación dirigida. El uso de recombinasas (por ejemplo, cr-lox y flp-frt) también se conoce en la técnica.

Se cree que la desintoxicación de AAD-12 ocurre en el citoplasma. Por lo tanto, se consideran los medios para estabilizar aún más esta proteína y ARNm (incluyendo el bloqueo de la degradación del ARNm) y en consecuencia las técnicas conocidas en la técnica se pueden aplicar. Las proteínas de la presente se pueden diseñar para resistir

la degradación por proteasas y similares (sitios de escisión de la proteasa puede ser eliminado eficazmente por la reingeniería de la secuencia de aminoácidos de la proteína). Tales realizaciones incluyen el uso de 5' y 3' de estructuras de bucle y tallo 5' y 3' como UTR de osmotina, y per5 (secuencias 5' no traducidas ricas en AU). También se pueden utilizar capuchones 5' como los grupos 7- metilo o 2'-O- metilo, por ejemplo, residuo de ácido 7-metilguanílico. Véase, por ejemplo: Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. Vol. 74, No. 7, pp. 2734-2738 (julio de 1977) *Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis*. También se pueden usar los complejos de proteínas o grupos de bloqueo del ligando.

El diseño computacional de UTR 5' o 3' más adecuado para AAD-12 (horquillas sintéticas) también puede llevarse a cabo. El modelado por computadora en general, así como la transposición de genes y la evolución dirigida, se discuten en otra parte de la presente. Más específicamente con respecto a la modelado por computadora y UTRs, técnicas de modelado por computadora ordenador para su uso en la predicción/evaluación de derivados de UTR 5' y 3' de la presente invención incluyen, pero sin limitación: MFold versión 3.1 disponible en Genetics Corporation Group, Madison, WI (ver Zucker y otros., Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In RNA Biochemistry and Biotechnology, 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker y otros., Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. J. Mol. Biol. 288, 911-940 (1999); Zucker y otros., RNA Secondary Structure Prediction. In Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry S. Beaucage, D.E. Bergstrom, C.D. Glick, and 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, Nuci. Acids Res. 1994, 22: 2079-2088) que está libremente distribuido como código fuente y que se puede descargar mediante el acceso al sitio web genetics.wustl.edu/eddy/software/, y FOLDALIGN, también libremente distribuido y disponible para descargar en el sitio web bioinf.au.dk. FOLDALIGN, (ver Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences. J. Gorodkin, L. J. Heyer and G. D. Stormo. Nucleic Acids Research, Vol. 25, no. 18 pp 3724-3732, 1997; Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences J. Gorodkin, L. J. Heyer, and G. D. Stormo. ISMB 5;120-123, 1997).

Las realizaciones se pueden utilizar en conjunto con mutantes de evolución natural o inducidos químicamente (las mutantes se pueden seleccionar mediante las técnicas de análisis, después se transformaron con AAD-12 y posiblemente otros genes). Las plantas descritas aquí se pueden combinar con la resistencia a ALS y/o resistencia al glifosato evolucionado. La resistencia aminopiraldida, por ejemplo, también se puede combinar o "apilar" con un gen AAD-12.

Las técnicas de mejoramiento tradicionales también se pueden combinar con métodos descritos aquí para combinar poderosamente, introducir y mejorar las características deseadas.

Otras mejoras también incluyen el uso de antídotos apropiados para proteger aún más las plantas y/o añadir resistencia cruzada a más herbicidas. (Los antídotos normalmente actúan para aumentar el sistema inmunológico de las plantas mediante la activación/expresión de cP450. Los antídotos son agentes químicos que reducen la fitotoxicidad de los herbicidas a las plantas de cultivo por un mecanismo fisiológico o molecular, sin comprometer la eficacia de control de malas hierbas).

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

Los antídotos comercializados se pueden utilizar para la protección de cultivos de gramíneas de semilla grande, tal como maíz, sorgo y arroz de siembra húmeda, contra herbicidas de incorporados antes de la plantación o aplicados en preemergencia de las familias de tiocarbamato y cloroacetanilidas. Los antídotos también se han desarrollado para proteger los cultivos de cereales de invierno, tales como el trigo contra aplicaciones pos-emergencia de herbicidas de ariloxifenoxipropionato y sulfonilurea. El uso de antídotos para la protección de maíz y arroz contra los herbicidas de sulfonilurea, imidazolinona, ciclohexanodiona, isoxazol, y trictones también está bien establecido. Una mejora inducida por los antídotos de desintoxicación de herbicidas en las plantas con antídoto es ampliamente aceptado como el principal mecanismo involucrado en la acción del antídoto. Los antídotos inducen cofactores tales como glutatión y enzimas desintoxicantes 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 pp. 45-001434467.

El uso de un gen de citocromo P450 monooxigenasa apilado con AAD-12 es una realización preferida. Hay P450 involucradas en el metabolismo de los herbicidas; CP450 puede ser por ejemplo de origen mamífero o una planta. En las plantas superiores, la citocromo P450 monooxigenasa (P450) es conocida por llevar a cabo el metabolismo secundario. También cumple un papel importante en el metabolismo oxidativo de los xenobióticos en cooperación con NADPH citocromo P450 oxidoreductasa (reductasa). Se ha informado resistencia a algunos herbicidas como resultado del metabolismo por P450, así como la glutatión S-transferasa. Numerosas especies de P450 microsomal involucradas en el metabolismo de xenobióticos en los mamíferos se han caracterizado mediante clonación

molecular. Se informó que algunos de estos metabolizan varios herbicidas de manera eficiente. Así, las plantas transgénicas con P450 de plantas o mamíferos pueden mostrar resistencia a varios herbicidas.

Una realización preferida de la 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 (como Treflan4p). Tal resistencia en la soja y/o maíz está incluida en algunas realizaciones preferidas. Para orientación adicional con respecto a este tipo de realizaciones, véase, por ejemplo 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* a través de *Agrobacterium tumefaciens* que utiliza citocromo P450 monooxygenasas humanas que metabolizan herbicidas; plántulas tolerantes a herbicidas se transformaron y seleccionaron con los herbicidas acetoclor, amiprofos-metilo, clorprofam, clorsulfurona, norflurazona, y pendimetalina); Siminszky et al., "Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenilurea herbicides," *PNAS* Vol. 96, Issue 4, 1750-1755, February 16, 1999; Sheldon y otros, *Weed Science*: Vol. 48, No. 3, pp. 291-295, "A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*"; and "Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolaclor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19," *J Agric Food Chem.* 2006 Apr 19;54(8):2985-91 (en relación con el análisis de una citocromo P450 monooxygenasa humana en el arroz, donde las plantas de arroz según los informes mostraron alta tolerancia a cloroacetamidas (acetoclor, alaclor, metolaclor, pretilaclor, y tenilclor), oxiacetamidas (mefenacet), piridazinonas (norflurazona), 2,6-dinitroanilinas (trifluralina y pendimetalina), fosfamidados (amiprofos-metilo, tiocarbamatos (piributicarb), y ureas (clortolurona).

También existe la posibilidad de alterar o usar diferentes químicas 2,4-D para que hacer más eficientes los presentes genes de AAD-12. Tales cambios posibles incluyen la creación de mejores sustratos y mejores grupos salientes (mayor electronegatividad).

Los inhibidores del transporte de auxina (por ejemplo diflufenzopir) también se pueden utilizar para aumentar la actividad herbicida con 2,4-D.

A menos que se indique o implique específicamente, los términos "un", "una" y "el/la" significan "al menos uno", como se usa en el presente documento.

Los siguientes son ejemplos que ilustran los métodos para la práctica de la invención. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezclas de disolventes son en volumen a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1 — Procedimiento para identificar genes que imparten resistencia a 2A-D en la planta

Como una manera de identificar los genes que poseen actividades de degradación de herbicidas en planta, es posible explorar las bases de datos públicas actuales, tales como NCBI (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología). Para comenzar el proceso, es necesario tener una secuencia de gen funcional ya identificada que codifica una proteína con las características deseadas (es decir, la actividad α -cetoglutarato dioxigenasa). Esta secuencia de la proteína se utiliza entonces como la entrada para el algoritmo BLAST (Básico Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997) para comparar con las secuencias de proteínas NCBI depositadas disponible. Mediante el uso de ajustes predeterminados, esta búsqueda devuelve más de 100 secuencias de proteínas homólogas a diferentes niveles. Estas varían desde altamente idénticas (85-98%) a identidad muy baja (23-32%) en el nivel de aminoácidos. Tradicionalmente se puede esperar que solo las secuencias con alta homología retengan propiedades similares a la secuencia de entrada. En este caso, solo se eligieron las secuencias con $\leq 50\%$ de homología. Como se ejemplifica en la presente, la clonación y expresión recombinante de homólogos con conservación de aminoácidos como mínimo de 31% (en relación con *tfdA* de *Ralstonia eutropha*) se puede utilizar para impartir los niveles comerciales de resistencia no solo para el herbicida deseado, sino también a sustratos no probado previamente con estas enzimas.

Un gen único (*sdpA*) se identificó a partir de la base de datos NCBI (véase el sitio web ncbi.nlm.nih.gov; acceso MF516752) como un homólogo con solo 31% de identidad de aminoácidos con *tfdA*. El porcentaje de identidad se determinó primero mediante la traducción de las secuencias de ADN de *sdpA* y *tfdA* depositadas en la base de datos a las proteínas, a continuación, se usa el ClustalW en el paquete de software VectorNTI para realizar el alineamiento de secuencias múltiples.

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

2.1 — Antecedentes.

Para obtener mayores niveles de expresión de genes heterólogos en las plantas, se puede preferir la reingeniería de la secuencia que codifica la proteína de los genes de modo que se expresen de manera más eficiente en las células de plantas. El maíz es una de tales plantas donde se puede preferir el rediseño de la región codificadora de la proteína heteróloga antes de la transformación para aumentar el nivel de expresión del gen y el nivel de proteína codificada en la planta. Por lo tanto, una etapa adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana

es la reingeniería de un gen heterólogo para la expresión óptima.

Una razón para la reingeniería de una proteína bacteriana para la expresión en el maíz es debido al contenido de G + C no óptimo del gen nativo. Por ejemplo, el muy bajo contenido de G + C de muchos genes nativos bacterianos (y el consiguiente sesgo hacia el alto contenido de A + T) produce la generación de secuencias que imitan o duplican las secuencias de control de genes de plantas que se sabe que son altamente ricas en A + T. La presencia de algunas secuencias ricas en A + T dentro del ADN del gen introducidas en las plantas (por ejemplo, regiones de caja TATA que se encuentran normalmente en los promotores de genes) pueden producir la transcripción aberrante del gen. Por otro lado, la presencia de otras secuencias regulatorias que residen en el ARNm transcrito (por ejemplo, secuencias señal de poliadenilación (AAUAAA), o secuencias complementarias para los ARN nucleares pequeños implicados en el empalme de pre-ARNm) puede llevar a la inestabilidad del ARN. Por lo tanto, un objetivo en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana para la expresión de maíz, más preferiblemente denominado como gen optimizado de planta, es generar una secuencia de ADN que tiene un contenido de G + C mayor, y preferiblemente uno cerca de la de genes del maíz que codifican enzimas metabólicas. Otro objetivo en el diseño del gen optimizado de planta que codifica una proteína bacteriana es generar una secuencia de ADN en la que las modificaciones de la secuencia no dificulten la traducción.

La Tabla 3 ilustra qué tan alto es el contenido de G + C en el maíz. Para los datos de la Tabla 3, las regiones codificadoras de los genes se extrajeron de las entradas de GenBank (versión 7-1), y las composiciones de bases se calcularon utilizando el programa MacVector™ (Accelrys, San Diego, California). Las secuencias de los intrones se ignoraron en los cálculos.

Tabla 3: Compilación de los contenidos de G + C de regiones codificadoras de proteína de los genes de maíz

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

^a Número de genes de la clase dada entre paréntesis.

^b Desviaciones estándares dadas entre paréntesis.

^c Grupos combinados promedio ignorados en el cálculo de la media

Debido a la plasticidad provista por la redundancia/degeneración del--código genético (es decir, algunos aminoácidos se especifican en más de un codón), la evolución de los genomas en diferentes organismos o clases de organismos ha dado como resultado el uso diferencial de los codones redundantes. Este "sesgo de codón" se refleja en la composición de bases media de las regiones codificadoras de proteínas. Por ejemplo, los organismos con contenidos relativamente bajos de G + C utilizan codones que tienen A o T en la tercera posición de los codones redundantes, mientras que los que tienen mayores contenidos de G + C utilizan codones que tienen G o C en la tercera posición. Se cree que la presencia de codones "menores" dentro de un ARNm puede reducir la velocidad de traducción absoluta de ese ARNm, especialmente cuando la abundancia relativa del ARNt cargado que corresponde al codón menor es baja. Una extensión de esto es que la disminución de la velocidad de traducción por los codones menores individuales puede ser al menos aditiva para múltiples codones menores. Por lo tanto, los ARNm que tienen altos contenidos relativos de codones menores pueden tener velocidades de traducción correspondientemente bajas. Esta tasa se puede reflejar en los bajos niveles subsiguientes de la proteína codificada.

En la ingeniería de genes que codifican una proteína bacteriana para la expresión en maíz (u otra planta, tales como algodón o soja), se ha determinado el sesgo de codones de la planta. 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 preferido se muestra en la Tabla 4. Después de determinar el sesgo, se determina el porcentaje de frecuencia de los codones en el gen de interés. Se debe determinar los codones primarios preferidos por la planta, así como la segunda, tercera y cuarta opciones de codones preferidos cuando existen múltiples opciones. Se puede diseñar una nueva secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína bacteriana, pero la nueva secuencia de ADN difiere de la secuencia de ADN bacteriano nativo (que codifica la proteína) por la sustitución de los codones de la planta (primero preferido, segundo preferido, tercero preferido o cuarto preferido) para especificar el aminoácido en cada posición dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína. A continuación se analiza la nueva secuencia por los sitios de enzimas de restricción que podrían haberse creado por la modificación. Los sitios identificados se modifican adicionalmente reemplazando los codones con codones de primera, segunda, tercera, o cuarta elección preferida. Otros sitios de la secuencia que podrían afectar a la transcripción o traducción del gen de interés son las uniones

exón:ntrón (5 'o 3'), señales de adición de poliA, o señales de terminación de ARN polimerasa. La secuencia se analiza adicionalmente y se modifica para reducir la frecuencia de dobletes TA o GC. Además de los dobletes, los bloques de secuencias G o C que tienen más de aproximadamente cuatro residuos que son iguales pueden afectar a la transcripción de la secuencia. Por lo tanto, estos bloques también se modifican mediante la sustitución de los codones de primera o segunda elección, etc., con el siguiente codón de elección preferido.

Tabla 4. Codones de aminoácidos preferidos para las proteínas expresadas en maíz

Aminoácido	Codón*
Alanina	GCC/GCG
Cisteína	TGC/TGT
Ácido aspártico	GAC/GAT
Ácido glutámico	GAG/GAA
Fenilalanina	TTC/TTT
Glicina	GGC/GGG
Histidina	CAC/CAT
Isoleucina	ATC/ATT
Lisina	AAG/AAA
Leucina	CTG/CTC
Metionina	ATG
Asparagina	AAC/AAT
Prolina	CCG/CCA
Glutamina	CAG/CAA
Arginina	AGG/CGC
Serina	AGC/TCC
Treonina	ACC/ACG
Valina	GTG/GTC
Triptófano	TGG
Tirosina	TAC/TAT
Detención	TGA/TAG

Se prefiere que el gen optimizado de planta que codifica una proteína bacteriana contenga aproximadamente 63% de codones de primera elección, entre aproximadamente 22% a aproximadamente 37% segunda codones de elección, y entre aproximadamente 15% a aproximadamente 0% codones de tercera o cuarta elección, en el que el porcentaje total es 100%. El más preferido es el gen optimizado de planta que contiene aproximadamente 63% de codones de primera elección, al menos aproximadamente 22% codones de segunda elección, aproximadamente 7,5% codones de tercera elección, y aproximadamente 7,5% codones de cuarta elección, en el que el porcentaje total es 100%. El método descrito anteriormente permite a un experto en la técnica modificar los genes que son extraños para una planta en particular de manera que los genes se expresan de manera óptima en las plantas. El método se ilustra adicionalmente en la solicitud PCT WO 97/13402.

Por lo tanto, con el fin de diseñar genes optimizados en la plantas que codifican una proteína bacteriana, se diseña una secuencia de ADN para codificar la secuencia de aminoácidos de dicha proteína utilizando un código genético redundante establecido de una tabla de sesgo de codón compilada a partir de las secuencias génicas para la planta o plantas particulares. La secuencia de ADN resultante tiene un mayor grado de diversidad de codones, una composición de base deseable, puede contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción estratégicamente colocados y carece de secuencias puedan interferir en la transcripción del gen, o la traducción del ARNm producto.

En consecuencia, los genes sintéticos que son funcionalmente equivalentes a las proteínas/genes de la presente invención se pueden utilizar para transformar huéspedes, que incluyen las plantas. La orientación adicional en cuanto a la producción de genes sintéticos se puede encontrar en, por ejemplo, la Patente U.S N.º 5.380.831.

2.2 — Análisis de la reconstrucción de AAD-12 de planta.

- 5 El análisis extenso de los pares de bases 876 (pb) de la secuencia de ADN de la región codificadora de AAD-12 nativa (SEQ ID NO: 1) reveló la presencia de varios motivos de secuencia que se consideraron perjudiciales para expresión en plantas óptima, así como una composición de codón no óptima. La proteína codificada por SEQ ID NO: 1 (AAD-12) se presenta como SEQ ID NO: 2. Para mejorar la producción de la proteína recombinante en monocotiledóneas así como dicotiledóneas, se desarrolló una secuencia de ADN de AAD-12 "optimizada en planta" (v1) (SEQ-ID NO: 3) fue desarrollado que codifica una proteína (SEQ ID NO: 4), que es la misma que la SEQ ID NO: 2 nativa excepto por la adición de un residuo de alanina en la segunda posición (subrayada en la SEQ ID NO: 4). El
- 10 codón de alanina adicional (GCT; subrayado en la SEQ ID NO: 3) codifica parte de un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NcoI (CCATGG) que abarca el codón de inicio de la traducción ATG. Por lo tanto, sirve al doble propósito de facilitar las operaciones de clonación posteriores al tiempo que mejora el contexto de la
- 15 secuencia que rodea el codón de inicio ATG para optimizar iniciación de la traducción. Las proteínas codificadas por las regiones codificadoras nativas y optimizadas en planta (v1) son 99,3% idénticas, solo difieren en el número de aminoácidos 2. En contraste, las secuencias de ADN nativas y optimizadas en planta (v1) de las regiones codificadoras son sólo 79,7% idénticas. La Tabla 5 muestra las diferencias en las composiciones de codones de las secuencias nativas (Columnas y D) y las secuencias optimizadas en planta (Columnas B y E), y permite la
- 20 comparación de una secuencia optimizada en plantas teórica (columnas C y F).

Tabla 5. Comparación de las composiciones de codones de regiones codificadoras de AAD-12 nativa, versión optimizada en planta (v1) y versión optimizada en planta teórica.

		A	B	C			D	E	F
Amino-ácido	Codón	Nativo #	Opt planta v1#	Opt planta teórica. #	Aminoácido	Codón	Nativo #	Opt planta v1#	Opt planta teórica. #
ALA (A)	GCA	1	10	11	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	35	16	15		CTC	1	8	8
	GCG	7	0	0		CTG	23	0	0
	GCT	0	18	17		CTT	0	8	8
ARG (R)	AGA	0	4	5	LYS (K)	TTA	0	0	0
	AGG	0	4	6		TTG	0	8	8
	CGA	0	0	0		AAA	1	1	2
	CGC	15	6	4		AAG	5	5	4
	CGG	3	0	0	MET (M)	—	—	—	—
	CGT	0	4	3		ATG	10	10	10
ASN (N)	AAC	3	2	2	PHE (F)	TTC	7	5	5
	AAT	1	2	2		TTT	1	3	3
ASP (D)	GAC	15	9	9	PRO (P)	CCA	0	5	6
	GAT	2	8	8		CCC	9	4	4
CYS (C)	TGC	3	2	2		CCG	5	0	0
	TGT	0	1	1	SER (S)	CCT	0	5	5
END	TAA	1	0	1		AGC	5	4	3
	TAG	0	0			AGT	0	0	0
						TCA	0	3	3

	TGA	0	1			TCC	2	3	3
GLN (Q)	CAA	1	8	7		TCG	6	0	0
	CAG	13	6	7		TCT	0	3	3
GLU (E)	GAA	3	4	4	THR (T)	ACA	1	4	5
	GAG	8	7	7		ACC	11	7	7
GLY (G)	GGA	0	8			ACG	5	0	0
	GGC	24	7	7		ACT	1	7	6
	GGG	1	3	4	TRP (W)	TGG	8	8	8
	GGT	0	7	7	TYR (Y)	TAC	4	3	3
HIS (H)	CAC	8	9	9		TAT	1	2	2
	CAT	8	7	7	VAL (V) i	GTA	0	0	0
ILE (I)	ATA	0	2	2		GTC	6	8	7
	ATC	10	4	5		GTG	18	8	9
	ATT	1	5	4		GTT	0	8	8
	Totales	163	164	163		Totales	130	130	130

Es evidente a partir del examen de la Tabla 5 que las regiones codificadoras nativas y optimizadas en plantas, si bien codifican proteínas casi idénticas, son sustancialmente diferentes entre sí. La versión optimizada en planta (v1) imita la composición del codón de una región codificadora optimizada en planta teórica que codifica la proteína AAD-12.

2.3 Reconstrucción para la expresión en E. coli

Las cepas de *Escherichia coli* especialmente manipuladas genéticamente y los sistemas de vectores asociados a menudo se utilizan para producir cantidades relativamente grandes de proteínas para estudios bioquímicos y analíticos. A veces se encuentra que un gen nativo que codifica la proteína deseada no es muy adecuado para expresión de alto nivel en *E. coli*, aun cuando el organismo fuente para el gen puede ser otro género de bacterias. En tales casos, es posible y deseable rediseñar la región codificadora de la proteína del gen para hacerla más adecuada para la expresión en *E. coli*. Los genes *E. coli* de Clase II se definen como aquellos que se expresan alta y continuamente durante la fase de crecimiento exponencial de células de *E. coli*. (Henaut, A. and Danchin, A. (1996) in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology, vol. 2, pp. 2047-2066. Neidhardt, F., Curtiss III, R., Ingraham, J., Lin, E., Low, B., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H. (eds.) American Society for Microbiology, Washington, DC). A través del examen de las composiciones de codones de las regiones codificadoras de genes de *E. coli* de clase II, se puede idear una composición de codones media para estas regiones codificadoras de genes *E. coli* de Clase II. Se considera que una región codificadora de proteína que tiene una composición media de codones que imita de los genes de Clase II se verá favorecida para la expresión durante la fase de crecimiento exponencial de *E. coli*. Mediante el uso de estas directrices, se diseñó una nueva secuencia de ADN que codifica la proteína AAD-12 (SEQ ID NO: 4); que incluye la de acuerdo con la composición media de codón de las regiones codificadoras de los genes de Clase II. La secuencia inicial, cuyo diseño se basó únicamente en la composición del codón, se diseñó para incluir ciertas secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción adecuadas para la clonación en vectores de expresión de *E. coli*. Las características de secuencia perjudiciales tales como estructuras de horquilla altamente estables se evitaron, al igual que las secuencias intragénicas homólogas para el extremo 3' del ARN ribosómico 16S (es decir, secuencias de Shine Dalgarno) La secuencia optimizada en *E. coli* (v2) se describe como SEQ ID NO: 5 y codifica la proteína descrita en la SEQ ID NO: 4.

Las secuencias de ADN (v2) nativas y optimizadas en *E. coli* son 84,0% idénticas, mientras que las secuencias de ADN optimizadas en planta (v1) y las optimizadas en *E. coli* (v2) son 76,0% idénticas. La Tabla 6 presenta las composiciones de codones de la región codificadora AAD-12 nativa (columnas A y D), una región codificadora de AAD-12 optimizada para la expresión en *E. coli* (v2; columnas B y E) y la composición de codón de la región codificadora teórica para la proteína AAD-12 que tiene una composición de codones óptima de los genes de *E. coli* de clase II (las columnas C y F).

Tabla 6. Comparaciones de la composición de codón de las regiones codificadoras de AAD-12 nativa, versión optimizada en *E. coli* (v2) y una versión optimizada de clase II en *E. coli* teórica.

		A	B	C	I		D	E	F
Amino-ácido	Codón	Nativo #	Opt en <i>E. coli</i> v2 #	Clase II teórica II #	Amino-ácido	Codón	Nativo #	Opt en <i>E. coli</i> v2 #	Clase II teórica #
ALA (A)	GCA	1	13	13	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	35	0	0		CTC	1	2	0
	GCG	7	18	17		CTG	23	20	24
	GCT	0	13	14		CTT	0	1	0
ARG (R)	AGA	0	0	0	LYS (K)	TTA	0	1	0
	AGG	0	0	0		TTG	0	0	0
	CGA	0	0	0		AAA	1	4	5
	CGC	15	6	6	MET (M)	AAG	5	2	1
	CGG	3	0	0		ATG	10	10	10
	CGT	0	12	12		TTC	7	6	6
ASN (N)	AAC	3	4	4	PHE (F)	TTT	1	2	2
	AAT	1	0	0		TTA	0	0	0
ASP (D)	GAC	15	10	9	PRO (P)	CCA	0	3	2
	GAT	2	7	8		CCC	9	0	0
CYS (C)	TGC	3	2	2	SER (S)	CCG	5	11	12
	TGT	0	1	1		CCT	0	0	0
END	TAA	1	1	1		AGC	5	4	4
	TAG	0	0	0		AGT	0	0	0
	TGA	0	0	0		TCA	0	0	0
GLN (Q)	CAA	1	3	3		TCC	2	5	4
	CAG	13	11	11		TCG	6	0	0
GLU (E)	GAA	3	8	8	THR (T)	TCT	0	4	5
	GAG	8	3	3		ACA	1	0	0
GLY (G)	GGA	0	0	0		ACC	11	12	12
	GGC	24	12	11		ACG	5	0	0
	GGG	1	0	0		ACT	1	6	6
	GGT	0	13	14		TRP (W)	TGG	8	8
HIS (H)	CAC	8	11	11	TYR (Y)	TAC	4	3	3
	CAT	8	5	5		TAT	1	2	2
ILE (I)	ATA	0	0	0	VAL (V)	GTA	0	6	6
						GTC	6	0	0

	ATC	10	7	7		GTG	18	8	7
	ATT	1	4	4		GTT	0	10	11
	Totales	163	164	164		Totales	130	130	130

Es evidente a partir del examen de la Tabla 6 que las regiones codificadoras nativas y optimizadas en *E. coli*, si bien codifican proteínas casi idénticas, son sustancialmente diferentes entre sí. La versión optimizada en *E. coli* (v2) imita estrechamente la composición de codón de una región codificadora optimizada en *E. coli* teórica que codifica la proteína AAD-12.

2,4 — Diseño de una secuencia de ADN con sesgo de codón de soja que codifica una EPSPS de soja que tiene mutaciones que confieren tolerancia de glifosato. Este ejemplo enseña el diseño de una nueva secuencia de ADN que codifica una 5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfato sintasa de soja mutada (EPSPS), pero está optimizada para la expresión en células de soja. La secuencia de aminoácidos de una EPSPS de soja triplemente mutada se describe como la SEQ ID NO: 5 del documento WO 2004/009761. Los aminoácidos mutados en la secuencia así descrita son en el residuo 183 (treonina de la proteína nativa reemplazada por isoleucina), residuo 186 (arginina de la proteína nativa reemplazada por lisina), y residuo 187 (prolina de la proteína nativa reemplazada por serina). Por lo tanto, se puede deducir la secuencia de aminoácidos de la proteína de EPSPS de soja nativa mediante el reemplazo de los aminoácidos sustituidos de la SEQ ID NO: 5 del documento WO 2004/009761 con los aminoácidos nativos en las posiciones apropiadas. Tal secuencia de la proteína nativa se describe como SEQ ID NO: 20 del documento PCT/US2005/014737 (presentado el 2 de mayo de 2005). Una proteína de EPSPS de soja con mutación doble, que contiene una mutación en el residuo 183 (treonina de la proteína nativa reemplazada con isoleucina), y en el residuo 187 (prolina en la proteína nativa reemplazada con serina) se describe como SEQ ID NO: 21 del documento PCT/US2005/014,737.

Una tabla de uso de codones para las secuencias codificadoras de proteínas de la soja (*Glycine max*), calculado a partir de 362,096 codones (aproximadamente 870 secuencias codificadoras), se obtuvo de la "kazusa.or.jp/codon" sitio World Wide Web. —Estos datos se reformatearon como se muestra en la Tabla 7. Las columnas D y H de la Tabla 7 presentan las distribuciones (en % del uso de todos los codones para ese aminoácido) de codones sinónimos para cada aminoácido, como se encuentra en las regiones codificadoras de proteína de los genes de soja. Es evidente que algunos codones sinónimos para algunos aminoácidos (un aminoácido puede estar especificado por 1, 2, 3, 4, o 6 codones) están presentes relativamente rara vez en las regiones codificadoras de la proteína de soja (por ejemplo, comparar el uso de los codones GCG y GCT para especificar alanina). Una tabla de uso de codones sesgada de soja se calculó a partir de los datos en la Tabla 7. Los codones hallados en los genes de soja con menos de aproximadamente 10% de apariciones totales se ignoraron. Para equilibrar la distribución de las opciones de codones restantes para un aminoácido, se calculó una representación promedio ponderada para cada codón, usando la fórmula:

$$\% \text{ ponderado de C1} = 1(\% \text{ C1} + \% \text{ C2} + \% \text{ C3} + \text{etc.}) \times \% \text{ CI} \times 100$$

donde C1 es el codón en cuestión, C2, C3, etc. representan los restantes codones sinónimos, y los valores en % para los codones relevantes se toman de las columnas D y H de la Tabla 7 (ignorando los valores de codones raros en negrita). El valor de % ponderado para cada codón se indica en las columnas C y G de la Tabla 7. TGA se eligió arbitrariamente como el terminador de la traducción. Las frecuencias de uso de codones parciales se ingresaron en una tabla de código genético especializado para usar en el programa de diseño génico de OptGene™ (Ocimum Biosolutions LLC, Indianapolis, Indiana).

Tabla 7. Representación de codones sinónimos en secuencias codificadoras de proteína de soja, y cálculo de un conjunto de representación de codones sesgado para diseño de genes sintéticos optimizados en soja

A	B	C	D	E	F	G	H
Aminoácido	Codón	% ponderado	% en soja	Aminoácido	Codón	% ponderado	% en soja
ALA (A)	GCA	33,1	30,3	LEU (L)	CTA	DNU	9,1
	GCC	24,5	22,5		CTC	22,4	18,1
	GCG	DNU*	8,5		CTG	16,3	13,2
	GCT	42,3	38,7		CTT	31,5	25,5
ARG (R)	AGA	36,0	30,9		TTA	DNU	9,8

	AGG	32,3	27,6		TTG	29,9	24,2
	CGA	DNU	8,2	LYS (K)	AAA	42,5	42,5
	CGC	14,8	12,7		AAG	57,5	57,5
	CGG	DNU	6,0	MET (M) ATG		100,0	100
	CGT	16,9	14,5	PHE (F)	TTC	49,2	49,2
ASN (N)	AAC	50,0	50,0		TTT	50,8	50,8
	AAT	50,0	50,0	PRO (P)	CCA	39,8	36,5
ASP (D)	GAC	38,1	38,1		CCC	20,9	19,2
	GAT	61,9	61,9		CCG	DNU	8,3
CYS (C)	TGC	50,0	50,0		CCT	39,3	36,0
	TGT	50,0	50,0	SER (S)	AGC	16,0	15,1
END	TAA	DNU	40,7		AGT	18,2	17,1
	TAG	DNU	22,7		TCA	21,9	20,6
	TGA	100,0	36,6		TCC	18,0	16,9
GLN (Q)	CAA	55,5	55,5		TCG	DNU	6,1
	CAG	44,5	44,5		TCT	25,8	24,2
GLU (E)	GAA	50,5	50,5	THR (T)	ACA	32,4	29,7
	GAG	49,5	49,5		ACC	30,2	27,7
GLY (G)	GGA	31,9	31,9		ACG	DNU	8,3
	GGC	19,3	19,3		ACT	37,4	34,3
	GGG	18,4	18,4	TRP (W) TGG		100,0	100.
	GGT	30,4	30,4	TYR (Y)	TAC	48,2	48,2
HIS (H)	CAC	44,8	44,8		TAT	51,8	51,8
	CAT	55,2	55,2	VAL (V) GTA		11,5	11,5
ILE (I)	ATA	23,4	23,4		GTC	17,8	17,8
	ATC	29,9	29,9		GTG	32,0	32,0
	ATT	46,7	46,7		GTT	38,7	38,7

*DNU = No usar

Para derivar una secuencia de ADN de optimizado en soja que codifica la proteína EPSPS doblemente mutado, la secuencia de proteína de la SEQ ID NO: 21 de PCT/US2005/014737 se tradujo en forma inversa mediante el programa OptGene™ utilizando el código genético sesgado de soja anteriormente. La secuencia de ADN inicial así derivada luego se modificó mediante la compensación de los cambios de codones (mientras que se retiene la representación media ponderada global de los codones) para reducir el número de dobles de CT y TG entre los codones adyacentes, aumentar el número de dobles de CT y TG entre los codones adyacentes, eliminar las estructuras secundarias intracatenarias muy estables, suprimir o añadir los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, y eliminar otras secuencias que podrían ser perjudiciales para las manipulaciones de expresión o clonación del gen manipulado genéticamente. Se realizaron nuevos refinamientos de la secuencia para eliminar los potenciales sitios de empalme de los intrones de planta, corridas largas de residuos de A/T o C/G, y otros motivos que podrían interferir en la estabilidad del ARN, transcripción o traducción de la región codificadora en las células de planta. Se realizaron otros cambios para eliminar los marcos de lectura abierta internos largos (marcos distintos de +1). Estos cambios se realizaron dentro de las restricciones para retener la composición codón sesgada de soja como se describió anteriormente y mientras que preserva la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID NO:

21 del documento PCT/US2005/014737.

La secuencia de ADN sesgada de soja que codifica la proteína EPSPS de la SEQ ID NO: 21 se describe como bases 1 a 1575 de la SEQ ID NO: 22 del documento PCT/US2005/014737. La síntesis de un fragmento de ADN que comprende la SEQ ID NO: 22 del documento PCT/US2005/014737 fue realizada por un proveedor comercial (PicoScript, Houston TX).

Ejemplo 3- Clonación y expresión de los vectores de transformación

3,1 Construcción del vector de expresión pET de E. coli

Usando las enzimas de restricción correspondientes a los sitios añadidos con los ligadores de clonación adicionales (Xba 1, Xho 1) AAD-12 (v2) se cortó del vector picoscript, y se ligó en un vector resistente a estreptomycin/espectinomycin pET280. Los productos ligados luego se transformaron en TOP10F' E. coli, y se sembraron en caldo Luria a + 50 µg/ml de placas de agar con estreptomycin y espectinomycin (LB S/S).

Para diferenciar entre los ligamientos de AAD-12 (v2): pET280 y pCR2.1: pET280, se seleccionaron aproximadamente 20 colonias aisladas en 6 ml de LB-S/S, y se cultivaron a 37 °C durante 4 horas con agitación. A continuación, cada cultivo se sembró en placas de LB + kanamicina µg/ml, que se incubaron a 37 °C durante la noche. Se asumió que las colonias que crecieron en el LB-K tienen el vector pCR2.1 ligado y se descartaron. Se aislaron plásmidos a partir de los cultivos restantes como antes, y se verificó la corrección con la digestión por XbaI/XhoI. Al constructo de expresión final se le dio la denominación de pDAB3222.

3,2- Construcción del vector de expresión de Pseudomonas

El marco de lectura abierto AAD-12 (v2) se clonó inicialmente en el vector de expresión pET modificado (Novagen), "pET280 S/S", como un fragmento de XbaI-XhoI. El plásmido pDAB725 resultante se confirmó por digestión con enzimas de restricción y reacciones de secuenciación. El marco de lectura abierto AAD-12 (v2) de pDAB725 se transfirió al vector de expresión de Pseudomonas, pMYC1803, como un fragmento XbaI-XhoI. Las colonias positivas se confirmaron mediante digestión con enzimas de restricción. El constructo completado pDAB739 se transformó en las cepas de expresión de Pseudomonas MB217 y MB324.

3.3 — Finalización de vectores binarios.

El gen optimizado planta AAD-12 (v1) se recibió de Picoscript (el diseño del gen reconstruido se completó (ver arriba) y se subcontrató a Picoscript para la construcción) y se verificó la secuencia (SEQ ID NO: 3) internamente, para confirmar que no se presentara ninguna alteración de la secuencia esperada. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con los cebadores directo M13 (SEQ ID NO: 6) e inverso M13 (SEQ ID NO: 7) utilizando los reactivos de "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" como anteriormente. Se analizó la secuencia de datos y los resultados indicaron que no se presentaron anomalías presentes en la secuencia de ADN de AA-12D (v1) optimizado en planta. El gen de AAD-12 (v1) se clonó en pDAB726 como un fragmento Neo I-Sac I. El constructo resultante se denominó pDAB723, que contiene: [promotor AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: AAD-12 (v1): Nt OSM3'UTR: ORF1 poli 3'UTR] (verificado con un digesto de restricción de PvuII y un NotI). Un fragmento de No I-Not I que contiene el casete descrito luego se clonó en el sitio Not I del vector binario pDAB3038. El vector binario resultante, pDAB724, que contiene el siguiente casete [promotor AtUbi10: Nt OSM5'UTR: AAD-12 (v1): Nt OSM 3'UTR: ORF1 poli 3'UTR: promotor CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR] se digirió por restricción (con Bam HI, Nco I, Not I, Sad, y Xmn I) para la verificación de la orientación correcta. El constructo completado verificado (pDAB724) se utilizó para la transformación en Agrobacterium (ver sección 7,2).

3,4 – Clonación de constructos de transformación adicionales.

Todos los otros constructos creados para la transformación en las especies de plantas apropiadas se construyeron usando métodos similares a los descritos anteriormente en la presente, y otros métodos de clonación molecular estándares (Maniatis et al., 1982). La Tabla 8 enumera todos los constructos de transformación utilizados con promotores apropiados y características definidas, así como el cultivo transformado.

Tabla 8. Constructos binarios usados en la transformación de varias especies de planta.

pDAB #	pDAS #	Especies* transformadas en	Gen de interés (GOI)	Promotor	Rasgo 1	Rasgo 2	GOI2	Promotor i	Gen de selección bacteriana	Gen de selección bacteriana 2	Gen de selección de planta	Promotor	Procedimiento Trxn
724	-	A, Ct, S i	AAD12 v1	AtUbi10	NtOsm	-	-	-	Eritromicina	-	pat	CsVMV	Agro binary
3274	-	A	AAD12 v1	AtUbi10	NtOsm	RB7v2Mar	-	-	Espectinomicina	-	-	-	Agro binary
3278	1580	T	AAD12 v1	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	pat	AtUbi10	Agro binary
3285	-	A	AAD12 v1	CsVMV	NtOsm	RB7v2Mar	-	-	Espectinomicina	-	pat	AtUbi10	Agro binary
3759	-	A, Ca, S	AAD12 v1	CsVMV	NtOsm	RB7v2 Mar	EPSPS	AtUbi10	Espectinomicina	-	pat	AtUbi10	Agro binary
4101	1863	Cn, R	AAD12 v1	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	i Ampicilina	-	AHAS v3	OsAct1	Whiskers / Gun
4454	-	S	AAD12 v1	CsVMV	-	RB7 Mar v2	-	1	Espectinomicina	-	pat	CsVMV	Agro binary
4458	-	S	AAD12 v1	AtUbi10	-	RB7v2Mar	-	-	Espectinomicina	-	pat	CsVMV	Agro binary
4472	-	S	AAD12 v1	AtUbi3	-	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	pat	CsVMV	Agro binary
4476	-	S	AAD12 v1	ZmUbi1	-	RB7v2Mar	-	-	Espectinomicina	-	pat	CsVMV	Agro binary
4480	-	S	AAD12 v1	AtAct2	-	RB7v2Mar	-	-	Espectinomicina	-	pat	CsVMV	Agro binary

*A = Arabidopsis

T = Tabaco

S = Soj

Ct = algodón

R = arroz

Cn = maíz

Ca = Cándola

CsVMV = Promotor del virus de mosaico de la nervadura de yuca

AtUbi10 = Promotor de ubiquitina 10 de Arabidopsis thaliana

AtUbi3 = Promotor de ubiquitina 3 de Arabidopsis thaliana

AtAct2 = Promotor de actina 2 de Arabidopsis thaliana

RB7 Mar v2 = región asociada matriz de Nicotiana tabacum (MAR)

Nt Osm = región no traducida 5' de osmotina de Nicotiana tabacum y región no

traducida 3' de osmotina de Nicotiana tabacum

ZmUbi1 = Promotor de ubiquitina 1 de Zea mays

HptII = higromicina fosfotransferasa

Ejemplo 4 – Expresión y purificación de AAD-12 (v2) recombinante en *Pseudomonas fluorescens*4.1- Fermentación de *Pseudomonas fluorescens*

[001811 Para el experimento en matraz de agitación, se usaron 200 µl de patrón de glicerol de cepa MB324 de *Pseudomonas fluorescens* que portaba el constructo pDAB739 AAD-12 (v2) (sec 3.2) para inocular 50 ml de medio LB fresco suplementado con 30 µg/ml de tetraciclina/HCl. El cultivo (en un matraz Erlenmeyer con deflectores de 250 ml) se incubó en un agitador (New Brunswick Scientific Model Innova 44) a 300 rpm y 30 °C durante 16 hrs. 20 ml de cultivo semilla se transfirió a 1 L 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, 1 g/L; MgSO₄·7H₂O, 1 g/L; KCl, 0,5 g/L; CaCl₂·2H₂O, 0,5 g/L; NaCitrate-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) suplementado con 20 µg/ml de tetraciclina/HCl y 250 µg/ml de Pluronic L61 (anti-espuma) en un matraz Erlenmeyer con deflectores de 2,8 L. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 300 rpm durante 24 horas. Se añadió isopropil β-D-1-tiogalacto-piranosido (IPTG) a 1 mM final en los cultivos y se continuó incubando durante aproximadamente 48 horas a 25 °C. Las células se recolectaron por centrifugación a 7 krpm a 4 °C durante 15 min, y la pasta celular se almacenó a -80 °C o se procesó inmediatamente para la purificación.

Para los experimentos de tanques, se inoculó 1 ml de cada patrón de glicerol en un matraz con deflectores de 1 L que contienen 200 ml de medio LB suplementado con µg/ml tetraciclina/HCl a 300 rpm y 32 °C durante 16-24 horas desconcertado. El cultivo combinado de tres matraces (600 ml) se transfirió asépticamente a un fermentador sw 20 L (µg/ml tetraciclina/) que contiene 10 L de medio definido patentado de Dow (a través de Teknova, Hollister, CA) diseñado para soportar un crecimiento de alta densidad celular. La temperatura de crecimiento se mantuvo a 32 °C y el pH se controló en el punto de ajuste deseado a través de la adición de amoníaco acuoso. El oxígeno disuelto se mantuvo a un nivel positivo en el cultivo líquido mediante la regulación del flujo de aire rociado y las velocidades de agitación. El proceso de fermentación de alimentado por lote se llevó a cabo durante aproximadamente 24 horas hasta que la densidad celular alcanzó 170-200 de DO₅₇₅. Se añadió IPTG a 1 mM para inducir la expresión de la proteína recombinante y la temperatura se redujo y se mantuvo a 25 °C usando circulación de suministro de agua fría. La fase de inducción de la fermentación se dejó continuar durante otras 24 hrs. Las muestras (30 ml) se recolectaron para varios análisis para determinar la densidad celular y el nivel de expresión de la proteína en los puntos de tiempo de 6, 12, y 18 horas después de la inducción. Al final de una corrida de fermentación, se recolectaron las células por centrifugación a 10 krpm durante 30 min. Los sedimentos celulares se congelaron a -80 °C para su posterior procesamiento.

4.2 Purificación de AAD-12 (v2) para la caracterización bioquímica y producción de anticuerpo

Se descongelaron aproximadamente 100-200 g de células congeladas de *Pseudomonas* (o frescas) y se resuspendieron en 1-2 L de tampón de extracción que contiene Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, y 25 ml de cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma cat # P8465). Las células se rompieron usando un microfluidificador (modelo M110L o 110Y) (Microfluidics, Newton, MA) sobre hielo con una pasada a 11.000-12.000 psi. El lisado se centrifugó a 24.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se transfirió y se dializó contra 10 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, pH 8,5 durante la noche a 4 °C, o se diafiltró con este tampón y se filtró a través de una membrana de 0,45 µm antes de aplicar a las separaciones de columna. Todas las separaciones de proteínas posteriores se realizaron usando el Pharmacia AKTA Explorer 100 y se operó a 4 °C. Antes de la carga, una columna Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia XK 50/00, 500 ml de tamaño de lecho) se equilibró con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,5. La muestra se aplicó a la columna a 15 ml/min y luego se lavó con este tampón hasta que el eluato DO₂₈₀ regresó a la línea basal. Las proteínas se eluyeron con 2 L de gradiente lineal de 0 a 0,3 M de NaCl a una velocidad de flujo de 15 ml/min, mientras que se recogieron fracciones de 45 ml. Se mezclaron las fracciones que contenían la actividad AAD-12 determinada por el ensayo enzimático colorimétrico y también correspondientes al peso molecular predicho de la proteína AAD-12 (banda de aproximadamente 32 kDa en SDS-PAGE). Se añadió sulfato de amonio sólido a 0,5 M final a la muestra, y luego se aplicó a una columna de Fenil HP (Pharmacia XK 50/20, 250 ml de tamaño de lecho) equilibrada en sulfato de amonio 0,5 M en Tris 20 mM-HCl, pH 8,0. Esta columna se lavó con el tampón de unión a 10 ml/min hasta que la DO₂₈₀ del eluato volvió a la línea de base, las proteínas se eluyeron en 2 volúmenes de columna a 10 ml/min mediante un gradiente lineal desde 0,5 M a 0 sulfato de amonio en Tris 20 mM-HCl, pH 8,0, y se recolectaron fracciones de 12,5 ml. Las fracciones del pico principal que contienen AAD-12 se combinaron, y si es necesario, se concentraron utilizando un dispositivo de filtro centrífugo de membrana de corte de 10 kDa MWCO 10 (Millipore). En algunos casos, la muestra también se aplicó a una columna de filtración en gel Superdex 75 (Pharmacia XK 16/60, 110 ml tamaño de lecho) con tampón de PBS a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las fracciones pico que contenían AAD-12 puro se mezclaron y almacenaron a -80 °C. En la mayoría de los casos, la pureza de proteína de AAD-12 se aproxima o está por encima de 99% después de la separación de dos etapas de la columna de intercambio iónico secuencial y columna de interacción hidrofóbica. Un rendimiento típico para AAD-12 purificado es de 12-18 mg/g de células húmedas. La muestra de proteína a granel se formuló en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 0,1 M, DTT 2 mM, y trehalosa 1% por diafiltración, y se liofilizó en la Virtis Freezemobile Modelo 25EI (Virtis, Gardiner, NY) para el almacenamiento a largo plazo.

La concentración de proteína se midió inicialmente mediante el ensayo de Bradford utilizando el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad (cat # 500 a 0006) con albúmina sérica bovina como estándar. Cuando sea necesario, la

concentración de proteína más exacta se determinó mediante el uso de la hidrólisis total de aminoácidos. La muestra se analizó en el sistema de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) con estándares de calibración de aminoácidos (cat # PN5061-3330) adquiridos en Agilent.

La actividad de AAD-12 se determinó a través de los procesos para asegurar que no hay pérdida de la actividad de la enzima por cada tratamiento y manipulación, como se describe en el siguiente Ejemplo 5. La pureza de la proteína se controló mediante el uso de SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño analítica. La muestra de proteína purificada se verificó y confirmó por secuenciación de aminoácidos N-terminal, y se muestra que consiste en los residuos de AQTTLQITPT esperados en su extremo N-terminal. Las estabilidad de la proteína a corto y largo plazo se analizó mediante la actividad enzimática y por análisis en gel de PAGE nativa y SDS-PAGE bajo ambas condiciones no reductoras y reductoras. Y se observó que AAD-12 es propenso a la oligomerización a través de formación de enlaces disulfuro, por lo tanto, normalmente se usó DTT 2 mM para el almacenamiento de proteínas. Se analizaron la solución salina regulada con fosfato (PBS) y solución salina de tampón Tris (TBS) para la liofilización de proteínas, con y sin la presencia de 1% de trehalosa. Además, la endotoxina y contexto de ADN contaminante de la muestra purificada se midieron respectivamente, y la integridad de la proteína AAD-12 también se evaluó por análisis de isoelectroenfoque (IEF).

Diez miligramos de AAD-12 (v2) purificado se administraron a Zymed Laboratories, Inc. (South San Francisco, CA) para la producción de anticuerpo policlonal de conejo. El conejo recibió 5 inyecciones en el periodo de 5 semanas con cada inyección que contiene 0,5 mg de la proteína purificada suspendido en 1 ml de adyuvante completo de Freund. Los sueros se analizaron en los experimentos de ELISA y transferencia Western para confirmar la especificidad y afinidad antes de la purificación de afinidad, y conjugación con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Zymed Lab Inc).

Ejemplo 5 — Ensayos in vitro de la actividad de AAD-12

5.1 — Ensayo por medio de la detección colorimétrica de fenol.

La actividad enzimática se midió mediante la detección colorimétrica del producto fenol utilizando un protocolo modificado del de Fukumori y Hausinger (1993) (I. Biol Chem 268: 24311-24317) para permitir la utilización en un formato de microplaca de 96 pocillos. El ensayo colorimétrico se ha descrito para uso en la medición de la actividad de las dioxigenasas que escinden 2,4-D y diclorprop para liberar el producto de 2,4-diclorofenol. El rendimiento de color de varios fenoles se comparó con la de 2,4-diclorofenol usando el método de detección descrito anteriormente para determinar qué productos de fenol pueden ser fácilmente detectados. Los fenoles y análogos de fenol se analizaron a una concentración final de 100 μ M en 0,15 ml de MOPS 20 mM pH 6,75 que contiene 200 μ M de $\text{NH}_4(\text{FeSO}_4)_2$, 200 μ M de ascorbato de sodio. Los piridinoles derivados de fluroxipir y tricopir no produjeron color significativo. El rendimiento de color de 2,4-diclorofenol era lineal y proporcional a la concentración de fenol en el ensayo hasta $\sim 500 \mu\text{M}$. Una curva de calibración se realiza bajo condiciones de ensayo estándar (160 μl volumen de ensayo final) indicó que se obtuvo una absorbancia a 510 nm de 0,1 de fenol 17,2 μM .

Los ensayos enzimáticos se realizaron en un volumen total de 0,16 ml de MOPS 20 mM, pH 6,75 que contiene 200 μM de NH_4FeSO_4 , 200 μM de ascorbato de sodio, 1 mM de α -cetoglutarato, el sustrato apropiado (añadido de un patrón de 100 mM preparada en DMSO), y enzima. Los ensayos se iniciaron mediante la adición del sustrato ariloxialcanoato, enzima o α -cetoglutarato en el tiempo cero. Después de 5 minutos de incubación a 25 °C, la reacción se terminó por adición de 30 μl de una mezcla 1: 1: 1 de NaEDTA 50 mM; buffer pH 10 (3,09 g de ácido bórico + 3,73 g de KCl + 44 ml y KOH 1N) y 0,2% de 4-aminoantipirina. Entonces se añadió 10 μl de ferricianuro de potasio 0,8% y después de 5 o 10 min, la absorbancia de 510 nm se registró en un lector de microplaca espectrofotométrica. Los blancos contenían todos los reactivos excepto la enzima para representar la ligera contaminación ocasional de algunos de los sustratos por pequeñas cantidades de fenoles.

5.2 Ensayo por medio de la detección de cloropiridinol

La acción de AAD-12 sobre los sustratos potenciales, tales como el herbicida tricopir que contiene una piridina sustituida (más que anillos de benceno) liberará un piridinol en la escisión del enlace de ariloxialcanoato. Los piridinoles no se detectaron usando la detección de aminoantipirina/ferricianuro de fenol descrita en la sección anterior. Sin embargo, se encontró que los cloropiridinoles producto absorben fuertemente en el UV cercano con λ_{max} de 325 nm a pH 7 (coeficiente de extinción $\sim 8,400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Esto se utilizó para crear un ensayo espectrofotométrico basado en una microplaca continuo. Los ensayos se realizaron en un volumen total de 0,2 ml de MOPS 20 mM pH 6,75 que contiene 200 μM de NH_4FeSO_4 , 200 μM de ascorbato de sodio, 1 mM de α -cetoglutarato, el sustrato apropiado (añadido de un patrón de 100 mM preparado en DMSO), y enzima. Los ensayos se iniciaron mediante la adición del sustrato ariloxialcanoato, enzima o α -cetoglutarato en tiempo cero y se siguió el aumento en la absorbancia durante 10 minutos a 325 nm en un lector de microplacas. Los primeros 2 minutos de la reacción se utilizaron para determinar las tasas iniciales. Una curva de calibración realizada en las condiciones de ensayo estándar (200 μl de volumen de ensayo final) indicó que la absorbancia a 510 nm de 0,1 se obtuvo de 11,9 μM de cloropiridinol.

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

Un ensayo conveniente de AAD-12 fue diseñado usando 2- (2-cloro, 4-nitrofenoxi) propionato de etilo (CNPP) como sustrato. La escisión del CNPP por AAD-12 libera 2-cloro, 4-nitrofenol. Este fenol tiene una absorbancia de color amarillo brillante a 410 nm a pH 7 que permite que la reacción se mida de forma continua o por análisis de punto final. La presencia de actividad AAD-12 se puede controlar visualmente sin la necesidad de adición de otros reactivos. Los ensayos espectrofotométricos basados en microplaca se realizaron en un volumen total de 0,2 ml de MOPS 20 mM, pH 6,75 que contiene 200 μ M de NH_4FeSO_4 , 200 μ M de ascorbato de sodio, 1 mM de α -cetoglutarato, la cantidad apropiada de CNPP (añadida de un patrón de 10 mM preparado en DMSO), y la enzima. Los ensayos se iniciaron mediante la adición del CNPP, enzima o α -cetoglutarato en tiempo cero y se siguió el aumento en la absorbancia seguido durante 10 minutos a 325 nm en un lector de microplacas. Los primeros 2 minutos de la reacción se utilizaron para determinar las tasas iniciales. Una curva de calibración realizada en las condiciones de ensayo estándar (200 μ l de volumen de ensayo) indicó que la absorbancia a 410 nm de 0,1 se obtuvo de 25,1 μ M de 2-cloro,4-nitrofenol. Mediante este ensayo, se determinó que las constantes cinéticas para CNPP como un sustrato fueron $K_m = 31 \pm 5,5 \mu\text{M}$ y $k_{cat} = 16,2 \pm 0,79 \text{ min}^{-1}$.

Ejemplo 6 — Actividad in vitro de AAD-12 sobre varios sustratos

6.1 — Actividad de AAD-12 (v2) sobre (R,S)- diclorprop, (R)-diclorprop, (S)-diclorprop y 2,4-D

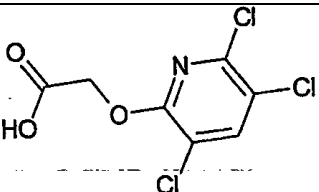
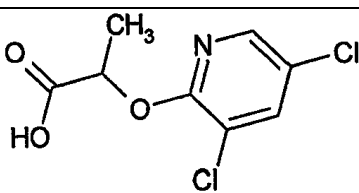
Usando el ensayo de detección de fenol descrito en el Ejemplo 5,1, cuatro fenoxialcanoatos se ensayaron en una mezcla de reacción que contiene 4,4 μ g de AAD-12 (v2) purificado. (R, S)-diclorprop (R,S-DP) se analizó a 1 mM y (R)-diclorprop, (S)-diclorprop y 2,4-D se analizaron a 0,5 mM. Los resultados se muestran en la Figura 3, que ilustra la actividad de AAD-12 (v2) sobre 2,4-D y enantiómeros de diclorprop. Se incubaron 4,4 μ g de AAD-12 (v2) con sustrato 0,5 mM (1 mM para la (R,S)-diclorprop) y la reacción se inició por adición de α -cetoglutarato. Después de 5 minutos, la reacción se inactivó, y la absorbancia a 510 nm determinada después de la adición de reactivos de detección colorimétricos. Se sustrajo el valor de fondo sin enzima.

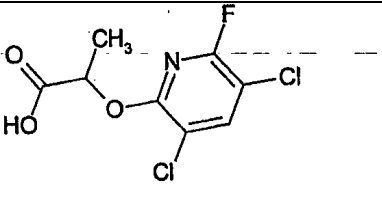
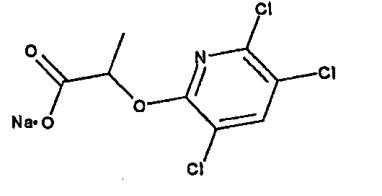
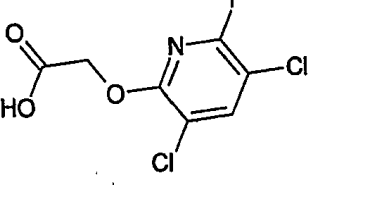
AAD-12 (v2) tiene una actividad excelente en (R,S)-diclorprop y (S)-diclorprop y tiene una actividad mínima sobre (R)-diclorprop. Esto indica que AAD-12 (v2) tiene una clara preferencia (S)-enantiomérica. La actividad de AAD-12 (v2) sobre 2,4-D fue equivalente a la de (S)-diclorprop lo que indica que la enzima puede procesar oxipropionato y oxiacetatos en forma efectiva.

6.2 — Actividad de AAD-12 (v2) sobre los piridiloxialcanoatos

Usando el ensayo de piridinol descrito en el Ejemplo 5.2, cinco piridiloxialcanoatos se analizaron a 1 mM en una mezcla de reacción que contiene 6,8 μ g de AAD-12 (v2) purificado. Las tasas de cada reacción se controlaron y se presentan en la Tabla 9. Los cinco piridiloxialcanoatos se escindieron para liberar piridinoles por AAD-12 (v2). Las tasas de los sustratos oxipropionato 116844 y 91767 eran algo más rápido que las de los acetatos correspondientes (triclopir y 93833, respectivamente) que indica una preferencia de las cadenas laterales de 12-AAD (v2) para oxipropionato respecto del oxiacetato. Estos datos muestran que AAD-12 (v2) es capaz de degradar efectivamente herbicidas piridiloxialcanoatos tales como triclopir.

Tabla 9. Tasas de escisión de piridiloxialcanoato por AAD-12 (v2), 6,8 μ g de AAD-12 (v2) se incubó con 1 mM de sustrato, la reacción se inició por la adición de α -cetoglutarato y el posterior aumento de la absorbancia controlada a 325 nm. La tasa umbral de 1,4 mAU/min sin α -cetoglutarato se sustrajo de las tasas con sustrato.

ESTRUCTURA	ID	TASA (mAU/min)	Tasa con respecto a triclopir
	triclopir	97	1
	66357	225	2,3

	91767	190	0,8
	116844	257	1,4
	93833	118	0,5

6.3 — Constantes cinéticas de AAD-12 (v2) para 2,4-D,(R,S)-DCP y triclopir

5 [002011 Los valores de K_m y k_{cat} de AAD-12 (v2) purificado para los herbicidas 2,4-D,(R,S)-diclorprop y triclopir se determinaron utilizando el método de ensayo apropiado. La inhibición del sustrato se produjo a altas concentraciones (> 1 mM) de 2,4-D y (R,S)-DCP de modo que las concentraciones por debajo de esta se usaron para ajustar los datos a la ecuación de Michaelis-Menten usando (R,S)Grafit 4.0 (Erithacus Software, Reino Unido). No se observó inhibición de sustrato para triclopir hasta 2 mM. Las constantes cinéticas se resumen en la Tabla 10. A partir de estos datos, la tasa de escisión de AAD-12 (v2) de triclopir es ~5% de la de 2,4-D, en condiciones de velocidad máxima.

Tabla 10. Constantes cinéticas de AAD-12 (v2) para tres sustratos herbicida

Sustrato	K_m , μM ($\pm SE$)	k_{cat} , min^{-1} ($\pm SE$)	Procedimiento del ensayo	Inhibición del sustrato a 2 nM
2,4-D	102 ($\pm 18,4$)	54,1 ($\pm 3,1$)	Detección de fenol	55%
(R,S)-diclorprop	122 ($\pm 2,7$)*	63,4 ($\pm 0,5$)	Detección de fenol	55%
Triclopir	241 (W3O)	2,6 ($\pm 0,1$)	ΔA_{325} nm	0%

10 *Debido a la preferencia (S)-enantiomérica de AAD-12, el valor de K_m se calculó asumiendo 50% de la mezcla racémica fue disponible como un sustrato.

Ejemplo 7 — Transformación en Arabidopsis y selección

7.1 — Condiciones de cultivo de Arabidopsis thaliana.

15 La semilla de Arabidopsis de tipo salvaje se suspendió en una solución de agarosa 0,1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La semilla suspendida se almacenó a 4 °C durante 2 días para completar los requerimientos de latencia y asegurar la germinación de semillas sincrónica (estratificación).

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

20 Las semillas germinaron y las plantas se cultivaron en un Conviron (modelos CMP4030y CMP3244, ambientes Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba., Canadá) en condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una intensidad de luz de 120 a 150 $\mu mol/m^2 seg$ bajo temperatura constante (22 °C) y humedad (40-50%). Las plantas se regaron inicialmente con solución de Hoagland y posteriormente con agua desionizada para mantener el suelo húmedo pero no mojado.

7.2 — Transformación de *Agrobacterium*

Una placa de agar LB+ con eritromicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) que contiene una colonia DH5 α estriada se utilizó para proporcionar una colonia para inocular cultivos mini preparación de 4 ml (líquido LB + eritromicina). Los cultivos se incubaron durante la noche a 37 °C con agitación constante. Qiagen (Valencia, CA) Spin Mini Preps, realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se utilizó para purificar el ADN de plásmido.

Las células de *Agrobacterium tumefaciens* electro-competentes (cepas Z707S, EHA101S, y LBA4404s) se prepararon utilizando un protocolo de Weigel y Glazebrook (2002). Las células de *Agrobacterium* competentes se transformaron utilizando un método de electroporación adaptado de Weigel y Glazebrook (2002). 50 μ l de células agrocompetentes se descongelaron en hielo y se añadieron 10-25 ng del plásmido deseado a las células. La mezcla de ADN y células se añadió a las cubetas de electroporación pre-refrigeradas (2 mm). Se usó un Eppendorf Electroporator 2510 se utilizó para la transformación con las siguientes condiciones, Voltaje: 2,4kV, duración del pulso: 5 mseg.

[002091 Después de la electroporación, se añadió 1 ml de caldo YEP (por litro: 10 g de extracto de levadura, 10 g Bactopectona, 5 g de NaCl) a la cubeta, y la suspensión celular-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 la incubación, el cultivo se sembró 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.

Se seleccionaron las colonias y se estiraron sobre YEP + agar fresco con eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomina (250 mg/L) y se incubaron las placas a 28 °C durante 1-3 días. Las colonias se seleccionaron para el análisis de PCR para verificar la presencia del inserto del gen mediante el uso de cebadores específicos de vectores. Qiagen de Spin Mini Preps, realizado según las instrucciones del fabricante, se utilizó para purificar el ADN de plásmido de las colonias de *Agrobacterium* seleccionadas con la siguiente excepción: alícuotas de 4 ml de un cultivo Mini prep de 15 ml durante la noche (YEP líquido + eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L)) y estreptomina (250 mg/L)) se utilizaron para la purificación de ADN. Una alternativa al uso de Spin Qiagen DNA Mini Prep fue lisis de las células de *Agrobacterium* transformadas, suspensión en 10 μ l de agua, a 100 °C durante 5 minutos. El ADN del plásmido del vector binario usado en la transformación de *Agrobacterium* se incluyó como control. La reacción PCR se completó usando Taq ADN polimerasa a partir de Takara Mirus Bio Inc. (Madison, Wisconsin) según las instrucciones del fabricante a concentraciones de 0,5x. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico MT Research Peltier 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 a continuación 1 ciclo de 72 °C durante 10 minutos. La reacción se mantuvo a 4 °C después del ciclo. La amplificación se analizó por electroforesis en gel de 1% de agarosa y se visualizó mediante la tinción con bromuro de etidio. Una colonia se seleccionó cuyo producto de PCR era idéntico al plásmido de control.

7.3 — Transformación de *Arabidopsis*.

Arabidopsis se transformó utilizando el método de inmersión floral. La colonia seleccionada se utilizó para inocular una o más de 15-30 ml de pre-cultivos de caldo YEP que contiene eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomina (250 mg/L). El cultivo se incubó durante la noche a 28 °C con agitación constante a 220 rpm. Cada precultivo se utilizó para inocular dos cultivos de 500 ml de caldo YEP que contiene 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 aprox. 8700x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante resultante. El sedimento celular se resuspendió suavemente en 500 ml de medio de infiltración que contienen: 1/2x sales de Murashige y Skoog/vitaminas B5 de Gamborg, 10% (p/v) de sacarosa, 0,044 μ M de bencilamino purina (10 μ l/litro de patrón 1 mg/ml en DMSO) y 300 μ l/litro de Silwet L-77. Las plantas de aproximadamente 1 mes de edad se sumergieron en los medios durante 15 segundos, asegurándose de sumergir la inflorescencia más nueva. Las plantas luego se colocaron sobre sus lados y se cubrieron (transparente u opaco) durante 24 horas, luego se lavaron con agua, y se colocaron en posición vertical. Las plantas se cultivaron a 22 °C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Aproximadamente 4 semanas después de la inmersión, se recolectaron las semillas.

7.4 — Selección de plantas transformadas

Las semillas T1 recién recolectadas [gen AAD-12 (v1)] se dejó secar durante 7 días a temperatura ambiente. La semilla T1 se sembró en placas de germinación de 26,5 x 51 cm (TO Plastics Inc., Clearwater, MN), cada uno que recibe alícuotas de 200 mg de semillas T₁ estratificada (10.000 semillas) que se habían suspendido previamente en 40 ml de solución de agarosa 0,1% y se almacenó a 4 °C durante 2 días para completar los requerimientos de latencia y asegurar la germinación de semillas sincrónica.

Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) estaba cubierto de vermiculita fina y se sub-irrigó con solución de Hoagland hasta húmeda, luego se dejó drenar por gravedad. Cada alícuota de 40 ml de semilla estratificada se sembró uniformemente sobre la vermiculita con una pipeta, y se cubrió con cúpulas de humedad

(Kord Productos, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4-5 días. Las cúpulas se retiraron 1 día antes de la primera selección transformante inicial mediante pulverización pos-emergencia de glufosinato (seleccionando para el gen PAT co-transformado).

- 5 Siete días después de la plantación (DDS) y de nuevo 11 DAP, las plantas T₁ (cotiledones y etapa lf 2-4, respectivamente) se rociaron con una solución 02% de herbicida Liberty (200 g ai/L glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) en un volumen de pulverización de 10 ml/placa (703 L/ha), utilizando una punta de pulverización de aire comprimido DeVilbiss para liberar una tasa efectiva de 280 g ai/ha de glufosinato por aplicación. Los sobrevivientes (plantas en crecimiento activo) se identificaron 4-7 días después de la pulverización final y se trasplantaron individualmente en macetas de 3 pulgadas preparados con los medios para macetas (Metro Mix 360). Las plantas trasplantadas se cubrieron con cúpulas de humedad durante 3-4 días y se colocaron en una cámara de crecimiento 22 °C como antes o se trasladaron directamente al invernadero. Las cúpulas se retiraron posteriormente y las plantas se criaron en el invernadero (22 ± 5 °C, 50 ± 30% RH, 14 horas de luz: 10 oscuridad, mínimo 500 µE/m²s⁻¹ natural + suplementario) al menos 1 día antes de analizar la capacidad de AAD-12 (v1) (gen optimizado de planta) para proporcionar resistencia a los herbicidas de fenoxi auxina.
- 10 Las plantas T1 luego se asignaron aleatoriamente a varias tasas de 2,4-D. Para Arabidopsis, 50 g de ae/ha de 2,4-D es una dosis efectiva para distinguir las plantas sensibles de los que tienen niveles significativos de resistencia. Las tasas elevadas también se aplicaron para determinar los niveles relativos de la resistencia (50, 200, 800, o 3200 g ae/ha). Las Tablas 10 y 11 muestran las comparaciones ilustradas para un gen de resistencia al herbicida ariloxialcanoato (AAD-1 (v3)) descrito anteriormente en el documento PCT/US 2005/014737.
- 15 Todas las aplicaciones de herbicidas de auxina se realizaron usando el pulverizador DeVilbiss como se describió anteriormente para aplicar el volumen de pulverización de 703 L/ha (0,4 ml de solución/maceta de 3 pulgadas) o aplicar mediante el pulverizador en un volumen de pulverización 187 L/ha. El 2,4-D usado fue de grado técnico (Sigma, St. Louis, MO) disuelto en DMSO y se diluyó en agua (<1% de DMSO de concentración final) o la formulación de sal dimetilamina comercial (456 g ae L, Nufarm, St Joseph, MO). El diclorprop utilizado fue de calidad comercial formulado como sal de potasio del R-diclorprop (600 g ai/L, AH Marks). A medida que las tasas de herbicidas se incrementaron más allá de 800 g ae/ha, el pH de la solución de pulverización se hizo excesivamente ácido, con quema de las hojas de las plantas de Arabidopsis jóvenes y tiernas y complicación de la evaluación de los efectos primarios de los herbicidas. Se convirtió en una práctica estándar aplicar estas altas tasas de herbicidas en 200 mM de buffer HEPES, pH 7,5.
- 20 Algunos individuos T₁ se sometieron a diferentes productos comerciales alternativos en lugar de una fenoxi auxina. Un punto de interés fue determinar si los herbicidas de piridiloxiacetato auxina, triclopir y fluroxipir, podrían ser degradados de manera efectiva en planta. Los herbicidas se aplicaron a plantas T₁ con el uso de un rociador en un volumen de pulverización de 187 L/ha. Las plantas T₁ que mostraron tolerancia al 2,4-D DMA también se accedieron en la generación de T₂.
- 25 7.5 — Resultados de la selección de las plantas transformadas.

- Las primeras transformaciones de Arabidopsis se realizaron utilizando AAD-12 (v1) (gen optimizado en planta). Los transformantes T₁ se seleccionaron primero de la base de semillas sin transformar utilizando un esquema de selección de glufosinato. Se analizaron más de 300.000 semillas T₁ y se identificaron 316 plantas resistentes a glufosinato (gen PAT), lo que equivale a una frecuencia de transformación/selección de 0,10% que se encuentra en el rango normal de la frecuencia de selección de los constructos donde se usan PAT + Liberty para la selección. Las plantas T₁ seleccionadas anteriormente se trasplantaron posteriormente a macetas individuales y se pulverizaron con diferentes tasas de herbicidas ariloxialcanoato comerciales. La Tabla 11 compara la respuesta de AAD-12 (v1) y los genes de control para impartir resistencia a 2,4-D a para los transformantes T₁ de Arabidopsis. La respuesta se presenta en términos de % de daño visual 2 WAT. Los datos se presentan como un histograma de los individuos que exhiben poca o ninguna lesión (<20%), lesión moderada (20-40%), o lesión severa (> 40%). Debido a que cada T₁ es un evento de transformación independiente, se puede esperar una variación significativa de las respuestas T₁ individuales dentro de una determinada tasa. Una media aritmética y desviación estándar se presenta para cada tratamiento. El rango de respuesta individual también se indica en la última columna para cada tasa y transformación. Arabidopsis transformada por PAT/Cry/F sirvió como control transformado sensible a auxina. El gen AAD-12 (v1) impartió resistencia a herbicidas a las plantas de Arabidopsis T1 individuales. Dentro de un tratamiento dado, el nivel de respuesta de la planta varió en gran medida y se puede atribuir al hecho de cada planta representa un evento de transformación independiente. De importancia, a cada tasa de 2,4-D analizada, había individuos que no fueron afectadas, mientras que algunos fueron severamente afectados. Una lesión de la población global promedio por tasa se presenta en la Tabla 11, simplemente para demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con AAD-12 (v1) versus los controles tipo salvaje o transformados con PAT/Cry/F. Los niveles de lesión tienden a ser mayores y la frecuencia de las plantas no lesionados fue menor a tasas elevadas de hasta 3200 g ae/ha (o tasa de campo 6x). También en estas altas tasas, la solución de pulverización se vuelve altamente ácido a menos regulada. La Arabidopsis creció en la mayor parte en la cámara de crecimiento tiene una cutícula muy fina y efectos ardientes graves puede complicar la prueba en estas tasas elevadas. Sin embargo, muchos individuos han sobrevivido a 3200 g ae/ha 2,4-D con poca o ninguna lesión.

Tabla 11. Respuesta a Arabidopsis T₁ transformados por AAD-12 (v1) a un rango de las tasas de 2,4-D aplicados pos-emergencia, en comparación con una población resistente homocigota (T₄) AAD-1 v3 o un control sensible a auxina, transformado a *Pat-Cry1F*

Transformantes T ₁ del gen AAD-12 (v1)	% de lesión			% de lesión	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom	Desv est
Buffer control no tratado	6	0	0	0	0
50 g ae/ha 2,4-D	6	0	2	16	24
200 g ae/ha 2,4-D	6	1	1	11	18
800 g ae/ha 2,4-D	5	2	1	15	20
3200 g ae/ha 2,4-D	8	0	0	6	6
		% de lesión		% de lesión	
PAT/Cry1F (control transformado)				Prom	Desv est
Promedios	<20%	20-40%	>40%		
Buffer control no tratado	10	0	0	0	0
50 g ae/ha 2,4-D	4	1	5	31	16
200 g ae/ha 2,4-D	0	0	10	70	2
800 g ae/ha 2,4-D	0	0	10	81	8
3200 g ae/ha 2,4-D	0	0	10	91	2
Plantas T ₄ de gen AAD-1 (v3) homocigota		% de lesión		% de lesión Ave	Std
Promedios	<20%	20-40%	>40%		Dev
Buffer control no tratado	10	0	0	0	0
50 g ae/ha 2,4-D	10	0	0	0	0
200 g ae/ha 2,4-D	10	0	0	0	0
800 g ae/ha 2,4-D	10	0	0	0	0
3200g ae/ha 2,4-D	9	1	0	2	6

- 5 La tabla 12 muestra una respuesta de dosis realizada de modo similar de Arabidopsis T₁ al ácido fenoxipropiónico, diclorprop. Los datos muestran que la actividad del isómero (R-) activo como herbicida de diclorprop no sirve como un sustrato adecuado para AAD-12 (v1). El hecho de que AAD-1 metabolizará R-diclorprop lo suficientemente bien como para impartir tolerancia comercialmente aceptable es una característica distintiva que separa los dos genes. (Tabla 12). AAD-1 y AAD-12 se consideran α -cetoglutarato dioxigenasas específicas de R y S, respectivamente.

- 10 **Tabla 12.** Respuesta de Arabidopsis T₁ a una variedad de tasas de R-diclorprop aplicadas pos-emergencia.

Gen AAD-12 v1	% de lesión			% de lesión	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom	Desv est
Control no tratado	6	0	0	0	0
50 g ae/ha R-diclorprop	0	0	8	63	7
200 g ae/ha R-diclorprop	0	0	8	85	10

800 g ae/ha R-diclorprop	0	0	8	96	4
3200 g ae/ha R-diclorprop	0	0	8	98	2
PAT/Cry1F	% de lesión			% de lesión	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom	Desv est
Control no tratado	10	0	0	0	0
50 g ae/ha R-diclorprop	0	10	0	27	2
200 g ae/ha R-diclorprop	0	0	10	69	3
800 g ae/ha R-diclorprop	0	0	10	83	6
3200 g ae/ha R-diclorprop	0	0	10	90	2
Gen AAD-1 (v3) homocigota	% de lesión			% de lesión	
Plantas T ₄	<20%	20-40%	>40%	Prom	Desv est
Control no tratado	10	0	0	0	.0
50g ae/ha R-diclorprop	10	0	0	0	0
200 g ae/ha R-diclorprop	10	0	0	0	0
800 g ae/ha R-diclorprop	10	0	0	0	0
3200-g ae/ha R-diclorprop	10	0	0	0	0

7.6 — AAD-12 (v1) como un marcador seleccionable

La capacidad de utilizar AAD-12 (v1) como un marcador seleccionable utilizando 2,4-D como el agente de selección se analizó inicialmente con Arabidopsis transformada como se describió anteriormente. Aproximadamente 50 semillas de Arabidopsis de generación T₄ (homocigotas para un AAD-12 (v1)) se enriquecieron en aproximadamente 5.000 semillas de tipo salvaje (sensibles). Se compararon varios tratamientos, cada placa de plantas reciben uno o dos tiempos de aplicación de 2,4-D en uno de los siguientes esquemas de tratamiento: 7 DAP, 11 DAP, o 7 seguido por 11 DAP. Dado que todos los individuos también contenían el gen PAT en el mismo vector de transformación, AAD-12 seleccionados con 2,4-D podría compararse directamente con PAT seleccionado con glufosinato.

Los tratamientos se aplicaron con una punta de pulverización DeVilbiss como se describió previamente. Las plantas se identificaron como resistente o sensible 17 DAP. El tratamiento óptimo fue de 75 g ae/ha 2,4-D aplicado 7 y 11 días después de la plantación (DAP), fue igualmente efectivo en la frecuencia de selección, y produjo menor lesión herbicida a los individuos transformados que el esquema de selección de Liberty. Estos resultados indican que AAD-12 (v1) se puede utilizar efectivamente como un marcador seleccionable alternativo para una población de Arabidopsis transformado.

7.7 — Heredabilidad

[002271 Una variedad de eventos T₁ se autopolinizaron para producir semillas T₂. Estas semillas se analizaron por progenie mediante la aplicación de 2,4-D (200 g ae/ha) a 100 hermanos T₂ aleatorios. Cada planta T₂ individual se trasplantó a macetas de 7,5 cm cuadrados antes de la aplicación de pulverización (pulverizador en una tasa de aplicaciones 187 L/ha). El setenta y cinco por ciento de las familias T₁ (plantas T₂) segregadas en el modelo 3 Resistente: 1 sensible esperado para un locus único heredado de modo dominante con herencia mendeliana de acuerdo con lo determinado por análisis de Chi cuadrado (P> 0,05).

Las semillas se recolectaron de 12 a 20 individuos T₂ (semilla T₃). Veinticinco hermanos T₃ de cada uno de las ocho familias T₂ seleccionadas aleatoriamente se analizaron por progenie como se describió anteriormente. Aproximadamente un tercio de las familias T₂ previstas como homocigotas (poblaciones no segregantes) se han identificado en cada línea. Estos datos muestran AAD-12 (v1) está integrado de forma estable y se hereda de una forma mendeliana en al menos tres generaciones.

7.8 — Aplicaciones foliares adicionales para resistencia a herbicidas en AAD-12 de Arabidopsis.

La capacidad de AAD-12 (v1) para proporcionar la resistencia a otros herbicidas de ariloxialcanoato auxina en

Arabidopsis transgénica se determinó por aplicación foliar de varios sustratos. Las semillas de Arabidopsis de generación T₂ se estratificaron, y se sembraron en las placas de selección al igual que el de Arabidopsis (Ejemplo 6.4). Una línea de control transformada que contiene PAT y el gen de resistencia al insecto CryIF se plantaron de manera similar. Las plántulas se transfirieron a macetas individuales de 3 pulgadas en el invernadero. Todas las plantas se pulverizaron con el uso de un conjunto pulverizador de pista en 187 L/ha. Las plantas se pulverizaron con una variedad de herbicidas piridiloxiacetato: 280-2240 g ae/ha triclopir (Garlon 3A, Dow AgroSciences) y 280-2.240 g ae/ha fluroxipir (Starane, Dow AgroSciences); y el metabolito 2,4-D resultante de la actividad AAD-12, 2,4-diclorofenol (DCP, Sigma) (en un equivalente molar de 280 a 2240 g ae/ha de 2,4-D, se utilizó DCP de grado técnico). Todas las aplicaciones se formularon en el agua. Cada tratamiento se repitió 3-4 veces. Las plantas se evaluaron a los 3 y 14 días después del tratamiento.

No hay efecto del metabolito 2,4-D, 2,4-diclorofenol (DCP), sobre Arabidopsis control no AAD-12 transgénico (Pat/Cry1F). Las plantas transformadas con AAD42 también fueron claramente protegidos de la lesión del herbicida triclopir y fluroxipir que se observó en los controles no resistentes transformados (ver Tabla 13). Estos resultados confirman que AAD-12 (v1) en Arabidopsis proporciona resistencia a las piridiloxiacético auxinas analizadas. Este es el primer informe de una enzima con actividad significativa sobre los herbicidas de ácido piridiloxiacético. No se ha informado ninguna otra enzima degradadora de 2,4-D con una actividad similar.

Tabla 13. Comparación de la respuesta de AAD-12 (v1) T₂ y planta de Arabidopsis control transformada a los diversos herbicidas auxínicos aplicados foliares.

Auxinas piridiloxiacéticas		
Tratamiento herbicida	% de lesión 14 DAT promedio	
	Plantas T2 AAD-12 segregantes (pDAB724.01.120)	Pat/Cry1F-Control
280 g ae/ha Triclopir	0	52
560 g ae/ha Triclopir	3	58
1120 g ae/ha Triclopir	0	75*
280 g ae/ha Fluroxipir	0	75*
560 g ae/ha Fluroxipir	2	75*
1120 g ae/ha Fluroxipir	3	75*
2240 g ae/ha Fluroxipir	5	75*
Metabolito DCP inactivo		
280 g ae/ha 2,4-DCP	0	0
560 g ae/ha 2,4-DCP	0	0
1120 g ae/ha 2,4-DCP	0	0
2240 g ae/ha 2,4-DCP	0	0

* Las plantas de este experimento estaban atrofiadas y severamente epinásticas, pero se mantuvieron verde y no recibió calificaciones de lesiones > 75%.

7.9 — Análisis molecular de AAD-12 (v1) Arabidopsis.

Se realizó el ensayo Invader (métodos de Third Wave Agbio Kit Procedures) para el análisis del número de copia del gen PAT con el ADN total obtenido de un kit Qiagen DNeasy en múltiples líneas homocigotas AAD-12 (v1) para determinar la integración estable de la unidad de transformación de planta que contiene PAT y AAD-12 (v1). El análisis asumió la unión física directa de estos genes ya que estaban contenidos en el mismo plásmido.

Los resultados mostraron que todas las plantas resistentes 2,4-D analizadas, contenían PAT (y, por tanto, por inferencia, AAD-12 (v1)). El análisis del número de copias mostró insertos totales que variaron de 1 a 3 copias. Esto se correlaciona, también, con los datos de expresión de la proteína AAD-12 (v1) proteína que indica que la presencia de la enzima produce niveles significativamente altos de resistencia para todos los ácidos fenoxiacético y piridiloxiacético disponibles en el comercio.

7.10 — Arabidopsis transformada con el apilamiento molecular de AAD-12 (v1) y un gen de resistencia a glifosato

Se produjo la semilla de Arabidopsis T₁, como se describió previamente, que contiene el plásmido pDAB3759 (AAD-12 (v1) + EPSPS), que contiene el plásmido pDAB3759 (AAD-12 (v1) + EPSPS) que codifica un rasgo de resistencia a glifosato putativo. Los transformantes T₁ se seleccionaron usando AAD-12 (v1) como el marcador seleccionable tal como se describe en el ejemplo 7.6. Las plantas T₁ (eventos transformados individualmente) se recuperaron de la primera tentativa de selección y se transfirieron a macetas de tres pulgadas en el invernadero como se describió anteriormente. También se analizaron tres líneas de Arabidopsis de control diferentes: Columbia-0 tipo salvaje, líneas homocigotas AAD-12 (v1) + PAT T₄ (transformada pDAB724) y líneas homocigotas PAT + Cry1F (control transformado). Las plantas transformadas pDAB3759 y pDAB724 se preseleccionó en la etapa de plántula por la tolerancia a 2,4-D. Cuatro días después del trasplante, las plantas se dividieron uniformemente para tratamiento foliar mediante un pulverizador de pista como se describió anteriormente con 0, 26,25, 105, 420, o 1.680 g ae/ha de glifosato (Glyphomax Plus, Dow AgroSciences) en agua. Todos los tratamientos fueron replicados de 5 a 20 veces. Las plantas se evaluaron 7 y 14 días después del tratamiento.

La evaluación de la resistencia inicial indicó que las plantas tolerantes al 2,4-D fueron posteriormente tolerantes al glifosato cuando se comparó con la respuesta de las tres líneas de control. Estos resultados indican que la resistencia se puede impartir a las plantas a dos herbicidas con diferentes modos de acción, que incluyen 2,4-D y la tolerancia al glifosato, que permite la aplicación de ambos herbicidas de pos-emergencia. Además, AAD-12 + 2,4-D se usó efectivamente como un marcador seleccionable para una selección de resistencia verdadera.

Tabla 14. Respuesta de T₁ de Arabidopsis a una variedad de tasas de glifosato aplicadas pos-emergencia (14 DAT).

Gen de AAD-12 v1 + EPSPS + HptII (pDAB3759) (Promedios)	% de lesión			% de lesión	
	<20%	20-40%	>40%	Prom	Desv est
Control no tratado	5	0	0	0	0
26,25 g ae/ha glifosato	13	2	1	11	16
105 g ae/ha glifosato	10	1	5	34	38
420 g ae/ha glifosato	5	6	5	44	37
1680 g ae/ha glifosato	0	0	16	85	9
PAT/Cry1F	% de lesión			% de lesión	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom	Desv est
Control no tratado	5	0	0	0	0
26,25 g ae/ha glifosato	0	0	5	67	7
105 g ae/ha glifosato	0	0	5	100	0
420 g ae/ha glifosato	0	0	5	100	0
1680 g ae/ha glifosato	0	0	5	100	0
Tipo salvaje(Col-0)	% de lesión			% de lesión	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom	Desv est
Control no tratado	5	0	0	0	0
26,25 g ae/ha glifosato	0	0	5	75	13
105 g ae/ha glifosato	0	0	5	100	0
420 g ae/ha glifosato	0	0-	5	100	0
1680 g ae/ha glifosato	0	0	5	100	0
pDAB724 T4 (PAT + AAD-12)	% de lesión			% de lesión	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom	Desv est

Control no tratado	5	0	0	0	0
26,25 g ae/ha glifosato	0	0	5	66	8
105 g ae/ha glifosato	0	0	5	100	0
420 g ae/ha glifosato	0	0	5	100	0
1680 g ae/ha glifosato	0	0	5	100	0

7.11 Arabidopsis AAD-12 genéticamente apilado con AAD-1 para proporcionar un espectro más amplio de la tolerancia al herbicida.

5 Las plantas AAD-12 (v1) (pDAB724) y AAD-1 (v3) (pDAB721) se cruzaron recíprocamente y se recolectaron las semillas F₁. Ocho semillas F₁ se plantaron y se dejaron crecer para producir semillas. Las muestras de tejido se tomaron de ocho plantas F₁ y se sometieron a análisis de Western para confirmar la presencia de ambos genes. Se concluyó que las 8 plantas examinadas expresan ambas proteínas AAD-1 y AAD-12. Las semillas se pesaron y dejaron secar durante una semana antes de la plantación.

10 Se sembraron cien semillas F₂ y se aplicaron 280 g ai/ha de glufosinato. Noventa y seis plantas F₂ sobrevivieron a la selección de glufosinato que ajusta una proporción de segregación esperada por dos locus del reagrupamiento independiente para la resistencia al glufosinato (15 R: 1 S). Las plantas resistentes a glufosinato se trataron luego con 560 g de ae/ha de R-diclorprop + 560 g ae/ha de triclopir, aplicada a las plantas bajo el mismo régimen de pulverización que se usó para la otra prueba. Las plantas se calificaron a 3 y 14 DAT. Sesenta y tres de las 96 plantas que sobrevivieron a la selección con glufosinato también sobrevivieron a la aplicación de herbicidas. Estos
15 datos son compatibles con un patrón de segregación esperado (9R: 6S) de dos rasgos dominantes de reagrupamiento independiente donde cada gen proporciona resistencia a solo uno de los herbicidas auxínicos (R-diclorprop o triclopir). Los resultados indican que AAD-12 (pDAB724) se puede apilar con éxito con AAD-1 (pDAB721), de este modo aumenta los herbicidas de espectro que se pueden aplicar a los cultivos de interés [(2,4-D + R-diclorprop) y (2,4-D + fluroxipir + triclopir), respectivamente]. Esto puede ser útil para producir tolerancia a 2,4-D
20 en una especie muy sensible a través del apilamiento convencional de dos genes de resistencia a 2,4-D separados. Además, si el gen se usó como un marcador seleccionable para un tercer o cuarto gen de interés a través de actividades de transformación independientes, luego cada par de genes se pueden combinar a través de actividades de fitomejoramiento convencionales y posteriormente seleccionar en la generación F₁ mediante pulverizaciones combinadas con herbicidas que son exclusivas entre las enzimas de AAD-1 y AAD-12 (como se muestra con R-diclorprop y triclopir para AAD-1 y AAD-12, respectivamente, antes).
25

Otros apilamientos AAD también están dentro del alcance de la presente invención. La proteína *TfdA* descrita en otra parte en la presente (Streber et al.), por ejemplo, se puede utilizar junto con los presentes genes AAD-12 para impartir nuevos espectros de resistencia a herbicidas en plantas transgénicas de la presente invención.

Ejemplo 8 Transformación mediada por WHISKERS de maíz usando la selección de imazetapir

30 8.1 — Clonación de AAD-12 (v1).

El gen AAD-12 (v1) se cortó del vector intermedio pDAB3283 como un fragmento NcoI/SacI. Este se ligó direccionalmente en el vector pDAB3403 cortado de forma similar que contiene el promotor ZmUbi I de monocotiledónea. Los dos fragmentos se ligaron entre sí utilizando T4 ADN ligasa y se transformaron en células DH5α. Las minipreparaciones se realizaron en las colonias resultantes utilizando el kit Qiagen's QIA Spin mini prep,
35 y se digirieron las colonias para comprobar la orientación. Este primer constructo intermedio (pDAB4100) contiene el casete ZmUbi 1: AAD-12 (v1). Este constructo se digirió con NotI y PvuI para liberar el casete del gen y digerir el esqueleto no deseado. Este se ligó a pDAB2212 cortado por NotI, que contiene el marcador seleccionable AHAS dirigido por el promotor OsAct1 de actina de arroz. El constructo final se denominó pDAB4101 o pDAS1863, y contiene ZmUbi1/AAD-12 (v1)/ZmPer5 :: OsAct1/AHAS/LZmLip.

40 8.2 — Iniciación del callo/suspensión.

Para obtener embriones inmaduros para la iniciación del cultivo de callo, se realizaron cruzamientos de F₁ entre los progenitores A y B Hi-II cultivados en invernadero (Armstrong et al. 1991) se realizaron. Cuando los embriones tuvieron 1,0-1,2 mm de tamaño (aproximadamente 9-10 días después de la polinización), se recolectaron las espigas y se esterilizaron en superficie mediante lavado con jabón Liqui-Nox®, sumergido en etanol 70% durante 2-3
45 minutos, después se sumergieron en lavandina 20% comercial (0,1% de hipoclorito sódico) durante 30 minutos.

Las espigas se lavaron en agua destilada estéril, y los embriones cigóticos inmaduros se escindieron asépticamente y se cultivaron en un medio 15Ag10 (Medio N6 (Chu et al., 1975), 1,0 mg/L de 2,4-D, 20 g/L de sacarosa, 100 mg/L de hidrolizado de caseína (digesto enzimático), 25 mM de L-prolina, 10 mg/L de AgNO₃, 2,5 g/L de Gelrite, pH 5,8)

durante 2-3 semanas con el escutelo alejado del medio. El tejido que muestra la morfología apropiada (Welter y otros., 1995) transferido selectivamente a intervalos quincenales en un medio fresco 15Ag10 durante aproximadamente 6 semanas, y luego se transfirió al medio 4 (medio N6, 1,0 mg/L de 2,4-D, 20 g/L de sacarosa, 100 mg/L de hidrolizado de caseína (digesto enzimático), 6 mM de L-prolina, 2,5 g/L de Gelrite, pH 5,8) a intervalos quincenales durante aproximadamente 2 meses.

Para iniciar cultivos embriogénicos en suspensión, se añadieron aproximadamente 3 ml de volumen de células empaquetadas (PCV) del tejido de callo procedente de un solo embrión a aproximadamente 30 ml de medio líquido H9CP + (mezcla de sales basales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas MS modificadas que contienen 10 veces menos ácido nicotínico y 5 veces más de tiamina-HCl, 2,0 mg/L de 2,4-D, 2,0 mg/L de ácido α -naftalenacético (NAA), 30 g/L de sacarosa, 200 mg/L de hidrolizado de caseína (digesto ácido), 100 mg/L de mio-inositol, 6 mM de L-prolina, 5% v/v de agua de coco (añadido justo antes de subcultivo), pH 6,0). Los cultivos en suspensión se mantuvieron en condiciones de oscuridad en matraces Erlenmeyer de 125 ml en un conjunto agitador de temperatura controlada a 125 rpm a 28 °C. Las líneas celulares normalmente se establecieron dentro de 2 a 3 meses después de la iniciación. Durante el establecimiento, las suspensiones se subcultivaron cada 3,5 días mediante la adición de 3 ml de PCV de las células y 7 ml de medio acondicionado a 20 ml de medio líquido H9CP+ fresco usando una pipeta de gran calibre. Una vez que el tejido comenzó a duplicar el crecimiento, las suspensiones aumentaron de escala y se mantuvieron en matraces de 500 ml mediante el cual 12 ml de PCV de células y 28 ml de medio acondicionado se transfirieron a 80 ml de medio H9CP+. Una vez que las suspensiones se establecieron por completo, se criopreservaron para uso futuro.

8.3 — Criopreservación y descongelado de suspensiones.

Dos días después de subcultivo, se añadieron 4 ml de PCV de las células en suspensión y 4 ml de medio condicionado a 8 ml de crioprotector (disuelto en medio H9CP + sin agua de coco, 1 M de glicerol, 1 M de DMSO, 2 M de sacarosa, esterilizado por filtración) y se dejó agitar a 125 rpm a 4 °C durante 1 hora en un matraz de 125 ml. Después de 1 hora se añadieron 4,5 ml a un criovial helado de 5,0 ml Corning. Una vez llenos los viales individuales se mantuvieron durante 15 minutos a 4 °C en un congelador de velocidad controlada, después se dejó congelar a una tasa de 0,5 °C/minuto hasta alcanzar una temperatura final de -40 °C. Después de alcanzar la temperatura final, los viales se transfirieron a cajas dentro de las gradillas en el interior de una unidad de almacenamiento CryoPlus 4 (Forma Scientific) cargada de vapores de nitrógeno líquido.

Para descongelar, los viales se retiraron de la unidad de almacenamiento y se colocaron en un recipiente con hielo seco cerrado, luego se sumergieron en un baño de agua mantenido a 40-45 °C hasta que disminuyó la "ebullición". Una vez descongelado, los contenidos se vertieron sobre un apilamiento de ~ 8 papeles de filtro Whatman de 70 mm (Nº 4) en placas de Petri cubiertas de 100x25 mm. El líquido se dejó absorber en los filtros durante varios minutos, a continuación, el filtro superior que contiene las células se transfirió al medio GN6 (medio N6, 2,0 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, 2,5 g/L de Gelrite, pH 5,8) durante 1 semana. Después de 1 semana, solo el tejido con morfología prometedora se transfirió fuera del papel de filtro directamente en medio GN6 fresco. Este tejido se subcultivó cada 7-14 días hasta que 1 a 3 gramos estuvieron disponibles para la iniciación de suspensión en aproximadamente 30 ml de medio H9CP+ en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Tres mililitros PCV se subcultivaron en medio H9CP+ fresco cada 3,5 días hasta que se obtuvo un total de 12 ml de PCV, en tal punto el subcultivo se llevó a cabo como se describió previamente.

8.4 – Transformación estable

Aproximadamente 24 horas antes de la transformación, 12 ml PCV de las células de suspensión de maíz embriogénicas previamente criopreservadas más 28 ml de medio condicionado se subcultivaron en 80 ml de medio líquido GN6 (medio GN6 que carece de Gelrite) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, y se colocaron en un agitador a 125 rpm a 28 °C. Esto se repitió 2 veces, utilizando la misma línea celular de tal manera que un total de 36 ml PCV se distribuyó a través de 3 matraces. Después de 24 horas se retiró el medio líquido GN6 y se reemplazó con 72 ml de medio osmótico GN6 S/M (medio N6, 2,0 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, 45,5 g/L de sorbitol, 45,5 g/L de manitol, 100 mg/L de mio-inositol, pH 6,0) por matraz con el fin de plasmolizar las células. Los matraces se colocaron en un agitador agitado a 125 rpm en la oscuridad durante 30-35 minutos a 28 °C, y durante este tiempo se preparó una suspensión de fibras de carburo de silicio 50 mg/ml mediante la adición del volumen apropiado de 8,1 ml de medio líquido GN6 S/M a ~405 mg de fibras de carburo de silicio estériles previamente tratada en autoclave (Advanced Composite Materials, Inc.).

Después de la incubación en GN6 S/M, el contenido de cada matraz se combinó en un frasco de centrifuga de 250 ml. Una vez que todas las células sedimentaron en el fondo, el total menos de ~14 ml de líquido GN6 S/M se extrajeron y recolectaron en un matraz estéril de 1 L para uso futuro. La suspensión previamente humectada de los filamentos se agitó 60 segundos en velocidad máxima y luego se añadieron 8,1 ml al frasco, al cual se añadieron 170 µg de ADN como última etapa. El frasco se colocó inmediatamente en un mezclador de pintura comercial Red Devil 5400 modificado y se agitó durante 10 segundos. Después de la agitación, se añadió el cóctel de células, medios, filamentos y ADN al contenido de un matraz de 1 L junto con 125 ml de medio líquido GN6 fresco para reducir el agente osmótico. Las células se dejaron recuperar en un agitador a 125 RPM durante 2 horas a 28 °C antes de ser filtrada sobre papel de filtro Whatman # 4 (5,5 cm) utilizando una unidad recolectora de la celda de

vidrio que estaba conectado a una línea de vacío interna.

Aproximadamente 2 ml de la suspensión dispersada se pipetearon sobre la superficie del filtro a medida que se realizó el vacío. Los filtros se colocaron en placas de 60 x 20 mm de medio de GN6. Las placas se cultivaron durante 1 semana a 28 °C en una caja oscura.

- 5 Después de 1 semana, los papeles de filtro se transfirieron a placas de 60x20 mm de medio GN6 (3P) (medio N6, 2,0 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mio-inositol, 3 µM de imazetapir de Pursuit® DG, 2,5 g/L de Gelrite, pH 5,8). Las placas se colocaron en cajas y se

- 10 Dos semanas después de la transformación, el tejido se incrustó mediante el raspado de todas las células sobre la placa en 3,0 ml de medio de agarosa GN6 fundido (medio N6, 2,0 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mio-inositol, 7 g/L de agarosa Sea Plaque, pH 5,8, autoclave durante sólo 10 minutos a 121 °C) que contienen 3 µM de imazetapir de Pursuit® DG. El tejido se rompió y los 3 ml de agarosa y el tejido se vertieron uniformemente sobre la superficie de una placa de 100 x 15 mm de GN6 (3P). Esto se repitió para todas las placas restantes. Una vez incorporado, las placas se sellaron individualmente con Nescofilm® o Parafilm M®, y después se cultivaron hasta que aparecieron las cepas putativas.

- 15 8.4.1- Protocolo para la recuperación y regeneración de la cepa.

Se aislaron eventos putativamente transformados de las placas incrustadas que contienen Pursuit® aproximadamente 9 semanas después de la transformación mediante la transferencia a medio de selección fresco de la misma concentración en placas de 60 x 20 mm. Si el crecimiento sostenido era evidente después de aproximadamente 2-3 semanas, el evento se consideró resistente y se sometió a análisis molecular.

- 20 La regeneración se inició mediante la transferencia de tejido de callo a un medio de inducción basado en citoquinina, 28 (3P), que contiene 3 µM de imazetapir de Pursuit DG, sales y vitaminas MS, 30,0 g/L de sacarosa, 5 mg/L de BAP, 0,25 mg/L 2,4-D, 2,5 g/L de Gelrite; pH 5,7. Las células se dejaron crecer en condiciones de poca luz ($13 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante una semana, luego mayor luz ($40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante otra semana, antes de transferirse a un medio de regeneración, 36 (3P), que era idéntica a 28 (3P), excepto que carecía de reguladores del crecimiento de plantas. Se retiraron plántulas pequeñas (3-5 cm) y se colocaron en tubos de cultivo de 150 x 25 mm con medio SHGA libre de selección (sales y vitaminas basales Schenk y Hildebrandt, 1972; 1 g/L de mio-inositol, 10 g/L de sacarosa, 2,0 g/L de Gelrite, pH 5,8). Una vez que las plántulas desarrollaron un sistema de raíces y brotes suficiente, se trasplantaron a suelo en el invernadero.

- 30 A partir de 4 experimentos, las plántulas completas, compuestas por un brote y raíz, se formaron in vitro sobre las placas de selección incrustadas bajo condiciones de oscuridad, sin someterse a una fase de callo tradicional. El tejido de hoja de 9 de estos "regeneradores tempranos" se enviaron para PCR de la región codificadora y PCR de la unidad de transcripción de las plantas (PTU) para el gen AAD-12 y el casete de gen, respectivamente. Todos tenían una región codificadora intacta AAD-12, mientras que el 3 no tuvieron una PTU de longitud completa (Tabla 15). Estos "regeneradores tempranos" se identificaron como 4.101 eventos para diferenciarlos de los eventos derivados tradicionalmente, que se identificaron como eventos "1283". Las plantas de 19 eventos adicionales, obtenidas a través de la selección y regeneración estándar, se enviaron a al invernadero, se cultivaron hasta la madurez y se polinizaron en forma cruzada con una línea endogámica patentada para producir semillas T₁. Algunos de los eventos parecen ser clones entre sí debido a los patrones de bandas similares después de la transferencia de Southern, por lo que estaban representados solo 14 eventos únicos. Las plantas T₀ de los eventos fueron tolerantes a 70 g/ha de imazetapir. El análisis Invader (gen AHAS) indicó que la complejidad de la inserción varía de 1 a > 10 copias. Trece eventos contenían la región codificadora completa para AAD-12; sin embargo, otro análisis indicó que la unidad de transformación de la planta no se había incorporado para nueve eventos. Ninguno de 1.863 eventos comprometidos avanzó más allá de la etapa T₁ y la posterior caracterización utilizó los 4.101 eventos.

8,5—Análisis molecular: Materiales y métodos del maíz.

- 45 8.5.1 — Aislamiento y cuantificación del ADN recolectado del tejido. El tejido fresco se coloca en tubos y se liofiliza a 4 °C durante 2 días. Después de que el tejido se seca totalmente, se coloca una perla de tungsteno (Valenite) en el tubo y las muestras se someten a 1 minuto de molienda en seco utilizando un molino de perlas Kelco. Luego se sigue el método de aislamiento de ADN DNeasy estándar (Qiagen, DNeasy 69109). Una alícuota del ADN extraído luego se tiñe con Pico verde (Molecular Probes P7589) y se lee en el fluorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng /µl.

- 50 8.5.2 — Análisis del ensayo Invader. Las muestras de ADN se diluyen a 20 ng /µl luego se desnaturalizaron por incubación en un termociclador a 95 °C durante 10 minutos. La mezcla de Signal Probe luego se prepara usando la mezcla de oligo proporcionada y MgCl₂ (Third Wave Technologies). Una alícuota de 7,5 µl se coloca en cada pocillo de la placa de ensayo Invader seguida por una alícuota de 7,5 µl de los controles, estándares y 20 ng/µl de muestras desconocidas diluidas. Cada pocillo se superpone con 15 µl de aceite mineral (Sigma). Las placas luego se incuban a 63 °C durante 1 hora y se leen en el fluorómetro (Biotek). El cálculo del % de señal respecto del fondo de la sonda blanco dividida por el % de señal respecto de la sonda de control interno umbral calculará la proporción. La relación de los estándares de copia conocida desarrollada y validada con el análisis de transferencia de Southern se

utiliza para identificar la copia estimado de los eventos desconocidos.

8.5.3 — Reacción en cadena de polimerasa. Un total de 100 ng de ADN total se utiliza como el molde. 20 mM de cada cebador se utiliza con el kit de Takara Ex Taq Polimerasa PCR (Mirus TAKRR001A). Los cebadores para PTU de AAD-12 (v1) son directo- GAACAGTTAGACATGGTCTAAAGG (SEQ ID NO: 8) e inverso- GCTGCAACACTGATAAATGCCAACTGG (SEQ ID NO: 9). La reacción de PCR se lleva a cabo en el termociclador Geneamp 9700 (Applied Biosystems), al someter las muestras a 94 °C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 63 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 1 minuto y 45 segundos, seguido por 72 °C durante 10 minutos.

Los cebadores para PCR de la región codificadora de AAD-12 (v1) son directo-ATGGCTCAGACCACTCTCCAAA (SEQ ID NO: 10) e inverso- AGCTGCATCCATGCCAGGGA (SEQ ID NO: 11). La reacción de PCR se lleva a cabo en el termociclador Geneamp 9700 (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94 °C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 65 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 1 minuto y 45 segundos, seguido por 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizan por electroforesis en un gel de agarosa 1% teñido con EtBr.

8.5.4 — Análisis de transferencia Southern.

El análisis de transferencia Southern se realiza con ADN genómico obtenido de un kit Qiagen DNeasy. Un total de 2 µg de ADN genómico o 10 µg de ADN del callo genómico se somete a una digestión durante la noche utilizando BSM I y enzimas de restricción SWA I para obtener los datos de PTU.

Después de la digestión durante la noche una alícuota de ~ 100 ng se corre en un gel 1% para asegurar la digestión completa. Después de esta seguridad, las muestras se corren un gel de agarosa grande 0,85% durante la noche a 40 voltios. El gel se desnaturaliza entonces en NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. El gel se neutraliza a continuación en 0,5 M de Tris HCl, 1,5 M de NaCl pH de 7,5 durante 30 minutos. Un aparato de gel que contiene 20x SSC luego se ajusta para obtener un gel de gravedad para la transferencia de membrana de nylon (Millipore INYC00010) durante la noche. Después de la transferencia durante la noche, la membrana se somete después a la luz UV a través de un agente de reticulación (Stratagene UV Stratalinker 1800) en 1200 X100 microjoule. La membrana se lava a continuación en SDS 0,1%, SSC 0,1 durante 45 minutos. Después del lavado de 45 minutos, la membrana se cocina durante 3 horas a 80 °C y luego se almacena a 4 °C hasta la hibridación. El fragmento del molde de hibridación se prepara utilizando la PCR de la región codificadora anterior utilizando el ADN de plásmido. El producto se corre en un gel de agarosa 1% y se escinde y luego se extrae en gel usando el método de extracción en gel Qiagen (28706). La membrana luego se somete a una pre-hibridación en la etapa de 60 °C durante 1 hora en buffer Perfect Hyb (Sigma H7033). El método rxn marcado con Prime it RMT dCTP (Stratagene 300.392) se utiliza para desarrollar la sonda basada en p32 (Perkin Elmer). La sonda se limpia utilizando las columnas Probe Quant. G50 (Amersham 27-5335-01). Dos millones de cuentas CPM se utilizan para hibridar las transferencias Southern durante la noche. Después de la hibridación durante la noche las transferencias luego se someten a dos lavados de 20 minutos a 65 °C en SDS 0,1%, SSC 0,1. Las transferencias luego se exponen a la película durante la noche, incubando a -80 °C.

8.6 — Tolerancia herbicida pos-emergencia en maíz T₀ transformado con AAD-12.

Cuatro eventos T₀ se dejaron aclimatarse en el invernadero y se dejaron crecer hasta que 2-4 hojas nuevas de apariencia normal habían emergido del verticilo (es decir, las plantas habían pasado del cultivo de tejidos a las condiciones de cultivo en el invernadero). Las plantas se cultivaron a 27 °C bajo condiciones de 16 horas de luz: 8 horas de oscuridad en el invernadero. Las plantas luego se trataron con formulaciones comerciales de cualquiera de Pursuit® (imazetapir) o 2,4-D amina 4. Pursuit® se pulverizó para demostrar la función del gen marcador seleccionable presente dentro de los eventos analizados. Las aplicaciones de herbicidas se realizaron con un pulverizador de pista a un volumen de pulverización de 187 L/ha, altura de pulverización de 50 cm. Las plantas se pulverizaron con una dosis letal de imazetapir (70 g ae/ha) o una tasa de sal 2,4-D DMA capaz de lesiones significativas en líneas de maíz no transformadas (2240 g ae/ha). Una dosis letal se define como la tasa que causa > 95% de lesiones en la línea endogámica Hi-II. Hi-II es el trasfondo genético de los transformantes de la presente invención.

Varios individuos se protegieron de los herbicidas a los que los genes respectivos debían proporcionar resistencia. El clon individual '001' del evento "001" (aka, 4101 (0)-001- 001), sin embargo, incurrió en lesión menor, pero se recuperó con un 14 DAT. Tres de los cuatro eventos se trasladaron y los individuos se cruzaron con 5XH751 y se llevaron a la siguiente generación. Cada planta tolerante al herbicida fue positiva para la presencia de la región codificadora de AAD-12 (ensayo de PCR) o la presencia del gen AHAS (ensayo Invader) para plantas tolerantes a 2,4-D e imazetapir, respectivamente. La proteína de AAD-12 se detectó en todos los eventos de las plantas T₀ tolerantes a 2,4-D que contienen una región codificadora intacta. El número de copias del transgén (AHAS, y por inferencia AAD-12) varió significativamente de 1 a 15 copias. Individual Para las plantas T₀ se cultivaron hasta la madurez y se polinizaron de forma cruzada con una línea endogámica patentada con el fin de producir semillas T₁.

Tabla 15. Caracterización de las plantas de maíz T₀ transformadas con AD-12.

Evento	Tratamiento de pulverización	% de lesión (14 DAT)	AAD-12 ELISA (ppm TSP)	AAD12 PCR (Región codificadora)	AAD12 PCR (PTU)	Copia AHAS # (Invader)
4101(0)003.001	2240 g ae/ha 2,4-D	0	146,9	+	+	1
4101(0)003,003	2240 g ae/ha 2,4-D	0	153,5	+	+	1
4101(0)005,001	2240 g ae/ha 2,4-D	0	539,7	+	+	9
4101(0)005,0012	0 g ae/ha 2,4-D 70 g ae/ha imazetapir	0	562,9	+	+	7
4101(0)001,001		5	170,7	+	+	6
4101(0)002,001	0 g ae/ha imazetapir	0	105,6	+	-	2
4101(0)002,002	70 g ae/ha imazetapir	0	105,3	+	-	2
4101(0)003,002	70 g ae/ha imazetapir	0	0	+	Banda menor que la esperada	15

8.7 — Verificación de tolerancia alta a 2,4-D en maíz T₁.

La semilla T₁ AAD-12 (v1) se plantaron en macetas de 3 pulgadas que contienen medios Metro Mix y en 2 etapas de la hoja se pulverizaron con 70 g ae/ha de imazetapir para eliminar los nulos. Las plantas sobrevivientes se trasplantaron a macetas de 1 galón contienen medios Metro Mix y se colocaron en las mismas condiciones de cultivo que antes. En la etapa V3-V4, las plantas se pulverizaron con el pulverizador de pista ajustado a 187 L/ha, ya sea 560 o 2240 g ae/ha de 2,4-D DMA. Las plantas se clasificaron a 3 y 14 DAT y en comparación con las plantas de control 53CH751 x Hi II. Se desarrolló una escala de clasificación de 0 a 10 (sin lesión a lesión de auxina extremo) para distinguir lesiones de las raíces secundarias. Se tomaron los grados de raíces secundarios en 14 DAT para mostrar tolerancia de 2,4-D. 2,4-D provoca malformación de las raíces secundarias, y es un indicador compatible de la lesión de los herbicidas auxínicos en el maíz. Los datos de raíces secundarias (como se ve en la siguiente tabla) demuestran que 2 de los 3 eventos analizados eran robustamente tolerantes a 2240 g ae/ha de 2,4-D DMA. El evento "pDAB4101(0)001.001" fue aparentemente inestable; sin embargo, los otros dos eventos fueron robustamente tolerantes al 2,4-D y 2,4-D + de imazetapir o 2,4D + glifosato (ver Tabla 16).

Tabla 16. Lesión de raíz secundaria de plantas T₁ transformadas AAD-12 (v1) y plantas de maíz control no transformadas. Una escala de 0-10, 10 es el más alto, se usó para la calificación de la lesión 2,4-D DMA. Los resultados son un promedio visual de cuatro repeticiones por tratamiento.

Herbicida	Control no transformado	AAD-12 (v1) pDAB4101(0)003,003	AAD-12 (v1) pDAB4101(0)001,001	AAD-12 (v1) pDAB4101(0)005,001
Lesión de raíces secundarias promedio (escala 0-10)				
0 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	0	0
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	9	1	8	0

8.8 — Heredabilidad de AAD-12 (v1) en maíz.

Una prueba de progenie también se llevó a cabo en siete familias T₁ de AAD-12 (v1) que se había cruzado con 5XH751. Las semillas se plantaron en macetas de tres pulgadas como se describió anteriormente. En la etapa de

hoja 3 todas las plantas se pulverizaron con 70 g ae/ha de imazetapir en el pulverizador de pista como se describió anteriormente. Después de 14 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Cuatro de las seis líneas analizadas se segregaron como un único locus, rasgo mendeliano dominante (1R:1S) como se determina por análisis de Chi cuadrado. Las plantas sobrevivientes posteriormente fueron rociadas con 2,4-D y todas las plantas se consideraron tolerantes al 2,4-D (tasas de ≥ 560 g ae/ha). AAD-12 es heredable como un gen de resistencia a la auxina ariloxialcanoato robusto en múltiples especies cuando se cruzan recíprocamente con un híbrido comercial.

8.9 — Apilamiento de AAD-1,2 (v1) para aumentar el espectro herbicida

AAD-12 (v1) (pDAB4101) y líneas de elite endogámicas Roundup Ready (BE1146RR) se cruzaron recíprocamente y se recolectaron semillas F_1 . La semilla de dos líneas F_1 se plantó y se trató con 70 g de ae/ha de imazetapir en la etapa V2 para eliminar los nullos. Para las plantas que sobreviven, se separaron los rep se trataron con 1,120 g de ae/ha de 2,4-D DMA + 70 g ae/ha de imazetapir (para confirmar la presencia del gen AHAS) o 1.120 g ae/ha de 2,4-D DMA + 1,680 g ae/ha de glifosato (para confirmar la presencia del gen Round Up Ready) en un pulverizador de pista calibrado a 187 L/ha. Las plantas se calificaron 3 y 16 DAT. Los datos de pulverización mostraron que AAD-12 (v1) se puede apilar convencionalmente con un gen de tolerancia a glifosato (tales como el gen CP4-EPSPS Roundup) u otros genes de tolerancia a herbicidas para proporcionar un mayor espectro de herbicidas que se pueden aplicar de forma segura al maíz. Del mismo modo se observó tolerancia a imidazolinona + 2,4-D + glifosato en las plantas F_1 y no mostró fenotipo negativo por las combinaciones de apilamiento molecular o reproducción de estos múltiples transgenes.

Tabla 17. Datos que demuestran aumento del espectro de tolerancia a herbicidas resultante de un apilamiento F_1 de AAD-12 (v1) y BE1146RR (una línea endogámica tolerante al glifosato de elite abreviada como AF).

Herbicida	Control no transformado	2P782 (control Roundup Ready)	AAD-12 (v1) pDAB4101(0) 003.R003.AF	AAD-12 (v1) pDAB4101(0) 005.R001.AF
	% promedio de de lesión 16DAT			
0 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	0	0
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	21	19	0	0
1120 g ae/ha 2,4-D DMA + 70 g ae/ha imazetapir	100	100	5	1
01120 g ae/ha 2,4-D DMA + 1680 g ae/ha glifosato	100	71	2	5

8.10- Tolerancia en el campo de plantas de maíz transformadas con pDAB4101 a los herbicidas 2,4-D, triclopir y fluroxipir.

Se llevaron a cabo ensayos de tolerancia en campo en dos eventos AAD-12 (v1) pDAB4101 (4101(0)003.R.003.AF y 410,1(0)005.R001.AF) y un híbrido control Roundup Ready (RR) (2P782) en Fowler, Indiana y Wayside, Mississippi. Las semillas se sembraron con sembrador de cono en espacio entre hileras de 40 pulgadas en Wayside y 30 pulgadas de espacio en Fowler. El diseño experimental fue un diseño de bloque completo aleatorizado con 3 repeticiones. Los tratamientos herbicidas eran 2,4-D (sal dimetilamina) en 1120, 2240 y 4480 g ae/ha, triclopir a 840 g ae/ha, fluroxipir a 280 g ae/ha y un control no tratado. Los eventos (v1) AAD-12 contenían el gen AHAS como un marcador seleccionable. Los eventos de maíz F_2 se segregaron de modo que las plantas AAD-12 (v1) se trataron con imazetapir a 70 g ae/ha para eliminar las plantas nulas. Los tratamientos herbicidas se aplicaron cuando el maíz llegó a la etapa V6 usando comprimido rociador de mochila de aire comprimido que administra un volumen portador de 187 L/ha a 130-200 kPa de presión. Las calificaciones de lesiones visuales se tomaron a 7, 14 y 21 días después del tratamiento. Las calificaciones de lesiones de las raíces secundarias se tomaron 28 DAT en una escala de 0-10 con 0-1 como fusión de raíces secundarias leve, 1-3 es hinchamiento de raíces secundarias moderada/proliferación errante y raíces, 3-5 es fusión de las raíces secundarias moderada, 5-9 fusión y malformación de raíces secundarias grave y 10 inhibición total de raíces secundarias.

La respuesta del evento AAD-12 (v1) al 2,4-D, triclopir y fluroxipir a los 14 días después del tratamiento se muestran en la Tabla 18. La lesión del cultivo fue más grave en 14 DAT. El maíz de control RR (2P782) fue gravemente dañado (44% a 14 DAT) por 2,4-D en 4480 g ae/ha, lo que es 8 veces (8x) la tasa de uso en el campo normal. Los eventos AAD-12 (v1) demostraron una excelente tolerancia al 2,4-D en 14 DAT con 0% de lesión a las tasas 1, 2 y 4X, respectivamente. El maíz de control (2P782) fue gravemente dañado (31% a 14 DAT) por la tasa 2X de triclopyr (840 g ae/ha). Los eventos AAD-12 (v1) demostraron tolerancia a tasas 2X de triclopir con un promedio de 3% de lesión a los 14 DAT través de los dos eventos. Fluroxipir a 280 g ae/ha causado 11% de lesión visual a la del maíz

tipo salvaje a 14 DAT. Los eventos de AAD-12 (v1) mostraron un aumento de tolerancia con un promedio de 8% de lesión 5 DAT.

Las aplicaciones de herbicidas auxínicos al maíz en la etapa de crecimiento V6 pueden causar una malformación de las raíces secundarias. La Tabla 18 muestra la gravedad de la lesión de la raíz secundaria causada por 2,4-D, triclopir, y fluroxipir. Triclopir a 840 g ae/ha causó la fusión y malformación de raíces secundarias que producen una puntuación de la lesión de la raíz secundaria promedio de 7 en el maíz de tipo control 2P782. Ambos eventos de maíz AAD-12 (v1) no mostraron lesión de raíces secundarias del tratamiento con triclopir. La lesión de las raíces secundarias en maíz 2P782 aumentó con tasas crecientes de 2,4-D. A 4480 g ae/ha de 2,4-D, los eventos de AAD-12 no mostraron lesión de la raíz secundaria; mientras que se observó fusión y malformación grave de raíces secundarias en el híbrido 2P782. Fluroxipir causó solo hinchamiento y dispersión moderados de las raíces secundarias en el maíz de tipo salvaje con los eventos AAD-12 (v1) que no muestran lesiones de las raíces secundarias.

Estos datos muestran claramente que la AAD-12 (v1) transmite la tolerancia de alto nivel en el maíz a 2,4 D, triclopir y fluroxipir a tasas muy por encima de los que se utilizan en el comercio y que causna severa lesión visual y de raíces secundarias no AAD-12.

Tabla 18. Lesión visual de los eventos AAD-12 y de maíz tipo salvaje después de las aplicaciones foliares de 2,4-D, triclopir y fluroxipir en las condiciones de campo.

Tratamiento	Tasa (g ae/ha)	% de lesión visual 14DAT		
		AAD-12 4101(0)003.R003.AF	AAD-12 124101(0)005.001.AF	2P782 control
No tratado	0	0	0	0
2,4.-D—	1120	0	0	9
2,4-D	2240	0	1	20
2,4-D	4480	0	1	34
Fluroxipir	280	1	5	11
Triclopir	840	3	4	31
Dicamba	840	8	8	11

Tabla 19. Calificaciones de lesión de raíces secundarias para plantas de maíz AAD-12 y tipo salvaje en respuesta 2,4-D, triclopir y fluroxipir en condiciones de campo.

Tratamiento	Tasa (g ae/ha)	Calificación de lesión de raíces secundarias, (escala 0-10) 28DAT		
		Evento AAD-12 4101(0)003.R003.AF	Evento AAD-12 4101(0)005.001.AF	NK603 tipo salvaje
No tratado	0	0	0	0
2,4-D	1120	0	0	3
2,4-D	2240	0	0	5
2,4-D	4480	0	0	6
Fluroxipir	280	0	0	2
Triclopir	840	0	0	7
Dicamba	840	1	1	1

Ejemplo 9. Detección de proteína de las plantas transformadas por medio del anticuerpo

9.1 — Extracción de AAD-12 (v1) de hojas de planta.

Aproximadamente de 50 a 100 mg de tejido foliar se cortó en trozos pequeños (o 4 discos de hojas perforadas con un solo orificio) y se pusieron en tubos agrupados de 2 ml que tienen 2 perlas BB de acero inoxidable (4,5 mm; Daisy Co., cat # 145462.-000). Quinientos microlitros del buffer de extracción de la planta (PBS que contiene 0,05 Tween 20 y albúmina sérica bovina 1%) se añadió a cada muestra. Los tubos se taparon y sujetaron en Geno/Grinder (Modelo 2000-115, Certiprep, Metuchen, NJ) y se agitaron durante 6 minutos con el ajuste a 1x de 500 rpm. Los tubos se centrifugaron a 5000x g durante 10 min y el sobrenadante que contiene las proteínas solubles se analizaron para determinar AAD-12 (v1) mediante transferencias Western y ELISA.

9.2 — Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima(ELISA).

El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario. Cien micro-litros de anticuerpo anti-AAD-12 purificado (0,5 µg/ml) se recubrió en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se incubó a 4 °C durante 16 horas. La placa se lavó cuatro veces con buffer de lavado (solución salina regulada con fosfato 100 mM (PBS; pH 7,4) que contiene Tween 20 0,05%) usando un lavador de placas, seguido por bloqueo con 4% de leche descremada disuelta en PBS durante 1 hora. Después del lavado, 100 µl de AAD-12 estándar de las concentraciones o extractos vegetales conocidos de diferentes muestras se incubaron en los pocillos. Para la curva estándar, AAD-12 purificado se diluyó 2 veces en forma seriada de 52 a 0,813 ng/ml por triplicado. Los extractos de plantas se diluyeron 5, 10, 20, y 40 veces en PBS y se analizaron por duplicado. Después de 1 hora de incubación, la placa se lavó como anteriormente. Cien micro-litros de anticuerpo anti-AAD-12 conjugado con HRP (0,5 ug/ml) se incubó en cada pocillo durante 1 hora antes de lavar. Cien microlitros de sustrato HRP, 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (Pierce, Rodford, IL) se incubó en cada pocillo durante 10 minutos antes de detener la reacción mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 0,4 N. La DO de cada pocillo se midió usando un lector de microplaca a 450 nm. Para determinar las concentraciones de AAD-12 (v1) en el extracto de planta, el valor de DO de los duplicados se promediaron y extrapolaron de la curva estándar usando el Softinax® Pro ver. 4,0 (Molecular Devices).

Para la comparación, cada muestra se normalizó con su peso fresco y se calculó el porcentaje de expresión.

9.3 — Análisis de transferencia Western.

Los extractos de plantas o estándares de AAD-12 (5 y 0,5 µg/ml) se incubaron con buffer de muestra Laemmli a 95 °C durante 10 minutos y se separaron por electroforesis en gel Precast Tris-Glicina 8-16%. Las proteínas luego se electro-transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa utilizando el protocolo estándar. Después del bloqueo en leche descremada 4% en PBS, la proteína AAD-12 (v1) se detectó mediante el antisuero anti-AAD-12 seguido de conjugados anti-conejo/HRP de cabra. La proteína detectada se visualizó mediante el sustrato de quimioluminiscencia del reactivo de análisis Western ECL (Amersham, NJ).

Ejemplo 10 —Transformación del tabaco

La transformación del tabaco con *Agrobacterium tumefaciens* se llevó a cabo mediante un método similar, pero no idéntico, a los métodos publicados (Horsch et al., 1988). Para proporcionar el tejido fuente para la transformación, las semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. KY160) se esterilizaron en superficie y se plantaron en la superficie del medio TOB, que es un medio de Murashige y Skoog sin hormonas (Murashige y Skoog, 1962) solidificado con agar. Las plantas se cultivaron durante 6-8 semanas en una sala incubadora iluminada a 28-30 °C y las hojas recolectadas de forma estéril para usar en el protocolo de transformación. Los trozos de aproximadamente un centímetro cuadrado se cortaron de forma estéril de estas hojas, excluyendo el nervio central. Los cultivos de las cepas de *Agrobacterium* (EHA101S que contienen pDAB3278, aka pDAS1580, AAD-12 (v1) + PAT), cultivadas durante la noche en un matraz en un agitador ajustado a 250 rpm a 28 °C, se sedimentaron en una centrifuga y se resuspendieron en sales de Murashige y Skoog estériles, y se ajustaron a una densidad óptica final de 0,5 a 600 nm. Los fragmentos de hojas se sumergieron en esta suspensión bacteriana durante aproximadamente 30 segundos, y luego se secaron en toallas de papel estériles y se colocaron boca arriba en medio TOB + (medio Murashige y Skoog que contiene 1 mg/l de ácido indol acético y 2,5 mg/L de benciladenina) y se incubaron en la oscuridad a 28 °C. Dos días después los trozos de hojas se trasladaron a medio TOB + que contiene 250 mg/l de cefotaxima (Agri-Bio, North Miami, Florida) y 5 mg/L glufosinato de amonio (ingrediente activo en Basta, Bayer Crop Sciences) y se incubaron a 28-30 °C en la luz. Los trozos de hoja se trasladaron al medio TOB + fresco con cefotaxime y Basta dos veces por semana durante las primeras dos semanas y una vez por semana a partir de ese momento. Cuatro a seis semanas después de que los trozos de hojas se trataron con las bacterias, las plantas pequeñas derivadas de focos transformados se extrajeron de esta preparación de tejido y se plantaron en un medio TOB que contienen 250 mg/L de cefotaxima y 10 mg/L de Basta en recipientes de Phytatray™ II (Sigma). Estas plántulas se cultivaron en una sala incubadora iluminada. Después de 3 semanas, se tomaron recortes de tallo y se enraizaron de nuevo en el mismo medio. Las plantas estaban listas para enviar al invernadero después de 2-3 semanas adicionales.

Las plantas se trasladaron al invernadero mediante el lavado del agar de las raíces, se trasplantaron en el suelo en macetas de 13,75 cm cuadrados, y se colocó la maceta en una bolsa Ziploc® (SC Johnson & Son, Inc.), se puso agua de la canilla en la parte inferior de la bolsa y se colocó a la 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, en este momento se retiró la bolsa. Las plantas se cultivaron en condiciones de invernadero cálidas ordinarias (30 °C, día 16 horas, 8 horas de la noche, luz natural mínima + suplementaria = 500 g / $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$).

Antes de propagación, las plantas T_0 se muestrearon para el análisis de ADN para determinar el número de copias del inserto. El gen PAT que estaba ligado molecularmente a AAD-12 (v1) se ensayó por conveniencia. El tejido fresco se colocó en tubos y se liofilizó a 4 °C durante 2 días. Después de que el tejido se secó totalmente, una perla de tungsteno (Valenite) se colocó en el tubo y las muestras se sometieron a 1 minuto de molienda en seco utilizando un molino de perlas Kelco. Luego se siguió el método de aislamiento estándar de ADN DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). Una alícuota del ADN extraído luego se tiñó con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se leyó en el fluorómetro (BioTek) con patrones conocidos para obtener la concentración en ng/ μl .

Las muestras de ADN se diluyeron a 9 ng/ μl y luego se desnaturalizaron por incubación en un termociclador a 95 °C durante 10 minutos. A continuación, la mezcla de Signal Probe se preparó usando la mezcla de oligo proporcionada y MgCl_2 (Third Wave Technologies). Una alícuota de 7,5 μl se colocó en cada pocillo de la placa de ensayo Invader seguido de una alícuota de 7,5 μl de los controles, estándares y 20 ng/ μl de muestras desconocidas diluidas. Cada pocillo se recubrió con 15 μl de aceite mineral (Sigma). Las placas se incubaron a continuación a 63 °C durante 1,5 horas y se leyeron en el fluorómetro (Biotek). El cálculo del % de señal respecto del fondo para la sonda blanco dividido por el % de señal respecto de la sonda de control interno umbral calculará la proporción. Se utilizó la relación de los estándares de copia conocidas desarrollado y validado con análisis Southern para identificar la copia estimada de los eventos desconocidos.

Todos los eventos también se analizaron para determinar la presencia del gen AAD-12 (v1) mediante PCR utilizando las mismas muestras de ADN extraído. Se utilizó un total de 100 ng del ADN total como molde. 20 mM de cada cebador se utilizó con el kit de Takara Ex Taq Polimerasa PCR. Los cebadores para la PCR de unidad de transcripción de plantas (PTU) AAD-12 fueron (SdpacodF: ATGGCTCA TGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO: 12) y (SdpacodR: CGGGCAGGCCTAACTCCACC AA) (SEQ ID NO: 13). La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador Geneamp 9700 (Applied-Biosystems), sometiendo a 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 PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con EtBr. De cuatro a 12 linajes clonales de cada uno de 18 eventos positivos de PCR con 1-3 copias de gen PAT (y presumiblemente AAD-12 (v1), ya que estos genes están vinculados físicamente) se regeneraron y se trasladaron al invernadero.

10.1 Tolerancia al herbicida pos-emergencia en tabaco T_0 transformado con AAD-12 (v1)

Las plantas T_0 de cada uno de los 19 eventos se expusieron a una amplia variedad de 2,4-D, triclopir o fluroxipir rociados sobre las plantas que tenían 3-4 pulgadas de alto. Las aplicaciones de pulverización se realizaron como se describe anteriormente usando un pulverizador de pista en un volumen de pulverización de 187 L/ha. La sal de dimetilamina 2,4-D (Riverside Corp) se aplicó a 0, 140, 560, o 2240 g ae/ha para clones representativos de cada evento mezclado en agua desionizada. Fluroxipir se aplicó igualmente a 0,35, 140, o 560 g ae/ha. Triclopir se aplicó a 70, 280, o 1.120 g ae/ha. Cada tratamiento se repitió 1-3 veces. Las calificaciones de lesiones se registraron 3 y 14 DAT. Cada evento analizado fue más tolerante al 2,4-D que la línea de control no transformada KY160. En varios eventos, algunos epinastia inicial relacionada con los herbicidas auxínicos se produjo a dosis de 560 g ae/ha 2,4-D o menos. Algunos eventos no produjeron lesiones en el 2,4-D aplicado a 2.240 g ae/ha (equivalente a la tasa de campo 4X). En general, los eventos AAD-12 (v1) fueron más sensibles a fluroxipir, seguido de triclopir, y menos afectado por 2,4-D. La calidad de los eventos en relación con la magnitud de la resistencia fue discernida usando respuestas de plantas T_0 a 560 g ae/ha de fluroxipir. Los eventos se clasificaron en (> 40% de lesiones 14 DAT), "medio" (20 a 40% de la lesión), "alta" (<20% de la lesión) "bajo". Algunos eventos fueron incompatibles en la respuesta entre los replicados y se consideraron "variables".

Tabla 20. Los eventos T_0 de tabaco transformados con pDAS1580

#	Planta ID	Copia	PCR PTU	PTU completa y	PTU completa y	Tolerancia al herbicida relativa@
Tubo		PAT	AAD-12	Bajo 2	1 copia	
1	1580[1]-001	6	+			No analizado
2	1580[1]-002	8	+			No analizado
3	1580[1]-003	10	+			No analizado
4	1580[1]-004	1	+	*	*	Alto

5	1580[1]-005	2	+	*		Variable
6	1580[1]-006	6	+			No analizado
7	1580[1]-007	4	+			No analizado
8	1580[1]-008	3	+			Variable
9	1580[1]-009	4	+			No analizado
10	1580[1]-010	8	+			No analizado
11	1580[1]-011	3	+			Alto
12	1580[1]-012	12	+			No analizado
13	1580[1]-013	13	+			No analizado
14	1580[1]-014	4	+			No analizado
15	1580[1]-015	2	+	*		Alto
16	1580[1]-016	1 ?	+	*	*	Alto
17	1580[1]-017	3	+			Alto
18	1580[1]-018	1	+	*	*	Variable
19	1580[1]-019	1	+	*	*	Variable
20	1580[1]-020	1	+	*	*	No analizado
21	1580[1]-021	1	+	*	*	No analizado
22	1580[1]-022	3	+			Variable
23	1580[1]-023	1	+	*	*	Variable
24	1580[1]-024	1	+,	*	*	Variable
25	1580[1]-025	5	+			No analizado
26	1580[1]-026	3	+			Variable
27	1580[1]-027	3	+			Bajo
28	1580[1]-028	4	+			No analizado
29	1580[1]-029	3	+			Variable
30	1580[1]-030	1	+	*	*	Alto
31	1580[1]-031	1	+	*	*	Alto
32	1580[1]-032	2	+	*		Alto

@ El rendimiento de tolerancia al herbicida diferenciado de los eventos requirió la evaluación de tolerancia relativa cuando se trata con 560 g ae/ha de fluroxipir cuando la tolerancia era variable a los largo de los eventos.

10.2 Verificación de tolerancia a 2,4-D alta en tabaco T₁.

- 5 Dos a cuatro individuos T₀ que sobreviven a altas tasas de 2,4-D y fluroxipir se guardaron de cada evento y se dejaron autofertilizar en el invernadero para dar origen a las semillas T₁. La semilla T₁ se estratificó y se sembró en placas de selección parecidas a las de Arabidopsis (Ejemplo 7.4), seguido de la eliminación selectiva de los nulos no transformadas en esta población segregada con 560 g ai/ha de glufosinato (selección de genes PAT). Los sobrevivientes se transfirieron a macetas individuales de 3 pulgadas en el invernadero. Estas líneas proporcionaron altos niveles de resistencia al 2,4-D en la generación T₀. La mejora de la consistencia de la respuesta se prevé en
- 10 las plantas T₁ que no provienen directamente del cultivo de tejidos. Estas plantas se compararon contra el tabaco KY160 tipo salvaje. Todas las plantas se pulverizaron con un pulverizador de pista ajustado a 187 L/ha. Las plantas se pulverizaron de un intervalo de 140- 2240 g ae/ha de sal de 2,4-D dimetilamina (DMA), 70 a 1120 g ae/ha de

triclopir o 35 a 560 g ae/ha de fluroxipir. Todas las aplicaciones se formularon en el agua. Cada tratamiento se repitió 2-4 veces. Las plantas se evaluaron a los 3 y 14 días después del tratamiento. A las plantas se les asignaron calificaciones de lesión con respecto a la atrofia, clorosis y necrosis. La generación T₁ se está segregando, por lo que se espera alguna respuesta variable debido a la diferencia en cigosidad.

- 5 No se observó lesión a una tasa de campo 4X (2240-g ae/ha) para 2,4-D o inferior. Se observaron algunas lesiones en los tratamientos con triclopir en una línea del evento, pero el mayor daño se observó con fluroxipir. La lesión de fluroxipir fue de corta duración y el nuevo crecimiento en un evento fue casi indistinguibles de los controles no tratados por 14 DAT (Tabla 21). Es importante tener en cuenta que el tabaco no transformado es sumamente sensible a fluroxipir. Estos resultados indicaron que un nivel de tolerancia a 2,4-D comercial puede ser proporcionado por AAD-12 (v1), incluso en un cultivo dicotiledóneo muy sensible a auxina como el tabaco. Estos resultados también muestran resistencia que se puede impartir resistencia a los herbicidas de ácido piridiloxiacético, triclopir y fluroxipir. Tener la capacidad de prescribir tratamientos en un cultivo tolerante a los herbicidas protegido por AAD-12 con varios ingredientes activos que tienen diversos espectros de control de malas hierbas es extremadamente útil para los cultivadores.
- 10
- 15 Tabla 21. Evaluación de la tolerancia cruzada de las respuestas de las plantas de tabaco T₁ AAD-12 (v1) a varios herbicidas de fenoxi y piridiloxi auxina

Herbicida	KY160-tipo salvaje	1580(1)-004 (alta tolerancia en la generación T ₀)	1580(1)-018 (alta tolerancia en la generación T ₀)
	% promedio de lesión de replicados 14 DAT		
140 g ae/ha 2,4-D DMA	45	0	0
560 g ae/ha 2,4-D DMA	60	0	0
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	73	0	0
70 s ae/ha triclopir	40	0	5
280 g ae/ha triclopir	65	0	5
1120 g ae/ha triclopir	80	0	8
35 g ae/ha fluroxipir	85	0	8
140 g ae/ha fluroxipir	93	0	10
560 g ae/ha fluroxipir	100	3	18

10.3 Heredabilidad AAD-12 (v1) en tabaco

- 20 También se realizó una prueba de progenie de 100 plantas en siete líneas T₁ de líneas AAD-12 (v1). Las semillas se estratificaron, sembraron, y se transplantaron con respecto al método anterior con la excepción de que las plantas nulas no se eliminaron por la selección de Liberty. Todas las plantas luego se pulverizaron con 560 g ae/ha 2,4-D DMA como se ha descrito previamente. Después de 14 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Cinco de las siete líneas analizadas se segregaron como un locus único, el rasgo mendeliano dominante (3R:1S) determinado por el análisis de Chi cuadrado. AAD-12 es heredable como un gen de resistencia robusto a la ariloxialcanoato auxina en múltiples especies.
- 25

10.4 Tolerancia del campo de plantas de tabaco pDAS 1580 a herbicidas 2,4-D, dicloprop, triclopir y fluroxipir

- 30 Se llevaron a cabo ensayos de tolerancia a nivel de campo en tres líneas AAD-12 (v1) (eventos pDAS158041]-018,001, pDAS158041]-004,001 y pDAS158041]-020,016) y una línea de tipo natural (KY160) en las estaciones de campo en Indiana y Mississippi. Los trasplantes de tabaco se cultivaron en el invernadero mediante la plantación de semillas T₁ en semilleros de trasplante de 72 pocillos (Hummert International) que contienen medio Metro 360 de acuerdo con las condiciones de cultivo indicadas anteriormente. Las plantas nulas se eliminaron selectivamente mediante la selección con Liberty como se describió anteriormente. Las plantas de trasplante se transportaron a las estaciones de campo y se plantaron a 14 o 24 pulgadas de distancia utilizando plantadores vegetales industriales. El riego por goteo en el sitio de Mississippi y el riego por aspersión en el sitio de Indiana se utilizaron para mantener las

plantas que crecen vigorosamente.

El diseño experimental fue un diseño de parcelas divididas con 4 repeticiones. La parcela principal fue el tratamiento herbicida y la subparcela fue la línea de tabaco. Los tratamientos herbicidas eran 2,4-D (sal dimetilamina) a 280, 560, 1120, 2240 y 4480 g ae/ha, triclopir a 840 g ae/ha, fluroxipir a 280 g ae/ha y un control no tratado. Las parcelas fueron una fila por 25 a 30 pies. Los tratamientos herbicidas se aplicaron 3-4 semanas después del trasplante usando rociador de mochila de aire comprimido que libera 187 L/ha de volumen portador a 130 a 200 kPa. Se tomaron la puntuación visual de la lesión, la inhibición del crecimiento, y la epinastia a 7, 14 y 21 días después del tratamiento.

La respuesta del evento AAD-12 (v1) al 2,4-D, triclopir y fluroxipir se muestra en la Tabla 22. La línea de tabaco no transformada fue gravemente dañada (63% a 14 DAT) por 2,4-D a 560 g ae/ha que se considera la tasa de aplicación de campo 1X. Las líneas de AAD-12 (v1) demostraron una excelente tolerancia al 2,4-D en 14 DAT con lesiones promedio de 1, 4, y lesiones 4% observadas en las tasas 2, 4 y 8X, respectivamente. La línea no transformada de tabaco fue gravemente dañada (53% a 14 DAT) por la tasa 2X de triclopir (840 g ae/ha); mientras que, las líneas AAD 12 (v1) demostraron tolerancia con un promedio de 5% a la lesión 14 DAT en las tres líneas. Fluroxipir a 280 g ae/ha causó lesiones graves (99%) a la línea no transformada a 14 DAT. Las líneas AAD-12 (v1) demostraron aumento de tolerancia con un promedio de lesiones 11% a 14 DAT.

Estos resultados indican que las líneas de eventos transformados AAD-12 (v1) muestran un alto nivel de tolerancia al 2,4-D, triclopir y fluroxipir en múltiplos de tasas de uso comercial que eran letales o causaron malformaciones epinásticas graves al tabaco no transformado en condiciones de campo representativas.

Tabla 22. Respuesta de las plantas de tabaco de AAD-12 (v1) al 2,4-D, triclopir, y fluroxipir en condiciones de campo.

Tratamiento herbicida		% promedio de lesión en los lugares a 14 DAT			
Ingrediente activo	Tasa	Tipo salvaje	pDAS1580-[1]-004.001	pDAS1580-[1]-004.016	pDAS1580-[1]-018.001
2,4-D	280 GM AE/HA	48	0	0	0
2,4-D	560 GM AE/HA	63	0	0	2
2,4-D	1120 GM AE/HA	78	1	1	2
2,4-D	2240 GM AE/HA	87	4	4	4
2,4-D	4480 GM AE/HA	92	4	4	4
Triclopir	840 GM AE/HA	53	5	5	4
Fluroxipir	280 GM AE/HA	99	11	11	12

10.5 Protección AAD-12 (v1) contra las tasas de 2,4-D elevadas

Los resultados que muestran la protección AAD-12 (v1) contra las tasas elevadas de 2,4-D DMA en el invernadero se muestran en la Tabla 23. Las plantas T₁ AAD-12 (v1) de un evento que segrega 3R: 1S cuando se selecciona con 560 g de ai/ha de Liberty usando el mismo protocolo que se describió anteriormente. La semilla T₁ AAD-1 (v3) también se plantó para los controles de tabaco transformadas (véase PCT/US2005/014737). KY160 no transformada sirvió de control sensible. Las plantas se pulverizaron usando un pulverizador de pista ajustado a 187 L/ha a 140, 560, 2240, 8960 y 35840 g ae/ha de 2,4-D DMA y se calificaron 3 y 14 DAT.

AAD-12 (v1) y AAD-1 (v3), protegieron efectivamente al tabaco contra las lesiones 2,4-D en dosis de hasta tasas de uso comercial 4X. AAD-12 (v1), sin embargo, demostró claramente una marcada ventaja sobre, 4AD-1 (v3) mediante la protección de hasta 64X las tasas de campo estándares

Tabla 23. Resultados que demuestran la protección provista por AAD-12 (v1) y AAD-1 (v3), contra las tasas elevadas de 2,4-D.

	KY160 control	AAD-1(v3)	AAD-12 (v1)
Tratamiento	% promedio de lesión 14 DAT		
2240 g ae/ha 2,4-D	95	4	• 0

8960 g ae/ha 2,4-D	99	9	0
35840 g ae/ha 2,4-D	100	32	4

10.6 Apilamiento de AAD-12 para aumentar el espectro herbicida

Las plantas homocigotas AAD-12 (v1) (PDA 1580) y AAD-1 (v3) (pDAB721) (ver PCT/US2005/014737 para el último) se cruzaron recíprocamente y se recolectó semilla F₁. Las semillas F₁ de dos cruzamientos recíprocos de cada gen se estratificaron y se trataron 4 repeticiones de cada cruzamiento bajo el mismo régimen de pulverización y se usaron para la otra prueba con uno de los siguientes tratamientos: 70, 140, 280 g ae/ha fluroxipyr (selectivo para el gen de AAD-12 (v1)); 280, 560, 1,120 g ae/ha R-dicloroprop (selectivo para el gen de AAD-1 (v3)); o 560, 1120, 2240 g ae/ha de 2,4-D DMA (para confirmar la tolerancia 2,4-D). Las plantas T₂ homocigóticas de cada gen también se plantaron para usar como controles. Las plantas se clasificaron a 3 y 14 DAT. Los resultados de pulverización se muestran en la Tabla 24.

Los resultados confirman que AAD-12 (v1) se pueden apilar con éxito con AAD-1 (v3), de este modo aumenta el espectro de herbicidas que se pueden aplicar para el cultivo de interés (ácidos fenoxiacéticos + ácidos fenoxipropiónico versus ácidos fenoxiacéticos + ácidos piridiloxiacéticos para AAD-1 y AAD-12, respectivamente). La naturaleza complementaria de los patrones de resistencia cruzada a herbicidas permite el uso conveniente de estos dos genes como marcadores seleccionables en campo complementarios y apilables. En cultivos donde la tolerancia con un único gen puede ser marginal, un experto en la técnica reconoce que se puede aumentar la tolerancia mediante el apilamiento de un segundo gen de tolerancia para el mismo herbicida. Esto se puede realizar utilizando el mismo gen con los mismos o diferentes promotores, sin embargo, como se observa en la presente, el apilamiento y seguimiento de dos rasgos complementarios puede ser facilitado por la protección cruzada distintiva a los ácidos fenoxipropiónicos [de AAD-1 (v3)] o ácidos piridiloxiacéticos [AAD-12 (v1)]

Tabla 24. Comparación de tolerancia cruzada a herbicidas auxínicos de las plantas T₂ AAD-12 (v1) (pDAS1580) y AAD-1 (v3) (pDAB721) en comparación con el cruzamiento AAD-12 x AAD-1 F₁ y tipo salvaje.

Tratamiento	KY160 control tipo salvaje	AAD-12 (v1) (pDAS1580)	AAD-1(v3) (pDAB721)	AAD-12 (v1) x AAD (v3) F1
	% promedio de de lesión 14 DAT			
560 g ae/ha 2,4-D	63	0	0	0
1120 g ae/ha 2,4-D	80		4	0
2240 g ae/ha 2,4-D	90	0	9	0
280g ae/ha R-dicloroprop	25	15	0	0
560 g ae/ha R-dicloroprop	60	50	0	0
1120 g ae/ha R-diclorpron	80	70	3	0
76g ae/ha fluroxipir	40	0	40	0
140 g ae/ha fluroxipir	65		60	0
280 g ae/ha fluroxipir	75	3	75	3

Ejemplo 11 – Transformación de soja

La mejora de la soja a través de técnicas de transferencia de genes se ha logrado para rasgos tales como tolerancia a herbicidas (Padgett et al., 1995), modificación de aminoácidos (Falco et al., 1995), y resistencia a insectos (Parrott et al., 1994). La introducción de los rasgos extraños en especies de cultivo requiere métodos que permitan la producción de rutina de las líneas transgénicas utilizando secuencias marcadoras seleccionables, que contienen insertos simples. Los transgenes se deben heredar como locus único funcional con el fin de simplificar el fitomejoramiento. Se ha informado la administración de genes extraños en soja cultivada por bombardeo de

microproyectiles en los ejes embrionarios cigóticos (McCabe et al., 1988) o cultivos embriogénicos somáticos (Finer y McMullen, 1991), y transformación mediada por *Agrobacterium* de explantes de cotiledones (Hinchee et al., 1988) o embriones cigóticos (1989 Chee et al.)

Los transformantes derivados de las transformaciones mediadas por *Agrobacterium* tienden a poseer inserciones simples con bajo número de copias (Birch, 1991). Hay ventajas y desventajas asociadas con cada uno de los tres tejidos blanco investigados para la transferencia génica en soja, eje embrionario cigóticos (Chee et al., 1989; McCabe et al., 1988), cotiledón (Hinchee et al., 1988) y cultivo embriogénico somático (Finer y McMullen, 1991). Estos últimos han sido investigados extensivamente como un tejido blanco para la transferencia génica directa. Los cultivos embriogénicos tienden a ser relativamente prolíficos y se pueden mantener durante un período prolongado. Sin embargo, la esterilidad y aberraciones cromosómicas de los transformantes primarios se han asociado con la edad de las suspensiones embriogénicas (Singh et al., 1998) y en consecuencia el inicio de nuevos cultivos parece ser necesario para los sistemas de transformación de soja que utilizan este tejido. Este sistema necesita un alto nivel de concentración de 2,4-D de 40 mg/L, para iniciar el callo embriogénico y esto plantea un problema fundamental en el uso del gen AAD-12 (v1) ya que el locus transformado no se puede desarrollar más con 2,4-D en el medio. Así, la transformación basada en meristema es ideal para el desarrollo de la planta resistentes a 2,4-D utilizando AAD-12(v1).

11.1 Clonación Gateway de constructos binarios

Las secuencia codificadora de AAD-12 (v1) se clonó en cinco vectores diferentes donantes Gateway que contienen diferentes promotores de plantas. Los casetes de expresión de plantas AAD-12 (v1) resultantes se clonaron a continuación en un vector binario de destino Gateway por medio de la reacción LR Clonase (Invitrogen Corporation, Carlsbad Ca, Cat # 11791-019).

Un fragmento de NcoI — SacI que contiene la secuencia codificadora de AAD-12 (v1) se digirió de DASPICO12 y se ligó en los correspondientes sitios de restricción NcoI — SacI dentro de los vectores donantes Gateway: pDAB3912 (attL1 //promotor CsVMV //AtuORF23 3'UTR //attL2); pDAB3916 (attL1 //promotor AtUbi10 //AtuORF23 3'UTR //attL2); pDAB4458 (attL1 //promotor AtUbi3 //AtuORF23 3'UTR //attL2); pDAB4459 (attL1 1/promotor ZmUbi1 //AtuORF23 3'UTR //attL2); y pDAB4460 (attL1 //promotor AtAct2 //AtuORF23 3'UTR //attL2). Los constructos resultantes que contienen los siguientes casetes de expresión de planta se denominaron: pDAB4463 (attL1 //promotor CsVMV //AAD-12 (v1) //AtuORF23 3'UTR //attL2); pDAB4467 (attL1 //promotor AtUbi10 //AAD-12 (v1) //AtuORF23 3'UTR //attL2); pDAB4471 (attL1 //promotor AtUbi3 //AAD-12 (v1) //AtuORF23 3'UTR //attL2); pDAB4475 (attL1 //promotor ZmUbi1 //AAD-12 (v1) //AtuORF23 3'UTR //attL2); y pDAB4479 (attL1 //promotor AtAct2 //AAD-12 (v1) //AtuORF23 3'UTR attL2). Estos constructos se confirmaron por medio de digestión de enzimas de restricción y secuenciación.

Los casetes de expresión de plantas se recombinaron en el vector binario de destino Gateway pDAB4484 (RB7 MARv3 //attR1- ccdB- resistencia a cloranfenicol- attR2 //promotor CsVMV //PATv6 AtuORF1 3'UTR) a través de la reacción de LR Clonase Gateway. La tecnología Gateway utiliza la recombinación específica de sitio basada en fagos lambda en lugar de la endonucleasa de restricción y ligasa para insertar un gen de interés en un vector de expresión. Invitrogen Corporation, Gateway Technology: A Universal Technology to Clone DNA Sequences for Functional Analysis and Expression in multiple Systems, Technical Manual, Catalog #'s 12535-019 and 12535-027, Gateway Technology Version E, 9/22/2003, #25-022. Las secuencias de recombinación de ADN (attL y attR,) y la mezcla de enzimas LR Clonase permiten que cualquier fragmento de ADN flanqueado por un sitio de recombinación sea transferido a cualquier vector que contiene un sitio correspondiente. El sitio de attL1 del vector donante se corresponde con attR1 del vector binario. Asimismo, el sitio attL2 del vector donante se corresponde con attR2 del vector binario. Utilizando la tecnología de Gateway el casete de expresión de la planta (del vector donante) que está flanqueado por los sitios attL se puede recombinar en los sitios attR del vector binario. Los constructos resultantes que contienen los casetes de expresión de plantas siguientes se rotularon como; pDAB4464 (RB7 MARv3 //promotor CsVMV //AAD-12 (v1) //AtuORF23 3'UTR //promotor CsVMV //PATv6 //AtuORF1 3'UTR); pDAB4468 (RB7 MARv3 //promotor AtUbi10 //AAD-12 (v1) //AtuORF23 3'UTR //promotor CsVMV //PATv6 //AtuORF1 3'UTR); pDAB4472 (RB7 MARv3 //promotor AtUbi3 //AAD-12 (v1) //AtuORF23 3'UTR //promotor CsVMV//PATv6 //AtuORF1 3'UTR); pDAB4476 (RB7 MARv3 //promotor ZmUbi1 //AAD-12 (v1) //AtuORF23 3'UTR //promotor CsVMV //PATv6 //AtuORF1 3'UTR); y pDAB4480 (RB7 MARv3 //promotor AtAct2 //AAD-12 (v1) //AtuORF23 3'UTR //promotor CsVMV //PATv6 //AtuORF1 3'UTR) (ver Tabla 8). Estos constructos se confirmaron por medio de digestión de enzimas de restricción y secuenciación.

11.2 Procedimiento 1 de transformación: transformación del nodo cotiledonario de soja mediado po *Agrobacterium tumefaciens*.

Los primeros informes de transformación de la soja dirigidos a las células meristemáticas de la región nodo cotiledonario (Hinchee et al., 1988) y la multiplicación de los brotes de los meristemas apicales (McCabe et al., 1988: En el método de nodos y la composición del medio de cultivo estimulan la proliferación de los meristemas auxiliares en el nodo (Hinchee et al., 1988). No está claro aún si un cultivo de callo verdaderamente desdiferenciado, pero totipotente es iniciado por estos tratamientos. La recuperación de múltiples clones de un evento de transformación de un explante único y la recuperación infrecuente de plantas quiméricas (Clemente et al, 2000; Olhoft et al, 2003)

indica un único origen celular, seguido por la multiplicación de la célula transgénica para producir un cultivo de meristema transgénico proliferante o un brote transformado de manera uniforme que experimenta la multiplicación adicional de brotes. El método de multiplicación de brotes de soja, originalmente basado en el bombardeo con microproyectiles (McCabe et al., 1988) y, más recientemente, adaptado para la transformación mediada por Agrobacterium (Martinell et al., 2002), aparentemente no experimenta el mismo nivel o tipo de desdiferenciación que el método de nodo cotiledonario porque el sistema se basa en la identificación exitosa de quimeras de línea germinal. La variedad de genotipos que se han transformado mediante el método de nodos cotiledonario basados en Agrobacterium está creciendo constantemente (Olhoft y Somers, 2001). Esta multiplicación de meristemas y brotes de novo está menos limitada a los genotipos específicos. Además, este es un protocolo no basado en 2,4-D que sería ideal para el sistema de selección de 2,4-D. Así, el método de nodos cotiledonario puede ser el método de elección para desarrollar cultivares de soja resistentes a 2,4-D. Aunque este método fue descrito ya en 1988 (Hinchee et al, 1988, solo muy recientemente se ha optimizado para la transformación de alta frecuencia de rutina de varios genotipos de soja (Zhang et al., 1999; Zeng et al., 2004).

11.2.1 — Producción de transformación de plantas de fenotipos tolerantes a AAD-12 (v1). Los explantes derivados de semillas de "Maverick" y el protocolo de transformación de nodo cotiledonarios mediada por Agrobacterium se utilizó para producir plantas transgénicas AAD-12 (v1).

11.2.2— Preparación e inoculación de Agrobacterium La Cepa de Agrobacterium EHA101 (Hood et al. 1986), que porta cada uno de los cinco vectores binarios pDAB (Tabla 8) se utilizó para iniciar la transformación. Cada vector binario contiene el gen AAD-12 (v1) y un casete del gen seleccionable de la planta (PAT) dentro de la región T-ADN. Cada gen está dirigido por los promotores listados en la Tabla 8 y estos plásmidos se movilizaron en la cepa EHA101 de Agrobacterium mediante electroporación. Las colonias seleccionadas se analizaron después para la integración de los genes antes del tratamiento con Agrobacterium de los explantes de soja. Se usaron semillas Maverick en todos los experimentos de transformación y las semillas se obtuvieron de la Universidad de Missouri, Columbia, MO.

La transformación mediada por Agrobacterium de soja (*Glycine max*) utilizando el gen PAT como marcador seleccionable acoplado con el herbicida glufosinato como un agente selectivo se llevó a cabo seguido de un método modificado de Zeng et al. (2004). Las semillas germinaron en medio basal B5 (Gamborg et al 1968.) solidificado con 3 g/L de Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.); se añadió 1-cisteína al medio de co-cultivo a 400 mg/L y el co-cultivo duró 5 días (Olhoft y Somers 2001); la iniciación del brote, elongación del brote y el medio de enraizamiento se complementaron con 50 mg/l de cefotaxima, 50 mg/L de timentina, 50 mg/l de vancomicina, y solidificaron con 3 g/L Phytigel. Los brotes seleccionados luego se transfirieron a al medio de enraizamiento. El esquema de selección óptima fue el uso de glufosinato a 8 mg/L a través de las primera y segunda etapas de iniciación de brotes en el medio y 3-4 mg/L durante la elongación del brote en el medio.

Antes de transferir los brotes alargados (3-5 cm) al medio de enraizamiento, el extremo escindido de los entrenudos se sumergió en ácido indol 3-butírico 1 mg/l durante 1-3 min para promover el enraizamiento (Khan et al. 1994). Los brotes dieron raíces en un tubo de cultivo de vidrio de 25x100 mm que contenían medio de enraizamiento y luego se transfirieron a la mezcla de tierra para la aclimatación de las plántulas en Metro-mix 200 (Hummert International, Earth City, Mo) en cajas Magenta abiertas en Conviron. El glufosinato, el ingrediente activo del herbicida Liberty (Bayer Crop Science), se utilizó para la selección durante la iniciación y elongación de los brotes. Las plántulas enraizadas se aclimataron en cajas Magenta abiertas durante varias semanas antes de ser analizadas y se transferidas al invernadero para su posterior aclimatación y establecimiento.

11.2.3 – Ensayos de plántulas transformadas putativamente, y análisis de plantas T₀ establecidas en el invernadero.

Las hojuelas terminales de las hojas seleccionadas de estas plántulas eran hojas pintadas con 50 mg/L de glufosinato dos veces con un intervalo de semanas para observar los resultados para la prueba de transformantes putativos. Las plántulas analizadas se transfirieron a continuación al invernadero y después de la aclimatación de las hojas se pintaron con glufosinato de nuevo para confirmar el estado de la tolerancia de estas plántulas en GH y considerarlas transformantes putativas.

Las plantas que se transfieren al invernadero se pueden analizar para determinar la presencia de un gen PAT activo adicional de una manera no destructiva mediante la pintura de una sección de la hoja del transformante primario T₀, o progenie del mismo, con una solución glufosinato [0,05-2% v/v de herbicida Liberty, preferiblemente 0,25-1,0% (v/v), = 500-2000 ppm de glufosinato, Bayer Crop Science]. De acuerdo con la concentración utilizada, la evaluación de lesiones glufosinato se puede hacer 1-7 días después del tratamiento. Las plantas también se pueden analizar para determinar la tolerancia 2,4-D de una manera no destructiva mediante la aplicación selectiva de una solución de 2,4-D en agua (formulación de sal dimetilamina 2,4-D comercial 0,25-1% v/v, preferiblemente 0,5% v/v = 2.280 ppm de 2,4-D ae) a la hojuela terminal de la trifoliada recién expandida, uno o dos, preferentemente dos, nodos por debajo de la trifoliada emergente más joven. Este ensayo permite la evaluación de las plantas sensibles 2,4-D 6 horas a varios días después de la aplicación mediante la evaluación del volteo o rotación de la hoja > 90 grados del plano de las hojuelas adyacentes. Las plantas tolerantes al 2,4-D no responderán al 2,4-D. Las plantas T₀ se dejarán autofertilizar en el invernadero para originar a una semilla T₁. Las plantas T₁ (y en la medida suficiente las plantas T₀ se producen clones) se pulverizarán con un intervalo de dosis de herbicidas para determinar el nivel de protección

herbicida proporcionado por los genes de AAD-12 (v1) y PAT en la soja transgénica. Las tasas de 2,4-D utilizan en las plantas T₀ comprenderán típicamente una o dos tasas selectivas en el intervalo de 100 a 1120 g ae/ha usando un pulverizador de pista como se ha descrito previamente. Las plantas T₁ se tratarán con una dosis de herbicida más amplio que van desde 50 hasta 3.200 g ae/ha de 2,4-D. Asimismo, las plantas T₀ y T₁ se pueden analizar para determinar la resistencia al glufosinato por el tratamiento de pos-emergencia con 200 a 800 y 50 a 3200 g ae/ha de glufosinato, respectivamente. La resistencia al glifosato (en plantas transformadas con constructos que contienen EPSPS) u otro gen de tolerancia a glifosato se puede evaluar en la generación T₁ por aplicaciones pos-emergencia de glifosato con un rango de dosis de 280 a 2240 g ae/ha de glifosato. El análisis de la expresión de la proteína se producirá como se describe a continuación. Las plantas T₀ individuales se evaluarán para la presencia de la región codificadora del gen de interés (AAD-12 (v1) o v6 PAT) y número de copia. La determinación de la herencia de AAD-12 (v1) se realizará mediante la segregación de la progenie T₁ y T₂ con respecto a la tolerancia al herbicida como se describe en los ejemplos anteriores.

Un subconjunto de los transformantes iniciales se evaluaron en la generación T₀ de acuerdo con los métodos anteriores. Cualquier planta confirmada como portadora de la región codificadora AAD-12 (v1), independientemente del promotor que dirige el gen no respondió a la pintura de la hoja de 2,4-D, mientras que la soja de tipo salvaje Maverick lo hizo (Tabla Sec 11.2.3). Las plantas transformadas solo con PAT respondieron lo mismo a las plantas de tipo salvaje a las aplicaciones de pintura de la hoja de 2,4-D.

2,4-D se aplicó a un subconjunto de las plantas que eran de tamaño similar a las plantas de control de tipo salvaje, ya sea con 560 o 1120 g ae de 2,4-D. Todas las plantas que contienen AAD-12 (v1) eran claramente resistentes a la aplicación de herbicidas versus las sojas Maverick de tipo salvaje. Se observó un ligero nivel de la lesión (2 DAT) para dos plantas AAD-12 (v1), sin embargo, la lesión era temporal y no se observó lesión 7 DAT. Las plantas control de tipo salvaje estaban gravemente dañadas 7-14 DAT a 560 g ae/ha de 2,4-D y mataron a 1.120 g ae/ha. Estos datos son compatibles con el hecho de que AAD-12 (VI) puede impartir alta tolerancia (> 2X tasas de campo) a un cultivo sensible como la soja. Las plantas analizadas luego se muestrearon para los análisis moleculares y bioquímicos para la confirmación de la integración de los genes de AAD12 (v1), el número de copias, y sus niveles de expresión de genes tal como se describe a continuación y se informa en la Tabla 25.

Tabla 25. Respuesta de la soja a pintura de hoja 2,4-D y aplicación de pulverización con 2,4-Dn.

Construido	Gen	Promotor	Evento	Ensayo volteo de hoja NODO 2,4-D @ (18 HAT)			Pulverización POST Sobre la parte superior con 2,4-D (g ae/ha)	Etapas en apli (# nodos)	ELISA (ng/ml)	Número de copias Southern	Región codifi- cadora PCR	% de lesión 2 DAT	% de lesión 7 DAT	% de lesión 14 DAT
				HOJA PINTADA	Nodo N-1	N-2								
4464	AAD-12	CsVMV	D-1-14	N-1	0		0	>10	5246,83	2	+	X	X	0
4464	MD-12	CsVMV	D-2-9	N-2		0	0	>10	20427	1	+	X	X	0
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-7	N-2		0	0	>10	4,65	1	+	0	0	0
4468	AAD-12	AtUbi10	D-4-11B	N-2		0	0	8	1452,84	2	+	0	0	0
4468	MD-12	AtUbi10	D-4-16	N-2		0	0	>10	65321	2	+	X	X	0
4480	AAD-12	AtAd2	D-9-1	N-2		0	0	>10	248,33	3 or 4	+	X	X	0
4464	AAD-12	CsVMV	D-2-14	N-2		0	560	7	4917,43	2	+	0	0	0
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-5	N-2		0	560		365,75	1	+	0	0	0
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-6	N-1	0		560	5	714,79	3	+	0	0	0
4472	AAD-12	AtUbi3	D-5-2	N-1	0		560	6	0,58	1	+	5	0	0
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-9	N-2		0	1120	6	2657,26	3	+	0	0	0
4468	AAD-12	AtUbi10	D-4-17	N-2		0	1120	7	286,14	5	4-	5	0	0
4499	PAT	CsVMV	D-2-3	N-2		1	0	>10	2,36	5	+	X	X	0
Maverick	WT		WT-10	NT		1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Maverick	WT		WT-2	NT		1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Maverick	WT		WT 3	NT			0	4	ND	ND	ND	0	0	0
Maverick	WT		WT-4	NT			0	4	ND	ND	ND	0	0	0
Maverick	WT		WT-5	NT			560	4	ND	ND	ND	50	60	60
Maverick	WT		WT-6	NT			560	4	ND	ND	ND	70	90	80
Maverick	WT		WT-7	NT			560	4	ND	ND	ND	70	80	80
Maverick	WT		WT-10	NT			1120	4	ND	ND	ND	70	90	100
Maverick	WT	I	WT-8	NT			1120	4	ND	ND	ND	70	95	100
Maverick	WT		WT-9	NT			1120	4	ND	ND	ND	70	95	100
								ND=No determinando						

11.2.4— Análisis molecular de soja

11.2.4.1—Aislamiento y cuantificación del ADN recolectado de tejido. El tejido fresco se coloca en tubos y se liofiliza a 4 °C durante 2 días. Después de que el tejido está totalmente seco, se coloca una perla de tungsteno (Valenite) en el tubo y las muestras se someten a 1 minuto de molienda en seco utilizando un molino de perlas Kelco. Luego se sigue el método de aislamiento de ADN DNeasy estándar (Qiagen, DNeasy 69109). Una alícuota del ADN extraído luego se tiñe con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se lee en el fluorómetro (BioTek) con patrones conocidos para obtener la concentración en ng / μ L.

11.2.4.2- Reacción en cadena polimerasa. Un total de 100 ng de ADN total se utiliza como el molde. 20 mM de cada cebador se utiliza con el kit Takara Ex Taq PCR polimerasa (Mirus TAKRROO1A). Los cebadores para la PTU de AAD-12 (v-1) son (Directo- ATAATGCCAGC CTGTTAAACGCC) (SEQ ID NO: 8) e (inverso- CTAAGCATATGAATGACCT CGA) (SEQ ID NO: 9). La reacción de PCR se lleva a cabo en el termociclador Geneamp 9700 (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94 °C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 63 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 1 minuto y 45 segundos, seguido por 72 °C durante 10 minutos. Los cebadores para la región de codificación de PCR AAD-12 (v1) son (Directo- ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO: 10) e (inverso- CGGGC AGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO: 11). La reacción de PCR se lleva a cabo en el termociclador Geneamp 9700 (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94 °C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 65 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 1 minuto y 45 segundos, seguido por 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1% teñido con EtBr.

11.2.4.3- Análisis de transferencia Southern. El análisis de transferencia Southern se realiza con ADN total obtenido a partir de kit Qiagen DNeasy. Un total de 10 μ g de ADN genómico se somete a una digestión durante la noche para obtener datos de integración. Después de la digestión durante la noche una alícuota de ~100 ng se corre en un gel de 1% para asegurar la digestión completa. Después de este aseguramiento las muestras se corren en un gel de agarosa 0,85% grande durante la noche a 40 voltios. El gel luego se desnaturaliza en NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. El gel se neutraliza a continuación en Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M pH de 7,5 durante 30 minutos. Un aparato de gel que contiene 20x SSC luego se ajusta para obtener un gel gravedad para transferencia de membrana de nylon (Millipore INYC00010) durante la noche. Después de la transferencia durante la noche, la membrana se somete después a la luz UV a través de un agente de reticulación (Stratagene UV Stratalinker 1800) en 1200 microjoule X100. La membrana se lava a continuación en SDS 0,1%, 0,1 SSC durante 45 minutos. Después del lavado de 45 minutos, la membrana se cuece al horno durante 3 horas a 80 °C y luego se almacena a 4 °C hasta la hibridación. El fragmento del molde de hibridación se prepara utilizando la PCR de la región codificadora anterior utilizando el ADN de plásmido. El producto se corre en un gel de agarosa 1% y se escinde y luego se extrae en gel usando el método de extracción en gel Qiagen (28706). La membrana luego se somete a una pre-hibridación en la etapa de 60 °C durante 1 hora en buffer Perfect Hyb (Sigma H7033). El método rxn marcado con Prime it RMT dCTP (Stratagene 300.392) se utiliza para desarrollar la sonda basada en p32 (Perkin Elmer). La sonda se limpia utilizando las columnas Probe Quant. G50 (Amersham 27-5335-01). Dos millones de cuentas CPM se utilizan para hibridar las transferencias Southern durante la noche. Después de la hibridación durante la noche las transferencias luego se someten a dos lavados de 20 minutos a 65 °C en SDS 0,1%, SSC 0,1. Las transferencias luego se exponen a la película durante la noche, incubando a-80 °C.

11.2.5 — Análisis bioquímico: Soja

11.2.5.1 — Muestreo del tejido y extracción de la proteína AAD-12 (v1) de las hojas de soja.

Aproximadamente 50 a 100 mg de tejido de la hoja se muestreó de las hojas N-2 que eran hojas pintadas con 2,4-D, pero después de 1 DAT. La hojuela terminal N-2 se retiró y cortó en trozos pequeños o discos de hojas perforadas con 2 orificios simples (~0,5 cm de diámetro) y se congelaron en hielo seco al instante. Además el análisis de proteínas (análisis ELISA y Western) se completó de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 9.

11.2.6 — Evaluación de progenie T₁. Las plantas T₀ se dejarán autofertilizar para derivar familias T₁. Las pruebas de progenie (análisis de la segregación) se realizarán usando glufosinato a 560 g de ai/ha como el agente de selección aplicado en la etapa de crecimiento V1-V2. Las plantas sobrevivientes también se ensayaron adicionalmente para la tolerancia 2,4-D en una o más etapas de crecimiento de V2-V6. Las semillas se producirán a través de autofertilización para permitir pruebas de herbicida más amplias sobre la soja transgénica.

Las plantas de soja Maverick transgénicas AAD-12 (v1) se han generado a través del sistema de transformación de nodo cotiledonario mediado por Agrobacterium. Las plantas T₀ obtenidas toleraron hasta niveles 2X de aplicaciones de campo de 2,4-D y desarrollaron semillas fértiles. La frecuencia de las plantas de soja transgénicas fértiles fue hasta 5,9%. La integración del gen AAD1-12 (v1) en el genoma de la soja se confirmó por análisis de transferencia Southern. Este análisis indicó que la mayoría de las plantas transgénicas contenían un bajo número de copias. Las plantas analizadas con los anticuerpos AAD-12 (v1) mostraron anticuerpos positivos para ELISA y la banda apropiada en el análisis Western.

11.3 Procedimiento de transformación 2: Transformación mediada por rayo de aerosol tejido de callo embriogénico somático.

El cultivo de tejido de callo embriogénico somático y posterior radiación se puede lograr como se describe en la patente U.S. N.º 6.809.232 (Held et al) para crear transformantes usando uno o más constructos en la Tabla 8.

5 11.4 Procedimiento de transformación 3. Bombardeo biolístico de soja

Esto se puede lograr usando los meristemas del eje embrionario derivado de la semilla madura (McCabe et al. (1988)). Siguiendo los métodos establecidos de bombardeo biolístico, se puede esperar la recuperación de las plantas de soja transformadas. Una vez que las plantas se regeneran se puede producir la evaluación de eventos tal como se describe en el Ejemplo 11.2.

10 11.5 Procedimiento de transformación 4. transformación mediada por Whiskers.

La preparación de whiskers y transformación de whiskers se pueden prever de acuerdo con los métodos descritos previamente por Terakawa et al. (2005)). Siguiendo los métodos establecidos de bombardeo biolístico; se puede esperar la recuperación de las plantas de soja transformadas. Una vez que las plantas se regeneran se puede producir la evaluación de eventos tal como se describe en el Ejemplo 11.2.

15 Las semillas Maverick se esterilizaron en superficie en etanol 70% durante 1 min seguido por inmersión en hipoclorito de sodio 1% durante 20 min. y luego se enjuagan tres veces en agua destilada estéril. Las semillas se remojaron en agua destilada durante 18-20 horas. Los ejes embrionarios se escindieron de las semillas, y los meristemas apicales se expusieron mediante la eliminación de las hojas primarias. Los ejes embrionarios se colocaron en el medio de bombardeo [BM: medio de sales basales MS (Murashige y Skoog 1962), 3% de sacarosa y
20 0,8% de fitagel Sigma, pH 5,7] con la región apical dirigida hacia arriba en placas de cultivo de 5 cm que contienen 12 ml medio de cultivo.

11.6 Procedimiento de transformación 5. La transformación mediada por el bombardeo de partículas para el tejido de callo embriogénico se puede optimizar de acuerdo con métodos anteriores (Khalafalla et al, 2005; El-Shemy et al, 2004, 2006). Las plantas regeneradas también se pueden evaluar de acuerdo con el Ejemplo 11.2.

25 Ejemplo 12— AAD-12 (v1) en algodón

12.1 — Protocolo de transformación del algodón.

Las semillas de algodón (genotipo Co310) se esterilizan en superficie en etanol 95% durante 1 minuto, se lavan, se esterilizado con lavandina comercial 50% durante veinte minutos, y luego se enjuaga 3 veces con agua destilada estéril antes de germinar en medio G (Tabla 26) en recipientes Magenta GA-7 y se mantiene bajo alta intensidad de
30 luz de 40-60 µE/m2 con el fotoperiodo fijado en 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 28 °C.

Los segmentos de cotiledón (~ 5 mm) cuadrado se aíslan de plántulas de 7-10 días en medios líquidos M líquido (Tabla 26) en placas de Petri (Nunc, artículo # 0875728). Los segmentos cortados se tratan con una solución de Agrobacterium (durante 30 minutos) y luego se transfieren al medio M semisólido (Tabla 26) y se someten a co-cultivo durante 2-3 días. Después del co-cultivo, los segmentos se transfieren al medio MG (Tabla 26). La
35 carbenicilina es el antibiótico utilizado para destruir el Agrobacterium y glufosinato de amonio es el agente de selección que puede permitir el crecimiento de solo las células que contienen el gen transferido.

Preparación de Agrobacterium. Se inoculan 35 ml del medio Y (Tabla 26) (que contiene estreptomicina (patrón 100 mg/ml) y eritromicina (patrón de 100 mg/ml)), con un ansa de bacterias para crecer durante la noche en la oscuridad a 28 °C, con agitación a 150 rpm. Al día siguiente, se vierte la solución de Agrobacterium en un tubo Oakridge estéril
40 (Nalge-Nunc, 3139-0050), y se centrifuga durante en Beckman J2-21 a 8.000 rpm durante 5 minutos. Se vierten el sobrenadante y resuspende el precipitado en 25 ml de líquido M (Tabla 26) y se agitan en vórtex. Se coloca una alícuota en un tubo de cultivo de vidrio (Fisher, 14-961-27) para lectura Klett (Klett-Summerson, modelo 800-3). Se diluye la nueva suspensión utilizando un medio líquido M a una lectura del medidor Klett de 108 unidades formadoras de colonias por ml con un volumen total de 40 ml.

45 Después de tres semanas, el callo de los segmentos de cotiledón se aísla y se transfiere al medio MG fresco. El callo se transfiere durante 3 semanas adicionales en el medio MG. En comparación por pares, el medio MG se puede suplementar con diclorprop (añadido al medio a una concentración de 0,01 y 0,05 mg/L) para complementar a la degradación del 2,4-D, ya que diclorprop no es un sustrato para que la enzima AAD-12, sin embargo diclorprop es más activo en el algodón de 2, 4-D. En una comparación separada, los segmentos que se sembraron en el medio
50 MG que no contienen regulador de crecimiento en comparación con el medio MG estándar, mostraron una menor formación de callos, pero aún hay crecimiento de callos. El callo se transfiere luego al medio CG (Tabla 26), y se transfiere de nuevo al medio de selección fresco después de tres semanas. Después de otras tres semanas el tejido de callo se transfiere a los medios D (Tabla 26) que carecen de reguladores de crecimiento para la inducción de callo embriogénico. Después de 4-8 semanas en este medio, se forma un callo embriogénico, y se puede distinguir
55 de los callos no embriogénicos por su color blanco amarillento y las células granulares. Los embriones empiezan a

regenerar poco después y son de color verde distinto. El algodón puede tardar en regenerarse y formar embriones, una de las formas de acelerar este proceso es someter a estrés al tejido. La desecación es una forma común de lograr esto, por medio de los cambios en el microambiente del tejido y la placa, mediante el uso de menos medios de cultivo y/o la adopción de diversos modos de cierre de placa (cinta adhesiva frente Parafilm).

- 5 Los embriones más grandes y bien desarrollados se aíslan y transfieren al medio DK (Tabla 26) para el desarrollo del embrión. Después de 3 semanas (o cuando los embriones se han desarrollado), los embriones germinados se transfieren a medio fresco para el desarrollo de brotes y raíces. Después de 4-8 semanas, las plantas bien desarrolladas se transfieren a tierra y se cultivan hasta la madurez. Después de un par de meses, la planta ha crecido hasta un punto que se puede pulverizar para determinar si hay alguna resistencia al 2,4-D.

10

Tabla 26. Medios para transformación de algodón								
Ingredientes en 1 litro	G	M líquido	M	MG	CG	D	DK	Y
Sales LS (5X)	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml			
Glucosa		30 gramos	30 gramos	30 gramos	30 gramos	20 gramos		
vit B5 modificada (1000x)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml,	10 ml	1 ml	
kinetina (1 mM)		1 ml	1 ml	1 ml	4,6 ml		0,5 ml	
2,4-D (1 mM)		1 ml	1 ml	1 ml				
Agar	8 gramos		8 gramos	8 gramos	8 gramos	8 gramos	8 gramos	
Sales DKW (D190)						1 paquete	1 paquete	
Mio-inositol (100x)						1 ml	10 ml	
Sacarosa 3%	30 gramos						30 gramos	10 gramos
NAA		i						
Carbenicilina (250 mg/ml)				2 ml	0,4 ml			
GLA (10rag/m1)				0,5 ml	0,3 ml			
Peptona								10 gramos
Extracto de levaduras								10 gramos
NaCl								5 gramos

12.2 — Transformación celular.

- 15 Se iniciaron varios experimentos en los que los segmentos de cotiledones se trataron con Agrobacterium que contiene pDAB724. Más de 2000 de los segmentos resultantes se trataron con varias opciones de auxina para la proliferación de callo de algodón pDAB724, ya sea: 0,1 o 0,5 mg/L R-diclorprop, concentración de 2,4-D estándar y tratamiento sin auxina. El callo se seleccionó en glufosinato de amonio, debido a la inclusión del gen PAT en el constructo. El análisis de la línea de callo en forma de PCR e Invader se utilizará para determinar si hay y para asegurarse de que el gen estaba presente en la fase de callo; luego las líneas de callos que son embriogénico se enviarán para el análisis Western, esencialmente como se describe en la sección 11.2.3. El callo embriogénico de algodón se sometió a estrés usando las técnicas de desecación para mejorar la calidad y la cantidad del tejido recuperado.

20 Casi 200 eventos de callos se han analizado para determinar la PTU y expresión intacta usando análisis Western para el gen AAD-12 (v1). A continuación se muestra un subconjunto de los datos para algunos de los callos de algodón que se han analizado.

25

Constructo	Número de línea	AAD-12 PTU	AAD-12 Invader	AAD-12 ng/ml
pDAB724	1	+	+	79,89
pDAB724	2	+	+	17,34
pDAB724	3	+	+	544,80
pDAB724	4	+	+	32,63
pDAB724	5	+		82,77
pDAB724	83	+	+	795,50
pDAB724	84	+	+	613,35
pDAB724	85	+	+	1077,75
pDAB724	86	+	+	437,74
pDAB724	87	+	+	286,51
pDAB724	88	+	+	517,59
pDAB724	89	+	+	1250,70

12.3 — Regeneración de plantas.

Las líneas de algodón AAD-12 (v1) que han producido plantas de acuerdo con el protocolo anterior se enviarán al invernadero. Para demostrar el gen AAD-12 (v1) proporciona resistencia a la 2,4-D en el algodón, las plantas de algodón AAD-12 (v1) y plantas de algodón de tipo salvaje se pulverizarán con un pulverizador de pista que administra 560 g ae/ha de 2,4-D en un volumen de pulverización de 187 l/ha. Las plantas se evaluarán a los 3 y 14 días después del tratamiento. Las plantas que sobreviven una tasa selectiva de 2,4-D se autopolinizarán para crear semillas T1 o cruzar con una línea de algodón de élite para producir semilla F₁. La semilla producida posterior se plantará y se evaluará para la resistencia a herbicidas como se describió anteriormente. Los eventos AAD-12 (v1) se pueden combinar con otros rasgos HT o IR deseados como se describió en los experimentos 18, 19, 22, y 23.

Ejemplo 13 —Transformación por Agrobacterium de otros cultivos

A la luz de la presente descripción, los cultivos adicionales se pueden transformar de acuerdo con la presente invención utilizando técnicas que son conocidas en la materia. Para la transformación mediada por Agrobacterium de centeno, ver, por ejemplo, Popelka y Altpeter (2003). Para la transformación mediada por Agrobacterium de soja, ver, por ejemplo, Hinchee et al., 1988. Para la transformación mediada por Agrobacterium de sorgo, ver, por ejemplo, Zhao et al., 2000. Para la transformación mediada por Agrobacterium de cebada, ver, por ejemplo, Tingay et al., 1997. Para la transformación mediada por Agrobacterium de trigo, ver, por ejemplo, Cheng et al., 1997. Para la transformación mediada por Agrobacterium de arroz, ver, por ejemplo, Hiei et al., 1997.

A continuación se indican los nombres latinos de estas y otras plantas. Debe quedar claro que estos y otras técnicas de transformación (no Agrobacterium) se pueden utilizar para transformar AAD-12 (v1), por ejemplo, en estas y otras plantas, que incluyen, pero sin limitación, maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum* spp.), arroz (*Oryza* spp. y *Zizania* spp.), cebada (*Hordeum* spp.), algodón (*Abroma augusta* y *Gossypium* spp.), soja (*Glycine max*), azúcar y remolacha de mesa (*Beta* spp.), caña de azúcar (*Arenga pinnata*), tomate (*Lycopersicon esculentum* y otra spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* y otra spp., y *Cyphomandra betacea*), papa (*Solanum tuberosum*), batata (*Ipomoea batatas*), centeno (*Secale* spp.), pimientos (*Capsicum annuum*, *sinense* y *frutescens*), lechuga (*Lactuca sativa*, *perennis*, y *pulchella*), repollo (*Brassica* spp), apio (*Apium graveolens*), berenjena (*Solanum melongena*), maní (*Arachis hypogeas*), sorgo (todo el sorgo especies), alfalfa (*Medicago sativa*), zanahoria (*Daucus carota*), porotos (*Phaseolus* spp. y otros géneros), avena (*Avena sativa* y *strigosa*), arvejas (*Pisum*, *Vigna*, y *tetragonolobus* spp.), girasol (*Helianthus annuus*), calabaza (*Cucurbita* spp.), pepino (*Cucumis sativa*), tabaco (*Nicotiana* spp.), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Césped (*Lolium*, *Agrostis*, *Poa*, *Cynodon*, y otros géneros), trébol (*Tifolium*), arveja (*Vicia*). Tales plantas, con genes AAD-12 (v1), por ejemplo, se incluyen en la presente invención.

AAD-12 (v1) tiene el potencial de aumentar la aplicabilidad de los herbicidas auxínicos clave para uso estacional en muchos sistemas de cultivo de hojas caducas y madera de hoja perenne. Las especies de madera resistentes a triclopir, 2,4D, y/o fluroxipir pueden aumentar la flexibilidad del uso excesivo de estos herbicidas sin problemas de lesiones. Estas especies pueden incluir, pero sin limitación: aliso (*Alnus* spp), fresno (*Fraxinus* spp.), álamo temblón y especies de álamos (*Populus* spp.), hayas (*Fagus* spp.), abedul (*Betula* spp.), cereza (*Prunus* spp.), eucalipto

(*Eucalyptus* spp.), nogal (*Carya* spp.), arce (*Acer* spp.), roble (*Quercus* spp), y pino (*Pinus* spp). El uso de la resistencia auxina para el control selectivo de malas hierbas en especies ornamentales y frutales está también dentro del alcance de esta invención. Los ejemplos pueden incluir, pero sin limitación, rosa (*Rosa* spp), zarza ardiente (*Euonymus* spp.), petunia (*Petunia* spp), begonia (*Begonia* spp.), rododendro (*Rhododendron* spp), manzano silvestre o manzana (*Malus* spp), pera (*Pyrus* spp.), melocotón (*Prunus* spp), y tagetes (*Tagetes* spp.).

Ejemplo 14 — Evidencia adicional de resultados sorprendentes: AAD-12 vs. AAD-2

14.1— Clonación inicial AAD-2 (v1).

Otro gen se identificó a partir de la base de datos NCBI (ver el sitio web ncbi.nlm.nih.gov; acceso# AP005940) como un homólogo con solo 44% de identidad de aminoácidos con *tfda*. Este gen se denomina en la presente como AAD-2 (v1) por coherencia. El porcentaje de identidad se determinó primero mediante la traducción de las secuencias de ADN de AAD-2 y *tfda* (SEQ ID NO: 12 de PCT/US2005/014737 y Acceso GENBANK N.º M16730, respectivamente) a las proteínas (SEQ ID NO: 13 del documento PCT/US2005/014737 y No. de Acceso a Genbank M16730, respectivamente), y luego se usa ClustalW en el paquete de software VectorNTI para realizar el alineamiento de las secuencias múltiples.

La cepa de *Bradyrhizobium japonicum* que contiene el gen AAD-2 (v1) se obtuvo del Northern Regional Research Laboratory (NRRL, cepa # B4450). La cepa liofilizada se revivió de acuerdo con el protocolo NRRL y se almacenó a -80 °C en glicerol 20% para el uso interno como cepa bacteriana Dow DB 663. De este patrón del congelador, una placa de agar de soja tríptico luego se estrió con un asa de siembra de células para el aislamiento, y se incubaron a 28 °C durante 3 días. Una sola colonia se utilizó para inocular 100 ml de caldo de soja tríptico en un matraz de 500 ml con tres deflectores, que se incubó durante la noche a 28 °C en un agitador de piso a 150 rpm. A partir de este, el ADN total se aisló con el protocolo gram negativo de kit DNeasy Qiagen (Qiagen cat. # 69504). Los siguientes cebadores se diseñaron para amplificar el gen blanco de ADN genómico, Directo: 5' ACT AGT AAC AAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA CGA T 3'[(brjap 5'(speI) SEQ ID NO: 14 de PCT/US2005/014737 (sitio de restricción Spe I añadido y sitio de unión al ribosoma (RBS))] e inverso: 5' TTC TCG AGC TAT CAC TCC GCC GCC TGC TGC TGC 3'[(br jap 3' (xhoI) SEQ ID NO: 15 de PCT/US2005/014737 (se añade un sitio Xho I)]..

Las reacciones de cincuenta microlitros se montaron de la siguiente manera: Buffer Fail Safe 25 µl, ea. El cebador 1 µl (50 ng/µl), gDNA 1 µl (200 ng/µl), H₂O 21 µl, Taq polimerasa 1 µl (2,5 unidades /µl). Tres Buffers Fail Safe, A, B, y C se usaron en tres reacciones separadas. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 95 °C ciclo 30 minutos de desnaturalización de calor; 95 °C 1,0 minutos, 50 °C 1,0 minutos, 72 °C 1 5 minutos, durante 30 ciclos; seguido de un ciclo final de 72 °C 5 minutos, utilizando el sistema de PCR FailSafe (Epicenter cat. #FS99100). El producto de PCR resultante ~ 1 kb se clonó en pCR 2.1 (Invitrogen cat. # 1 (4550-40) siguiendo el protocolo incluido, con TOP10F⁺ E. coli químicamente competentes como la cepa huésped, para la verificación de la secuencia de nucleótidos.

Diez de las colonias de color blanco resultantes se recogieron en 3 µl de caldo Luria + 1.000 µg/ml de ampicilina (LB Amp), y se cultivaron durante la noche a 37 °C con agitación. Los plásmidos se purificaron de cada cultivo usando el kit Nucleospin Plus Plasmid Miniprep (BD Biosciences cat. # K3063-2) y se sigue el protocolo incluido. Se completó la digestión de restricción del ADN aislado se completó para confirmar la presencia del producto de PCR en el vector pCR2.1. El ADN del plásmido se digirió con la enzima de restricción EcoRI (New England Biolabs Cat. # R0101S). La secuenciación se llevó a cabo con el kit Beckman CEQ Quick Start utilizando cebadores M13 directo [5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'] (SEQ ID NO: 6) (Beckman Coulter cat # 608120.) e inverso [5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'] (SEQ ID NO: 7), según las instrucciones del fabricante. A esta secuencia del gen y su proteína correspondiente se les dio una nueva denominación general AAD-2 (v1) por coherencia interna.

14.2 – Finalización del vector binario de AAD-2 (v1).

El gen de AAD-2 (v1) se amplificó por PCR pDAB3202. Durante se la reacción de PCR, se realizaron alteraciones dentro de los cebadores para introducir los sitios de restricción AflIII y SacI en el cebador 3' y cebador 5, respectivamente. Ver PCT/US2005/014737. Los cebadores "Ncol de Brady"- [5'-TAT-ACC ACA-TGT CGA TCG CCA TCC GGC AGC TT 3'] (SEQ ID NO: 14) y "SacI de Brady" [5' GAG CTC CTA TCA CTC CGC CGC CTG CTG CAC 3'] (SEQ ID NO: 15) se utilizaron para amplificar un fragmento de ADN utilizando el sistema de PCR Fail Safe (Epicentre). El producto de PCR se clonó en el vector de clonación pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen) y se verificó la secuencia con los cebadores M13 directo y M13 inversos utilizando los reactivos de secuenciación de Beckman Coulter "Dye Terminator Cycle Sequencing Kit Quick Start". Los datos de secuencia identificaron un clon con la secuencia correcta (pDAB716). El fragmento del gen AflIII/SacI AAD-2 (v4) luego se clonó en el vector Ncol/SacI pDAB726. El constructo resultante (pDAB717); promotor AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: AAD-2 (v1): Nt OSM3'UTR: ORF1 poli 3'UTR se verificó con digestos de restricción (con Ncol/SacI). Este constructo se clonó en los pDAB3038 binarios como un fragmento de ADN de NotI-NotI. El constructo resultante (pDAB767); promotor AtUbi10: Nt OSM5'UTR: AAD-2 (V1): Nt OSM 3'UTR: ORF1 poli 3'UTR: promotor CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR se digirió por restricción (con Nod, EcoRI, HindIII, Ncol, PvuII, y Sall) para la verificación de la orientación correcta. El constructo completo (pDAB767), luego se usó para la transformación en *Agrobacterium*.

14.3 — Evaluación de *Arabidopsis* transformada.

la semilla T₁ recién cosechada transformada con un gen de AAD-12 (v1) o AAD-2 nativo optimizados en planta se plantaron y seleccionaron por la resistencia al glufosinato como se describió anteriormente. A las plantas se les asignaron aleatoriamente diferentes tasas de 2,4-D (50-3200 g ae/ha). Las aplicaciones de herbicidas se aplicaron por medio del pulverizador de pista en un volumen de pulverización de 187 l/ha. El 2,4-D usado fue la formulación de sal dimetilamina comercial (456 g ea/L, Nufarm, St Joseph, MO) se mezcló en buffer Tris 200 mM (pH 9,0) o buffer HEPES 200 mM (pH 7,5).

AAD-12 (v1) y AAD-2 (v1) proporcionaron resistencia detectable a 2,4-D en comparación con las líneas de control transformadas y no transformadas; sin embargo, los constructos individuales fueron muy variables en su capacidad para impartir resistencia a 2,4-D a las plantas de *Arabidopsis* T₁ individuales. Sorprendentemente, los transformantes AAD-12 (v1) y AAD-2 (v2) fueron mucho menos resistente a la 2,4-D que el gen de AAD-12 (v1), a partir de una frecuencia de plantas altamente tolerantes, así como lesiones promedio generales. Ninguna planta transformada con AAD-2 (v1) sobrevivió a 200, g ae/ha de 2,4-D relativamente sin lesiones (<20% lesión visual), y la lesión de la población total fue de aproximadamente 83% (ver el documento PCT/US2005/014737). Por el contrario, AAD-12 (v1) tenía un promedio de lesión de población de aproximadamente 6% cuando se trataron con 3200 g ae/ha de 2,4-D (Tabla 11). La tolerancia mejoró ligeramente para AAD-2 (v2) optimizado en planta versus el gen nativo, sin embargo, la comparación de ambos genes AAD-12 y AAD-2 optimizados en planta indica una ventaja significativa para AAD-12 (v1) en la planta.

[003691 Estos resultados son inesperados ya que la comparación in vitro de AAD-2 (v1) (ver PCT/US2005/014737) y AAD-12 (v2) indica que ambos eran altamente eficaces en la degradación de 2,4-D y ambos comparten una especificidad tipo S con respecto a los sustratos ariloxiacetatos quirales. AAD-2 (v1) se expresa en plantas T₁ individuales a variados; sin embargo, poca protección contra las lesiones 2,4-D es proporcionada por esta proteína expresada. No hay diferencia sustancial evidente en el nivel de expresión de la proteína (en planta) para los genes de AAD-2 nativos y optimizados en planta (ver PCT/US2005/014737). Estos datos corroboran los primeros hallazgos que realizan la expresión funcional de AAD-12 (v1) en planta, y producen una resistencia inesperada a herbicidas de 2,4-D y piridiloxiacetatos.

Ejemplo 15 — Aplicaciones para quema antes de la plantación

Este y los siguientes ejemplos son ejemplos específicos de nuevos usos de herbicida posibilitados por.

Las aplicaciones de herbicidas de quema antes de plantación están destinadas a matar malas hierbas que han emergido en invierno o principios de primavera antes de plantar un cultivo determinado. Normalmente estas aplicaciones se aplican en sistemas de manejo sin labranza o labranza reducida donde la eliminación física de las malas hierbas no se completa antes de la plantación. Un programa de herbicida, por lo tanto, debe controlar un espectro muy amplio de malas hierbas de hoja ancha y gramíneas presentes en el momento de la plantación. El glifosato, gramoxona, y glufosinato son ejemplos de herbicidas no selectivos, no residuales ampliamente utilizados para aplicaciones de herbicidas de quemado de presembrado. Algunas malas hierbas, sin embargo, son difíciles de controlar en este momento de la temporada debido a uno o más de los siguientes: insensibilidad inherente de las especies de malas hierbas o biotipo al herbicida, tamaño relativamente grande de malas hierbas anuales de invierno, y las condiciones de clima frío que limitan la absorción y actividad del herbicida. Varias opciones de herbicidas están disponibles para la mezcla de tanque con estos herbicidas para aumentar el espectro y la actividad sobre las malas hierbas donde los herbicidas no selectivos son débiles. Un ejemplo puede ser aplicaciones de mezcla de tanque de 2,4-D con glifosato para ayudar en el control de *Conyza canadensis* (cola de caballo). El glifosato se puede usar de 420-1680 g ae/ha, más típicamente 560 a 840 g ae/ha, para el control de quemado antes de la plantación de la mayoría de las malas hierbas presentes; sin embargo, 280- 1120 g ae/ha de 2,4-D se puede aplicar para ayudar en el control de muchas especies de malas hierbas de hoja ancha (por ejemplo, cola de caballo). 2,4-D es un herbicida de elección porque es efectivo en un rango muy amplio de malas hierbas de hoja ancha, efectivo incluso a bajas temperaturas, y extremadamente económico. Sin embargo, si el cultivo posterior es un cultivo dicotiledóneo sensible, los residuos de 2,4-D en el suelo (aunque de corta duración) pueden afectar negativamente el cultivo. La soja es un cultivo sensible y requiere de un período de tiempo mínimo de 7 días (para la tasa de 280 g ae/ha de 2,4-D) a al menos 30 días (para aplicaciones de 2,4-D de 1120 g ae/ha) para producirse entre las aplicaciones de quema y plantación. 2,4-D está prohibido como un tratamiento para la quema antes de la siembra de algodón (ver etiquetas federales, la mayoría están disponibles a través de CPR, 2005 o en línea en cdms.net/manuf/manufasp). Con el algodón o soja transformados por AAD-12 (v1), estos cultivos deben ser capaces de sobrevivir a los residuos de 2,4-D en el suelo a las aplicaciones de quema aplicados hasta e incluso después de la plantación, antes de la emergencia del cultivo. El aumento de la flexibilidad y la reducción del coste de los compañeros de la mezcla de tanque (o premezcla comercial) mejorarán las opciones de control de malas hierbas y aumentarán la robustez de las aplicaciones de quema en situaciones sin labranza o labranza reducida importantes. Este ejemplo es una de las muchas opciones que estarán disponibles. Los expertos en la técnica de control de malas hierbas observarán una variedad de otras aplicaciones, que incluyen, pero sin limitación, como ejemplos gramoxona + 2,4-D o glufosinato + 2,4-D mediante la utilización de los productos descritos en las etiquetas de los herbicidas federales (CPR, 2005) y usos descritos en la Agrilience Crop Protection Guide (2005). Los expertos en la técnica reconocerán también que el ejemplo anterior se puede aplicar a cualquier cultivo sensible a 2,4-D (u otro

herbicida de fenoxi auxina) que puede ser protegido por el gen AAD-12 (v1) si se transforma de manera estable. Del mismo modo, los atributos únicos de AAD-12 que permiten la degradación de triclopir y fluroxipir aumentan la utilidad al permitir la sustitución o mezclas de tanque de 70-1120 o 35-560 g ae/ha de triclopir y fluroxipir, respectivamente, para aumentar el espectro y/o aumentar la capacidad para controlar las especies de malas hierbas perennes o viney (sic).

Ejemplo 16 — Uso en el cultivo de herbicidas de fenoxi auxinas en soja, algodón u otros cultivos dicotiledóneos solo con AAD-12 (v1)

AAD-12 (v1) puede permitir el uso de herbicidas de fenoxi auxinas (por ejemplo, 2,4-D y MCPA) y piridiloxi auxinas (triclopir y fluroxipir) para el control de un amplio espectro de malas hierbas de hoja ancha directamente en cultivos normalmente sensibles a la 2,4-D. La aplicación de 2,4-D a 280 hasta 2240 g ae/ha puede controlar la mayoría de las especies de malas hierbas de hoja ancha presentes en ambientes agronómicos. Más típicamente, se utiliza 560-1120 g ae/ha. Para triclopir, las tasas de aplicación normalmente pueden variar de 70-1120 g de ae/ha, más típicamente de 140 a 420 ae/ha. Para fluroxipir, las tasas de aplicación pueden variar normalmente de 35-560 g ae/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 corta duración proporcionado por tasas más altas de 2,4-D, triclopir y fluroxipir cuando se utiliza en tasas más altas, mientras que un herbicida no residual como glifosato no puede proporcionar control de las malas hierbas que germinan más tarde. Esta herramienta también proporciona un mecanismo para combinar los modos de acción de herbicidas con la comodidad de HTC como una estrategia integrada de manejo de la resistencia a herbicidas y el cambio de malas hierbas.

Otra ventaja que proporciona esta herramienta es la capacidad para mezclar en tanque los herbicidas de control de malas hierbas de hoja ancha de amplio espectro (por ejemplo, 2,4-D, triclopir y fluroxipir) con herbicidas del control de malas hierbas residuales comúnmente usados. Estos herbicidas normalmente se aplican antes de o en la plantación, pero a menudo son menos efectivos sobre las malas hierbas establecidas, emergidas que pueden existir en el campo antes de la plantación. Mediante la extensión de la utilidad de estos herbicidas de ariloxi auxina para incluir aplicaciones en la planta, preemergencia o antes de la plantación, aumenta la flexibilidad de los programas de control de malas hierbas residuales. Un experto en la técnica puede reconocer que el programa herbicida residual diferirá sobre la base del cultivo de interés, pero los programas típicos pueden incluir herbicidas de las familias de cloroacetamida y dinitroanilina, pero que también incluye herbicidas tales como clomazona, sulfentrazona, y una variedad de herbicidas inhibidores de ALS, inhibidores de PPO e inhibidores de HPPD.

Otros beneficios pueden incluir tolerancia a 2,4-D, triclopir o fluroxipir que se requiera antes de la siembra después de la aplicación de herbicidas de ácido ariloxiacético auxina (ver el ejemplo anterior); y menos problemas de lesiones por contaminación para los cultivos dicotiledóneos resultantes de los tanques a granel con limpieza incompleta que contenían 2,4-D, triclopir o fluroxipir. Dicamba (y muchos otros herbicidas) aún se pueden utilizar para el posterior control de cultivos voluntarios dicotiledóneos transformados con AAD-12 (v1).

Los expertos en la técnica también reconocerán que el ejemplo anterior se puede aplicar a cualquier cultivo sensible de 2,4-D (u otro herbicida de ariloxi auxinas) que puede ser protegido por el gen de AAD-12 (v1) si se transforma en forma estable. Un experto en la técnica de control de malas hierbas reconocerá que el uso de diversos herbicidas de fenoxi o piridiloxi auxina comerciales solos o en combinación con un herbicida está permitidos por la transformación de AAD-12 (v1). Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de esta química de síntesis se pueden determinar por las etiquetas de los herbicidas compilados en el libro de CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar o cualquiera de las referencias comerciales o académicas de protección de cultivos tales como Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo habilitado para usar en HTC por AAD-12 (v1), utilizado solo, mezclado en tanque, o secuencialmente se considera dentro del ámbito de esta invención.

Ejemplo 17 – Uso en cultivo de herbicidas de fenoxi auxina y piridiloxi auxina en maíz, arroz u otras especies monocotiledóneas solo transformadas con AAD-12 (v1)

En forma análoga, la transformación de las especies de gramíneas (tales como, pero sin limitación, maíz, arroz, trigo, cebada o césped y pastos) con AAD-12 (v1) puede permitir el uso de fenoxi y piridiloxi auxinas altamente eficaces en los cultivos donde normalmente la selectividad no es segura. La mayoría de las especies de gramíneas tienen una tolerancia natural a los herbicidas auxínicos, tales como las fenoxi auxinas (es decir, 2,4-D). Sin embargo, un nivel relativamente bajo de selectividad de los cultivos ha producido una utilidad disminuido en cultivos de síntesis debido a una ventana acortada del momento de la aplicación o el riesgo de lesión inaceptable. Los cultivos monocotiledóneos transformados con AAD-12 (v1), en consecuencia, pueden permitir el uso de una combinación similar de tratamientos descritos para los cultivos de dicotiledóneas: tales como la aplicación de 2,4-D en 280-2.240 g ae/ha para el control de la mayor parte de especies de malas hierbas de hoja ancha. Más típicamente, se usa 560-1120 g ae/ha. Para triclopir, las tasas de aplicación pueden variar de 70 a 1120 g ea, más típicamente de 140-420 g ae/ha. Para fluroxipir, las tasas de aplicación típicamente pueden variar de 35-560 g ae/ha, más típicamente 70-280 ae/ha.

Una ventaja de esta herramienta adicional es el coste extremadamente bajo del componente herbicida de las malas hierbas de hoja ancha y el potencial control de malas hierbas residuales de corta duración provisto por tasas más altas de 2,4-D, triclopir, o fluroxipir. En contraste, un herbicida no residual como glifosato puede proporcionar el control de malas hierbas que germinan más tarde. Esta herramienta también proporciona un mecanismo para rotar los modos de acción de herbicidas con la comodidad de HTC como una estrategia integrada de manejos de la resistencia a herbicidas y el cambio de malas hierbas en una estrategia de combinación HTC de cultivo tolerante a glifosato/AAD-12 (v1), sea que rote o no la especie de cultivo.

Otra ventaja que proporciona esta herramienta es la capacidad para mezclar en tanque los herbicidas de control de malas hierbas de hoja ancha de amplio espectro (por ejemplo, 2,4-D, triclopir y fluroxipir) con herbicidas del control de malas hierbas residuales comúnmente usados. Estos herbicidas normalmente se aplican antes de o en la plantación, pero a menudo son menos efectivos sobre las malas hierbas establecidas, emergidas que pueden existir en el campo antes de la plantación. Mediante la extensión de la utilidad de estos herbicidas de ariloxi auxina para incluir aplicaciones en la planta, preemergencia o antes de la plantación, aumenta la flexibilidad de los programas de control de malas hierbas residuales. Un experto en la técnica puede reconocer que el programa herbicida residual diferirá sobre la base del cultivo de interés, pero los programas típicos pueden incluir herbicidas de las familias de cloroacetamida y dinitroanilina, pero que también incluye herbicidas tales como clomazona, sulfentrazona, y una variedad de herbicidas inhibidores de ALS, inhibidores de PPO e inhibidores de HPPD.

El aumento de la tolerancia de maíz, arroz, y otras monocotiledóneas a las fenoxi o piridiloxi auxinas deberá permitir el uso de herbicidas en el cultivo sin restricciones en la etapa de crecimiento o el potencial de cultivo inclinado, fenómeno de despliegue tal como "cola de rata", cultivo inclinado, fragilidad del tallo inducida por el regulador del crecimiento en el maíz, o raíces secundarias deformadas. Cada herbicida alternativo habilitado para su uso en los HTC por AAD-12 (v1), utilizado solo, en mezcla de tanque, o secuencialmente, se considera dentro del ámbito de esta invención.

Ejemplo 18 — AAD-12 (v1) apilado con el rasgo de tolerancia a glifosato en cualquier cultivo

La gran mayoría de acres de algodón, cáñola, maíz, y soja plantados en América del Norte contienen un rasgo de tolerancia al glifosato (GT), y la adopción de maíz GT está en aumento. Los cultivos GT adicionales (por ejemplo, trigo, arroz, remolacha azucarera, y césped) han estado en desarrollo, pero no han sido lanzados comercialmente hasta la fecha. Muchas otras especies resistentes al glifosato están en fase experimental a de desarrollo (por ejemplo, alfalfa, caña de azúcar, girasol, remolacha, guisantes zanahoria, pepino lechuga, cebolla, frutilla, tomate y tabaco; especies forestales como el álamo y el liquidámbar, y especies hortícolas como caléndula, petunia, y begonias; isb.viedu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005 en la World Wide Web). GTC son herramientas valiosas para la enorme amplitud de malas hierbas controladas y la conveniencia y la rentabilidad proporcionadas por este sistema. Sin embargo, la utilidad del glifosato como tratamiento de base estándar actual es la selección de las malas hierbas resistentes al glifosato. Además, las malas hierbas sobre las que el glifosato es inherentemente menos eficaz se están desplazando a las especies predominantes en los campos donde se practican programas químicos solo con glifosato. Mediante el apilamiento de AAD-12 (v1) con un rasgo GT, ya sea a través de fitomejoramiento convencional o conjuntamente como un nuevo evento de transformación, se puede mejorar la eficacia de control de malas hierbas, la flexibilidad y la capacidad de manejar los cambios de malas hierbas y el desarrollo de resistencia a los herbicidas. Como se ha mencionado en los ejemplos anteriores, mediante la transformación de los cultivos con AAD-12 (v1), los cultivos de monocotiledóneas tendrán un mayor margen de seguridad para fenoxi o piridiloxi auxina, y la fenoxi auxina se puede aplicar de manera selectiva en los cultivos de dicotiledóneas. Varios escenarios para la mejora de las opciones de control de malas hierbas se pueden prever, donde se apilan AAD-12 (v1) y un rasgo GT en cualquier especie de cultivo monocotiledóneo o dicotiledóneo:

a) El glifosato se puede aplicar en una tasa de aplicación pos-emergencia estándar (420 a 2160 g ae/ha, preferiblemente 560 a 840 g ae/ha) para el control de la mayoría de las malas hierbas de gramíneas y 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 glifosato (por ejemplo, *Commelina* spp, *Ipomoea* spp, etc), 280 a 2240 g ae/ha (preferiblemente 560 a 1120 g ae/ha) 2, 4-1 se pueden aplicar secuencialmente, mezclar en tanque, o como una premezcla con glifosato para proporcionar un control efectivo. Para triclopir, las tasas de aplicación pueden variar típicamente de 70-1120 g ea/ha, más típicamente de 140 a 420 g ae/ha. Para fluroxipir, las tasas de aplicación pueden variar típicamente de 35-560 g ae/ha, más típicamente 70-280 ae/ha.

b) En la actualidad, las tasas de glifosato aplicadas en GTC generalmente varían de 560 a 2240 g ae/ha por momento de la aplicación. El glifosato es mucho más eficaz en especies de gramíneas que en las especies de malas hierbas de hoja ancha. Los rasgos apilados AAD-12 (v1) + GT pueden permitir tasas efectivas para gramíneas de glifosato (105 a 840 g ae/ha, más preferiblemente 210 a 420 g ae/ha). 2,4-D (a 280-2.240 g ae/ha, más preferiblemente 560-1.120 g ae/ha), luego se puede aplicar secuencialmente, mezcla en tanque o como una premezcla con tasas de efectivas para gramíneas de glifosato para proporcionar el control necesario de las malas hierbas de hoja ancha. Tricopyr y fluroxipir a las tasas mencionadas anteriormente pueden ser componentes aceptables en el régimen de tratamiento. La baja tasa de glifosato también se puede beneficiar del control de las malas hierbas de hoja ancha, sin embargo el control primario puede ser del 2,4-D, triclopir, o fluroxipir.

Los expertos en la técnica de control de malas hierbas también reconocerán que el uso de uno o más diversos herbicidas de ariloxi auxina comerciales solos o en combinación (en forma secuencial o independiente) está permitido por la transformación de AAD-12 (v1) en los cultivos. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de esta química se pueden determinar por las etiquetas de los herbicidas compilados en el libro de

5 CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, etiquetas compiladas en línea (por ejemplo, cdms.net/manuf/manufasp), o cualquiera de las guías comerciales o académicas de protección de cultivos tales como Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo habilitado para usar en HTC por AAD-12 (v1), utilizado solo, mezclado en tanque, o secuencialmente se considera dentro del ámbito de esta invención.

10 Ejemplo 19- AAD-12 (v1) apilado con el rasgo de tolerancia a glufosinato en cualquier cultivo

La tolerancia al glufosinato (PAT o bar) está actualmente presente en una numerosos cultivos plantados en América del Norte como un marcador seleccionable para un rasgo de entrada como proteínas de resistencia a insectos o específicamente como un rasgo HTC. Los cultivos incluyen, pero sin limitación cáñola, maíz y algodón tolerantes al glufosinato. Los cultivos tolerantes a glufosinato adicionales (por ejemplo, arroz, remolacha azucarera, soja y césped)

15 han estado en desarrollo, pero no han sido lanzados comercialmente hasta la fecha. El glufosinato, como el glifosato, es un herbicida para gramíneas y malas hierbas de hoja ancha relativamente no selectivo de amplio espectro. El modo de acción del glufosinato difiere del glifosato. Es de acción rápida, lo que produce desecación y "quema" de las hojas tratadas de 24-48 horas después de la aplicación del herbicida. Esto es ventajoso para el aspecto de control rápido de malas hierbas. Sin embargo, esto también limita la translocación de glufosinato a

20 regiones meristemáticas de las plantas deseadas lo que produce un peor control de malas hierbas como lo demuestran los índices relativos de rendimiento de control de malas hierbas de los dos compuestos en muchas especies (Agrilience, 2005).

Mediante el apilamiento de AAD-12 (v1) con un rasgo de tolerancia al glufosinato, ya sea a través de fitomejoramiento convencional o conjuntamente como un nuevo evento de transformación, se puede mejorar la

25 eficacia de control de malas hierbas, la flexibilidad y la capacidad de manejar los cambios de malas hierbas y el desarrollo de resistencia a los herbicidas. Varios escenarios para la mejora de las opciones de control de malas hierbas se pueden prever, donde se apilan AAD-12 (v1) y un rasgo de tolerancia al glufosinato cualquier especie de cultivo monocotiledóneo o dicotiledóneo:

a) El glufosinato se puede aplicar a una tasa de aplicación pos-emergencia estándar (200 a 1700 g ae/ha, preferiblemente 350 a 500 g ae/ha) para el control de muchas especies de gramíneas y malas hierbas de hoja ancha. Hasta la fecha, no se han confirmado malas hierbas resistentes al glufosinato; sin embargo, el glufosinato

30 tiene un mayor número de malas hierbas que son inherentemente más tolerantes que el glifosato.

i) Las especies de malas hierbas de hoja ancha inherentemente tolerantes (por ejemplo, *Cirsium arvensis* *Apocynum cannabinum*, y *Conyza canadensis*) se pueden controlar por mezcla en tanque de 280-2240 g ae/ha, más preferiblemente 560-2240 g ae/ha, 2,4D para el control efectivo de estas especies perennes más difíciles de controlar y para mejorar la robustez del control sobre las especies de malas hierbas de hoja ancha anuales. Triclopir y fluroxipir pueden ser componentes aceptables para considerar en el régimen de control de malas hierbas. Para triclopir, las tasas de aplicación pueden variar típicamente de 70-1120 g ae/ha, más típicamente 140-420 g ae/ha. For fluroxipir, las tasas de aplicación pueden variar

35 típicamente de 35-560-g-ae/ha, más típicamente 70-280 ae/ha.

40

b) Una combinación múltiple de glufosinato (200-500 g ae/ha) +/- 2.4 D (280-1120 g ae/ha) +/- triclopir o fluroxipir (a las tasas mencionados anteriormente), por ejemplo, podría proporcionar un espectro de control de malas hierbas superpuesto más robusto. Además, el espectro de la superposición proporciona un mecanismo adicional para el manejo o retraso de las malas hierbas resistentes a los herbicidas.

Los expertos en la técnica de control de malas hierbas también reconocerán que el uso de uno o más diversos herbicidas de ariloxiacético auxina comerciales solos o en combinación (en forma secuencial o independiente) está permitido por la transformación de AAD-12 (v1) en los cultivos. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de esta química se pueden determinar por las etiquetas de los herbicidas compilados en el libro de

45 CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, etiquetas compiladas en línea (por ejemplo, cdms.net/manuf/manufasp), o cualquiera de las guías comerciales o académicas de protección de cultivos tales como Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo habilitado para usar en HTC por AAD-12 (v1), utilizado solo, mezclado en tanque, o secuencialmente se considera dentro del ámbito de esta invención.

50

Ejemplo 20- AAD-12 (v1) apilado con el rasgo de AHAS en cualquier cultivo

La tolerancia a los herbicidas de imidazolinona (AHAS, et al.) está actualmente presente en numerosos cultivos plantados en América del Norte, que incluyen pero sin limitación, maíz, arroz y trigo. Los cultivos tolerantes a imidazolinonas adicionales (por ejemplo, algodón y remolacha azucarera) han estado en desarrollo, pero no han sido liberados comercialmente hasta la fecha. Muchos herbicidas de imidazolinonas (por ejemplo, imazamox, imazetapir,

imazaquin e imazapic) se utilizan actualmente en forma selectiva en diversos cultivos convencionales. El uso de imazetapir, imazamox, e imazapir no selectivo se ha permitido a través de rasgos de tolerancia a imidazolinonas como AHAS et al. Esta clase de química también tiene actividad residual en el suelo significativa, de este modo es capaz de proporcionar el control de malas hierbas extendido más allá del momento de la aplicación, a diferencia de los sistemas basados en el glifosato o glufosinato. Sin embargo, el espectro de malas hierbas controladas por los herbicidas de imidazolinonas no es tan amplio como el glifosato (Agrilience, 2005). Además, los herbicidas de imidazolinonas tienen un modo de acción (la inhibición de la acetolactato sintasa ALS) a la que muchas malas hierbas han desarrollado resistencia (Heap, 2005). Mediante el apilamiento de AAD-12 (v1) con un rasgo de tolerancia a imidazolinona, ya sea a través de fitomejoramiento convencional o conjuntamente como un nuevo evento de transformación, se puede mejorar la eficacia de control de malas hierbas, la flexibilidad y la capacidad de manejar los cambios de malas hierbas y el desarrollo de resistencia a los herbicidas. Como se ha mencionado en los ejemplos anteriores, mediante la transformación de los cultivos con AAD-12 (v1), los cultivos de monocotiledóneas tendrán un mayor margen de seguridad para fenoxi o piridiloxi auxina, y estas auxinas se pueden aplicar de manera selectiva en los cultivos de dicotiledóneas. Varios escenarios para la mejora de las opciones de control de malas hierbas se pueden prever, donde se apilan AAD-12 (v1) y un rasgo de tolerancia a imidazolinona en cualquier especie de cultivo monocotiledóneo o dicotiledóneo:

a) Imazetapir se puede aplicar a una tasa de aplicación pos-emergencia estándar de (35 a 280 g ae/ha, preferiblemente 70-140 g ae/ha) para el control de especies de gramíneas y malas hierbas de hoja ancha.

i) Las malas hierbas de hoja anchas resistentes al inhibidor de ALS como *Amaranthus rudis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album* (entre otras, Heap, 2005) se pueden controlar por mezcla en tanque 280-2240 g ae/ha, más preferiblemente 560-1120 g ae/ha, 2,4-D. Para triclopir, las tasas de aplicación pueden variar típicamente de 70-1120 g ae/ha, más típicamente 140-420 g ae/ha. Para fluroxipir, tasas de aplicación pueden variar típicamente de 35-560 g ae/ha, más típicamente 70-280 ae/ha.

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

b) Una combinación múltiple de imazetapir (35 a 80 g ae/ha, preferiblemente 70-140 ae/ha) +/- 2,4-D (280-1120 g ae/ha) +/- triclopir o fluroxipir (a las tasas mencionados anteriormente), por ejemplo, podría proporcionar un espectro de control de malas hierbas superpuesto más robusto. Además, el espectro de la superposición proporciona un mecanismo adicional para el manejo o retraso de las malas hierbas resistentes a los herbicidas.

Los expertos en la técnica de control de malas hierbas también reconocerán que el uso de varios herbicidas de imidazolinona, herbicidas de fenoxiacético o piridiloxiacético auxina comerciales solos o en combinaciones múltiples está permitido por la transformación de AAD-12 (v1) y apilamiento con cualquier rasgo de tolerancia a imidazolinona por reproducción convencional o ingeniería genética. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de esta química se pueden determinar por las etiquetas de los herbicidas compilados en el libro de CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, etiquetas compiladas en línea (por ejemplo, cdms.net/manuf/manufasp), o cualquiera de las guías comerciales o académicas de protección de cultivos tales como Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo habilitado para usar en HTC por AAD-12 (v1), utilizado solo, mezclado en tanque, o secuencialmente se considera dentro del ámbito de esta invención.

Ejemplo 21 — AAD-12 (v1) en arroz

21.1 — Descripción del medio.

Los medios de cultivo empleados se ajustaron a pH 5,8 con KOH 1 M y se solidificaron con 2,5 g/L de Phytigel (Sigma). Los callos embriogénicos se cultivaron en placas de Petri de 100 x 20 mm que contiene 40 ml de medio semi-sólido. Las plántulas de arroz se cultivaron en 50 ml de medio en cajas Magenta. Las suspensiones celulares se mantuvieron en matraces cónicos de 125 ml que contenían 35 ml de medio líquido y giraron a 125 rpm. La inducción y el mantenimiento de los cultivos embriogénicos tuvieron lugar en la oscuridad a 25-26 °C, y la regeneración de la planta y el cultivo de la planta entera se llevaron a cabo en un fotoperíodo de 16 horas (Zhang et al., 1996).

La inducción y el mantenimiento de los callos embriogénicos se llevaron a cabo en medio basal NB como se describió previamente (Li et al. 1993), pero adaptado para contener 500 mg/L glutamina. Los cultivos en suspensión se iniciaron y mantuvieron en medio líquido SZ (Zhang et al. 1998) con la inclusión de 30 g/L de sacarosa en lugar de maltosa. El medio osmótico (NBO) consistió en medio NB con la adición de 0,256 M de cada uno de manitol y sorbitol. El callo resistente a higromicina B se seleccionó en medio NB suplementado con 50 mg/l de higromicina B durante 3-4 semanas. La pre-regeneración se llevó a cabo en un medio (PRHSO) que consiste en medio NB sin ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), pero con la adición de 2 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP), 1- mg/L de ácido α -naftalenacético (NAA), 5 mg/L de ácido abscísico (ABA) y 50 mg/l de higromicina B durante 1 semana. La regeneración de las plántulas siguió por medio del cultivo en el medio de regeneración (RNHSO) que comprende medio NB sin 2,4-D, y suplementado con 3 mg/L de BAP, 0,5 mg/L de NAA y 50 mg/l de higromicina B hasta que se

regeneraron los brotes. Los brotes se transfirieron al medio de enraizamiento con sales basales Murashige y Skoog de concentración media y vitaminas B5 de Gamborg, suplementado con 1% de sacarosa y 50 mg/l de higromicina B (1/2MSHSO).

21.2 – Desarrollo del cultivo de tejido.

- 5 Semillas desecadas maduras de *Oryza sativa* L. japonica cv. Taipei 309 se esterilizaron como se describe en Zhang et al. 1996. Los tejidos embriogénicos fueron inducidos mediante el cultivo de semillas de arroz maduras estériles en medio NB en la oscuridad. El callo primario de aproximadamente 1 mm de diámetro, se extrajo del escutelo y se usó para iniciar la suspensión celular en medio líquido SZ. Las suspensiones luego se mantuvieron como se describe en Zhang 1995. Los tejidos embriogénicos derivados de la suspensión se retiraron del cultivo líquido 3-5 días después del subcultivo anterior y se colocaron en medio osmótico NBO para formar un círculo de aproximadamente 2,5 cm de diámetro en una placa de Petri y se cultivaron durante 4 h antes del bombardeo. Dieciséis a 20 h después del bombardeo, los tejidos se transfirieron del medio NBO al medio de selección de higromicina B NBHSO, lo que asegura que la superficie bombardeada se orientaba hacia arriba, y se incubaron en la oscuridad durante 14-17 días. El callo recién formado luego se separó de los explantes bombardeados originales y se colocó cerca en el mismo medio. Después de 8-12 días adicionales, un callo opaco relativamente compacto se identificó visualmente, y se transfirió al medio de pre-regeneración PRHSO durante 7 días en la oscuridad. El callo en crecimiento, que se convirtió en más compacto y opaco luego se subcultivó en medio de regeneración RNHSO durante un período de 14-21 días bajo un fotoperíodo de 16 h. Los brotes de regeneración se transfirieron a las cajas Magenta que contenían ½ medio MSHSO. Múltiples plantas regeneradas a partir de un explante único se consideran hermanos y se trataron como una línea de plantas independientes. Una planta se calificó como positiva para el gen hph si produjo raíces blancas gruesas y creció vigorosamente en ½ medio MSHSO. Una vez que las plántulas habían alcanzado la parte superior de las cajas Magenta, se transfirieron al suelo en una maceta de 6 cm bajo 100% de humedad durante una semana, luego se trasladaron a una cámara de crecimiento con un período de luz de 14 h a 30 °C y en la oscuridad a 21 °C durante 2-3 semanas antes de trasplantar a macetas de 13 cm en el invernadero. Las semillas se recogieron y se secaron a 37 °C durante una semana. antes de su almacenamiento.

21.3 — Bombardeo de proyectiles.

- Todos los bombardeos se llevaron a cabo con el sistema biolístico PDS-1000/He™ (Bio Rad, Laboratories, Inc.). Tres miligramos de partículas de oro de 1,0 micrón de diámetro se lavaron una vez con etanol 100%, dos veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en 50 µl de agua en un tubo Eppendorf siliconado. Cinco microgramos de ADN de plásmido que representa una relación molar 1:6 de pDOW3303 (vector que contiene HPT) para pDAB4101 (AAD-12 (v1) + AHAS), 20 µl de espermidina (0,1 M) y 50 µl de cloruro de calcio (2,5 M) se añadieron a la suspensión de oro. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, se sedimentaron a 10.000 rpm durante 10 s, se resuspendieron en 60 µl de etanol 100% frío y 8-9 µl se distribuyeron en cada macroportador. Las muestras de tejido se bombardearon a 1100 psi y 27 en vacío Hg como se describe en Zhang et al. (1996).

35 21.4 — Tolerancia al herbicida pos-emergencia en arroz T₀ transformado con AAD-12 (v1)

- Las plántulas de arroz en la etapa de 3-5 hojas se pulverizaron con una dosis letal de una solución 0,16% (v/v) de Pursuit (para confirmar la presencia del gen AHAS) que contiene 1% de Sunit II (v/v) y 1,25 UAN% (v/v) usando un pulverizador de pista calibrada a 187 L/ha. La calificación de sensibilidad o resistencia se realizó a los 36 días después del tratamiento (DAT). Diez de los 33 eventos enviados al invernadero eran robustamente tolerantes al Pursuit; otros sufrieron diversos grados de lesión por herbicida. Las plantas se muestrearon (de acuerdo con la siguiente sección 21.7) y la caracterización molecular se realizó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 8 que identificó siete de estos 10 eventos como los que contienen la PTU de AAD-12 (v1) y la región codificadora de AHAS entera.

21.5 — Heredabilidad de AAD-12 (v1) en arroz T₁

- 45 Una prueba de progenie 100 plantas se llevó a cabo en cinco líneas T₁ de líneas AAD-12 (v1) que contenían la PTU de AAD-12 (v1) y la región codificadora de AHAS. Las semillas se plantaron con respecto al método anterior y se pulverizaron con 140 g ae/ha imazetapir usando un pulverizador de pista como se ha descrito previamente. Después de 14 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Dos de los cinco líneas analizadas se segregaron como un locus único, rasgo mendeliano dominante (3R:1S) como se determina por análisis de Chi cuadrado. AAD-12 se cosegregó con el marcador seleccionable AHAS determinando por la prueba de tolerancia 2,4-D.

21.6 — Verificación de tolerancia alta a 2,4-D en arroz T₁.

- Las siguientes líneas del locus de segregación único T₁ AAD-12 (v1) se plantaron en macetas de 3 pulgadas que contienen medios Metro Mix: pDAB4101(20)003 y pDAB4101(27)002. En la etapa de hoja 2-3 se pulverizaron con 140 g ae/ha de imazetapir. Los nulos se eliminaron y los individuos se pulverizaron en la etapa V3-V4 en el pulverizador de pista ajustado a 187 L/ha a 1120, 2240 o 4480 g ae/ha 2,4-D DMA (las tasas de uso típicas comerciales 2X, 4X y 8X, respectivamente). Las plantas se calificaron a las 7 y 14 DAT y se compararon con un cultivar de arroz comercial no transformado, 'Lamont,' como plantas de control negativo.

Los datos de lesiones (Tabla 27) muestran que las líneas transformadas con AAD-12 (v1) son más tolerantes a las altas tasas de 2,4-D DMA que los controles no transformados. La línea pDAB4101(20)003 fue más tolerante a altos niveles de 2,4-D que la línea de pDAB4101(27)002. Los datos también demuestran que la tolerancia de 2,4-D es estable durante al menos dos generaciones.

Tabla 27. Respuesta de T1 AAD-12 (v1) y control no transformado a variados niveles de 2,4-D DMA.

Herbicida	Control no transformado Lemont	pDAB4101(20)003	pDAB4101(27)002
	% promedio de de lesión 14 DAT		
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	20	10	10
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	35	15	30.
4480 g ae/ha 2,4-D DMA	50	23	40

5

21.7 — Recolección de tejido, aislamiento y cuantificación de ADN.

El tejido fresco se colocó en tubos y se liofilizó a 4 °C durante 2 días. Después de que el tejido se secó totalmente, una perla de tungsteno (Valenite) se colocó en el tubo y las muestras se sometieron a 1 minuto de molienda en seco utilizando un molino de perlas Kelco. Luego se siguió el método de aislamiento de ADN DNeasy estándar Qiagen, Dneasy 69109). Una alícuota del ADN extraído se tiñó con Pico Verde (sondas moleculares P7589) y se barrió en el fluorómetro (BioTek) con patrones conocidos para obtener la concentración en ng/μl.

10

21.8 — Expresión de AAD-12 (v1).

Las condiciones de preparación y análisis de la muestra fueron como se describió anteriormente. Las 33 líneas transgénicas T₀ de arroz y 1 control no transgénico se analizaron para determinar la expresión de AAD-12 mediante transferencia ELISA. AAD-12 se detectó en los clones de 20 líneas, pero no en línea de plantas de control Taipai 309. Doce de las 20 líneas que tenían algunos de los clones tolerantes a imazetapir estaban expresando la proteína de AAD-12, eran PTU PCR AAD-12 positiva y región codificadora AHAS positiva. Los niveles de expresión variaron de 2,3-1.092,4 ppm de la proteína soluble total.

15

21.9— Tolerancia del campo de las plantas de arroz de pDAB4101 a los herbicidas de 2,4-D y triclopir.

Una prueba de tolerancia a nivel de campo se realizó con el evento pDAB4101[20] AAD-12 (v1) y uno de arroz tipo salvaje (Clearfield 131) Wayside, Mississippi (una variedad resistente a la imidazolinona no transgénica). El diseño experimental fue un diseño de bloque completo aleatorizado con una sola repetición. Los tratamientos con herbicidas fueron las tasas de 2X de 2,4-D (sal dimetilamina) a 2.240 g ae/ha y triclopir a 560 g ae/ha, más un control no tratado. Dentro de cada tratamiento con herbicidas, se plantaron dos hileras de generación T₁ pDAB4101 [20] y dos hileras de arroz Clearfield usando un surco en parcelas pequeño con espacio entre hileras de 8 pulgadas. El arroz pDAB4101 [20] contenía el gen AHAS como un marcador seleccionable para el gen AAD-12 (v1). Imazetapir se aplicó en la etapa de una hoja como agente de selección para eliminar todas las plantas nulas AAD-12 (v1) plantas nulos de las parcelas. Los tratamientos herbicidas se aplicaron cuando el arroz llegó a la etapa de hoja 2 utilizando el pulverizador de mochila aire de aire comprimido que administra 187 L/ha de volumen portador a 130 a 200 kPa de presión. Las calificaciones visuales de lesiones se tomaron a 7, 14 y 21 días después de la aplicación.

20

25

30

Las respuestas del evento AAD-12 (v1) al 2,4-D y triclopir se muestran en la Tabla 28. La línea no transformada de arroz (Clearfield) estaba gravemente dañada (30% en 7DAT y el 35% en 15DAT) por 2,4 D en 2240 g ae/ha que se considera la tasa de uso comercial 4X. El evento AAD-12 (v1) demostró una excelente tolerancia al 2,4-D sin daño observado a 7 o 15DAT. El arroz no transformado estaba significativamente dañado (15% en 7DAT y 25% en 15DAT) por la tasa 2X de triclopir (560 g ae/ha). El evento AAD-12 (v1) demostró tolerancia excelente a las tasas 2X de triclopir sin lesiones observadas en 7 o 15 DAT.

35

Estos resultados indican que el arroz transformado con AAD-12 (v1) muestra un alto nivel de resistencia a la 2,4-D y triclopir a tasas que causaron daño visual grave al arroz Clearfield. También demuestra la capacidad de apilar múltiples genes de tolerancia a herbicida con múltiples especies AAD-12 para proporcionar resistencia a un espectro más amplio de químicas eficaces

40

Tabla 28. Respuesta de las plantas de arroz generación T1 AAD-12 al 2,4-D y triclopir en condiciones de campo.

Tratamiento herbicida		% de lesión visual			
		7DAT		15DAT	
Ingrediente activo	Tasa	Evento AAD-12 pDAB4101[20]	Clearfield tipo salvaje	Evento AAD-12 pDAB4101[20]	Clearfield tipo salvaje
2,4-D	2240 GM AE/HA	0	15	0	35
Triclopir	840 GM AE/HA	0	30	0	25
No tratado		0	0	0	0

Ejemplo 22 —AAD-12 (v1) en Cánola

100410122.1 — Transformación de cánola.

- 5 El gen AAD-12 (v1) que confiere resistencia a 2,4-D se usó para transformar *Brassica napus* var. Nexera * 710 con la transformación mediada por *Agrobacterium* y el plásmido pDAB3759. El constructo contenía el gen AAD-12 (v1) dirigido por el promotor CsVMV y el gen Pat dirigido por el promotor AtUbi10 y el rasgo de resistencia a glifosato EPSPS dirigido por el promotor AtUbi10 (ver sección 2.4).
- 10 Las semillas se esterilizaron superficie con 10% de lavandina comercial durante 10 minutos y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron a continuación en la mitad de concentración de medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) y se mantuvieron bajo régimen de crecimiento fijado en 25 °C, y un fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas oscuridad.
- 15 Los segmentos de hipocótilo (3-5 mm) se escindieron de plántulas de 5-7 días de edad y se colocaron en medio de inducción de callo K1D1 (medio MS con 1 mg/l de quinetina y 1 mg/L de 2,4-D) durante 3 días como pre-tratamiento. Los segmentos se transfirieron a continuación a una placa de petri, se trataron con *Agrobacterium* Z707S o cepa LBA4404 que contiene pDAB3759. El *Agrobacterium* se cultivó durante la noche a 28 °C en la oscuridad en un agitador a 150 rpm y, posteriormente, se resuspendió en el medio de cultivo.
- 20 Después de 30 minutos de tratamiento de los segmentos de hipocotilo con *Agrobacterium*, estos se colocaron de nuevo en el medio de inducción de callo durante 3 días. Después del co-cultivo, los segmentos se colocaron en K1D1TC (medio de inducción de callo que contiene 250 mg/l de carbenicilina y 300 mg/L de Timentina) durante una semana o dos semanas de recuperación. Alternativamente, los segmentos se colocaron directamente en medio de selección K1D1H1 (medio anterior con 1 mg/L Herbiace). Carbenicilina y Timentina fueron los antibióticos utilizados para matar el *Agrobacterium*. El agente de selección Herbiace permitió el crecimiento de las células transformadas.
- 25 Los segmentos de hipocótilo formados en callo luego se colocaron en medio de regeneración de brotes B3Z1H1 (medio MS, 3 mg/L bencilamino purina, 1 mg/L de zeatina, 0,5 gm/L de MES [ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico], 5 mg/L de nitrato de plata, 1 mg/L Herbiace, carbenicilina y Timentina). Después de 2-3 semanas los brotes comenzaron a regenerarse. Los segmentos de hipocótilo, junto con los brotes se transfieren a medio B3Z1H3 (medio MS, 3 mg/L de bencilamino purina, 1 mg/L de zeatina, 0,5 gm/L de MES [ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico], 5 mg/L de nitrato de plata, 3 mg/L Herbiace, carbenicilina y Timentin) durante otras 2-3 semanas.
- 30 Los brotes se escindieron de los segmentos de hipocótilo y se transfirieron al medio de elongación de brotes MESH5 o MES 10 (MS, 0,5 g/l de MES, 5 o 10 mg/L de Herbiace, carbenicilina, Timentin) durante 2-4 semanas. Los brotes alargados se cultivan para la inducción de raíz en MSI.1 (MS con 0,1 mg/L de ácido indolbutírico). Una vez que las plantas tenían un sistema radicular bien establecido, se trasplantaron en el suelo. Las plantas se aclimataron en condiciones ambientales controladas en el Conviron durante 1-2 semanas antes de la transferencia al invernadero.
- 35 22.2 Análisis molecular: materiales y métodos de cánola
- 40 22.2.1 — Aislamiento y cuantificación del ADN recolectado del tejido. El tejido fresco se colocó en tubos y se liofilizó a 4 °C durante 2 días. Después de que el tejido se secó totalmente, se colocó una perla de tungsteno (Valenite) en el tubo y las muestras se sometieron a 1 minuto de molienda en seco utilizando un molino de perlas Kelco. Luego se siguió el método de aislamiento de ADN DNeasy estándar (Qiagen, DNeasy 69109). Una alícuota del ADN extraído luego se tiñó con Pico verde (Molecular Probes P7589) y se leyó en el fluorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng /µl.

22.2.2 – Reacción en cadena de polimerasa. Un total de 100 ng de ADN total se utilizó como el molde. 20 mM de cada cebador se utilizó con el kit de Takara Ex Taq Polimerasa PCR (Mirus TAKRR001A). Los cebadores para PCR de la región codificadora AAD-12 (v1) fueron (SEQ ID NO:10) (directo) y (SEQ ID NO:11) (inverso). La reacción de PCR se lleva a cabo en el termociclador Geneamp 9700 (Applied Biosystems), al someter las muestras a 94 °C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, y 72°C durante 2 minutos seguido por 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1% teñido con EtBr. 35 muestras de 35 plantas con los eventos AAD-12 (v1) dieron positivo. Tres muestras de control negativas dieron negativas.

22.2.3 — ELISA.

Mediante el uso del ELISA establecido descrito en la sección previa, se detectó proteína de AAD-12 en 5 eventos de planta de transformación de cáñola diferentes. Los niveles de expresión variaron de 14 a más de 700 ppm de la proteína soluble total (TSP). Tres muestras de plantas no transformadas diferentes se probaron en paralelo sin señal detectada, lo que indica que los anticuerpos utilizados en el ensayo tienen reactividad cruzada mínima a la matriz celular de cáñola. También se confirmó que estas muestras fueron positivas por análisis Western. Un resumen de los resultados se presenta en la Tabla 29.

Tabla 29. Expresión de AAD-12 (v1) en las plantas de cáñola

Muestra #	[TSP] (µg/ml)	[AAD-12] (ng/ml)	Expresión (ppm TSP) (ELISA)	Western
31	5614,96	1692,12	301,36	++++
33	4988,26	2121,52	425,30	++++
38	5372,25	3879,09	722,06	++++
39	2812,77	41,36	14,71	+
40	3691,48	468,74	126,98	+++
Control 1	2736,24	0,00	0,00	-
Control 2	2176,06	0,00	0,00	-
Control 3	3403,26	0,00	0,00	-

22.4 — Tolerancia al herbicida pos-emergencia en cáñola T₀ transformada con AAD-12 v1

Cuarenta y cinco eventos T₀ de la transformación con el constructo pDAB3759, se enviaron al invernadero durante un período de tiempo y se les dejó aclimatar en el invernadero. Las plantas se cultivaron hasta que emergieron 2-4 hojas nuevas de aspecto normal (es decir, las plantas habían pasado de las condiciones de cultivo de tejidos a las de cultivo en invernadero). Las plantas luego se trataron con una dosis letal de las formulaciones comerciales de 2,4-D amina 4 a una tasa de 560 g ae/ha. Las aplicaciones de herbicidas se hicieron con un pulverizador de pista a un volumen de pulverización de 187 L/ha, altura de pulverización de 50 cm. Una dosis letal se define como la tasa que causa >95% de lesión a los controles no transformados.

Veinticuatro de los eventos eran tolerantes a la aplicación de herbicida 2,4-D DMA. Algunos eventos sufrieron una lesión menor, pero se recuperaron en 14 DAT. Los eventos progresaron a la T₁ (y la generación T₂) por autopolinización bajo condiciones controladas y embolsadas.

22.5 Heredabilidad de AAD-12 (v1) en cáñola.

También se realizó una prueba de progenie de 100 plantas en 11 líneas T₁ de líneas AAD-12 (v1). Las semillas se sembraron, y se transplantaron a macetas de 3 pulgadas cargada con medio c Metro Mix. Todas las plantas luego se pulverizaron con 560 g ae/ha 2,4-D DMA como se ha descrito previamente. Después de 14 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Siete de las 11 líneas analizadas se segregaron como un locus único, el rasgo mendeliano dominante (3R:1S) determinado por el análisis de Chi cuadrado. AAD-12 es heredable como un gen de resistencia robusto a la ariloxialcanoato auxina en múltiples especies y se puede apilar con uno o más genes de resistencia a herbicida adicionales.

22.6 — Verificación de alta tolerancia a 2,4-D en cáñola T₁

Para T₁ AAD-12 (v /), 5-6 mg de semillas se estratificaron, sembraron y se añadió una fina capa de medio Sunshine Mix # 5 como una capa superior del suelo. Las plantas emergentes se seleccionaron con 560 g ae/ha de 2,4-D a los 7 y 13 días después de la plantación.

- 5 Las plantas sobrevivientes se trasplantaron en macetas de 3 pulgadas que contienen medios Metro Mix. Las plantas sobrevivientes de las progenie T₁, que se seleccionaron con 560 g ae/ha de 2,4-D, también se trasplantaron en macetas de 3 pulgadas llenas de tierra Metro Mix. En las plantas de etapa de hoja 2-4 se pulverizaron con 280, 560, 1120, o 2240 g ae/ha de 2,4-D DMA. Las plantas se calificaron a las 3 y 14 DAT y se compararon con las plantas de control no transformadas. Un muestreo de datos de lesión del evento T₁ 14DAT se puede ver en la Tabla 30. Los
- 10 datos sugieren que múltiples eventos son muy resistentes a 2240-g-ae/ha de 2,4-D, mientras que otros eventos demostraron tolerancia menos robusta hasta 1120 g ea /ha de 2,4-D. Las plantas sobrevivientes se trasplantaron a macetas de 5 1/4" que contienen medios Metro Mix y se colocaron en las mismas condiciones de crecimiento como antes y se auto-polinizaron para producir solo semillas homocigotas

Tabla 30. Respuesta a T1 AAD-12 (v1) y control no transformado a diversas tasas de aplicaciones pos-emergencia de 2,4-D DMA

Herbicida	Control no transformado	pDAB3759(33)013.001	pDAB3759(18)009.001	pDAB3759(18)022.001	pDAB3759(18)030.001	pDAB3759(18)023.001
% promedio de de lesión 14DAT						
280 g ae/ha 2,4-D DMA	85	0	0	0	0	0
560 g ae/ha 2,4-D DMA	85	0	0	0	0	0
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	90	0	0	13	5	3
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	95	1	5	83	31	6

15 **22.7- Tolerancia de campo de las plantas de cáñola pDAB3759 a herbicidas 2,4-D, dicloprop, triclopir y fluroxipir.**

- la prueba de tolerancia a nivel de campo se llevó a cabo en dos eventos AAD-12 (v1) de 3759(20)018,001 y 3759(18)030.001 y una cáñola de tipo salvaje (Nex710) en Fowler, Indiana. El diseño experimental fue un diseño de bloque completo aleatorizado con 3 repeticiones. Los tratamientos herbicidas eran 2,4-D (sal dimetilamina) a 280,
- 20 560, 1120, 2240 y 4480 g ae/ha, triclopir a 840 g ae/ha, fluroxipir a 280 g ae/ha y un control no tratado. Dentro de cada tratamiento con herbicidas, se plantaron en hileras de hilera 20 ft/evento único para el evento de 3759(18)030.0011, 3759(18)018.001 y la línea de tipo salvaje (Nex710) con un sembrador de 4 hileras una distancia entre hileras de 8 pulgadas. Los tratamientos herbicidas se aplicaron cuando cáñola llegó a la etapa de hoja 4-6 usando un pulverizado de mochila de aire comprimido que administra un volumen portador de 187 L/ha a una presión de 130
- 25 a 200 kPa. Las calificaciones de lesiones visuales se tomaron a 7, 14 y 21 días después de la aplicación.

- La respuesta de cáñola al 2,4-D, triclopir y fluroxipir se muestran en la Tabla 31. La cáñola de tipo salvaje (Nex710) fue gravemente dañada (72% a 14DAT) por 2,4-D en 2240 g ae/ha, la que se considera la tasa de 4X. Los eventos AAD-12 (v1) demostraron una excelente tolerancia al 2,4-D en 14DAT con una lesión promedio de 2, 3 y 2% observada en las tasas 1, 2 y 4X, respectivamente. La cáñola tipo estaba gravemente dañada (25% en 14DAT) con la tasa 2X de triclopir (840 g ae/ha). Los eventos AAD-12 (v1) demostraron tolerancia a tasas 2X de triclopir con un promedio de 6% de lesiones 14DAT en los dos eventos. Fluroxipir a 280 g ae/ha causado lesiones graves (37%) a la línea no transformada en 14DAA. Los eventos AAD-12 (v1) demostraron una mayor tolerancia con un promedio de 8% de lesión a 5DAT.
- 30

- Estos resultados indican que los eventos transformados AAD-12 (v1) muestran un alto nivel de resistencia a 2,4-D, triclopir y fluroxipir en tasas que eran letales o causaron malformaciones epinásticas graves para cáñola no transformada. Se ha demostrado que AAD-12 tiene una eficacia relativa de 2,4-D> triclopir> fluroxipir.
- 35

Tabla 31. Respuesta de las plantas de cáñola AAD-12 (pDAB3759) a 2,4-D, triclopir, y fluroxipir en condiciones de campo.

Tratamiento herbicida		% de lesión visual a 14 DAT		
Ingrediente activo	Tasa	Evento AAD-12 3759(20)018.001	Evento AAD-12 3759(30)018.001	Tipo salvaje (Nex710)
2,4-D	280 GM AE/HA	0 a	0 b	0 e
2,4-D	560 GM AE/HA	0 a	0 b	15 d
2,4-D	1120 GM AE/HA	2a	2 ab	33 be
2,4-D	2240 GM AE/HA	3a	3 ab	48 a
Triclopir	840 GM AE/HA	6a	6 ab	25 cd
Fluroxipir	280 GM AE/HA	7a	8a	37 ab

Las medias con una columna con diferentes letras son significativamente diferentes como se define en LSD ($p=0,05$).

5 Ejemplo 23 AAD-12 (v1) apilado con la resistencia a insectos (IR) u otros rasgos de entrada en cualquier cultivo

la resistencia a los insectos en los cultivos suministrados por un rasgo transgénico es prevalente en la producción de maíz y algodón en América del Norte y en todo el mundo. Los productos comerciales que tienen rasgos combinados de IR y HT han sido desarrollados por varias compañías de semillas. Estos incluyen rasgos Bt IR (por ejemplo, toxinas de Bt listadas en el sitio web lifesci.sussex.ac.uk, 2006) y cualquier o todos los rasgos HTC mencionados anteriormente. El valor de esta oferta conlleva la capacidad de controlar múltiples problemas de plagas por medios genéticos en una sola oferta. La conveniencia de esta oferta será restringido si el control de malas hierbas y control de insectos se logran en forma independiente entre sí. AAD-12 (v1) solo o apilado con uno o más rasgos HTC se puede apilar con uno o más rasgos adicional de entrada (por ejemplo, resistencia a insectos, resistencia a los hongos, o tolerancia al estrés y otros.) (lsb.vt.edu/cfdocs/fieldtestsl.cfm, 2005), ya sea a través de la reproducción convencional o conjuntamente como un nuevo evento de transformación. Los beneficios incluyen la conveniencia y flexibilidad que se describe en los Ejemplos 15-20 anteriores, junto con la capacidad de manejar las plagas de insectos y/o otros factores de estrés agronómicos además del mejor control de malas hierbas ofrecido por AAD-12 y la tolerancia a herbicidas asociada. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar para proporcionar un paquete agronómico completo de la mejora de calidad del cultivo con la capacidad de controlar de forma flexible y rentable numerosas cuestiones agronómicas.

Los rasgos combinados de IR y HT tienen aplicación en la mayoría de los cultivos agronómico y hortícolas/ornamentales y forestales. La combinación de AAD-12 y su tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos acorde proporcionada por alguno de los numerosos genes IR Bt o no Bt se puede aplicar a las especies de cultivos que figuran (pero no limitado a) en el Ejemplo 13. Los expertos en la técnica de control de malas hierbas reconocerán que el uso de varios herbicidas comerciales descritos en los Ejemplos 18-20, herbicidas de fenoxiacético o piridiloxiacético auxina, solos o en combinaciones múltiples está permitido por la transformación de AAD-12 (v1) y apilamiento con el correspondiente rasgo HT o rasgo IR por reproducción convencional o ingeniería genética. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de esta química se pueden determinar por las etiquetas de los herbicidas compilados en el libro de CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, etiquetas compiladas en línea (por ejemplo, cdms.net/manuf/manufasp), o cualquiera de las guías comerciales o académicas de protección de cultivos tales como Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo habilitado para usar en HTC por AAD-12 (v1), utilizado solo, mezclado en tanque, o secuencialmente se considera dentro del ámbito de esta invención.

Ejemplo 24 AAD-12 (v1) como un marcador seleccionable de dicotiledónea in vitro

La ingeniería genética de la célula, tejido, órgano vegetal y la planta u organela tal como plástidos comienza con el proceso de inserción de genes de interés en las células vegetales usando un método de administración adecuado. Sin embargo, cuando se administra un gen a las células vegetales, sólo un porcentaje extremadamente pequeño de células integra el gen heterogéneo en su genoma. Con el fin de seleccionar las pocas células que han incorporado el gen de interés, los investigadores ligan un "gen marcador" seleccionable o detectable al gen de interés (GOI) en el vector. Las células que contienen estos marcadores se identifican de la población total de células/tejido al que se administraron el vector de plásmido de ADN. Mediante la selección de las células que expresan el gen marcador, los investigadores son capaces de identificar las pocas células que pueden haber incorporado el GOI en su genoma.

Existe una variedad de marcadores seleccionables disponibles que permiten este proceso de selección para obtener

células, callos, embriones, brotes y plántulas transgénicas. Los marcadores seleccionables preferidos por la agroindustria son marcadores de herbicidas que permiten la facilidad de pulverizar compuestos en el campo para seleccionar las progenies transgénicas correctas durante el proceso del evento de clasificación en la situación del campo. Se ha demostrado que AAD-12 (v1) sirve eficientemente como un marcador seleccionable para plantas enteras transformadas con el gen en el invernadero y la cámara de crecimiento (Ejemplo 7) con 2,4-D como el agente de selección. La selección en el campo es posible también usando 2,4-D en combinación con el gen de AAD-12(v1) (Ejemplo 11, 22), pero el uso in vitro para la selección de nivel de celda se complica por el hecho de 2,4-D es utilizado casi ubicuamente como un regulador de crecimiento de las plantas en los sistemas de cultivo de tejidos vegetales. La degradación de esta importante hormona por AAD-12 (v1) puede afectar la capacidad de utilizar este gen como un marcador seleccionable in vitro. El éxito de desarrollar 2,4-D como un gen marcador depende de la identificación del regulador del crecimiento vegetal alternativo adecuado que puede imitar el efecto del 2,4-D en el respectivo sistema de cultivo y al mismo tiempo poseer la capacidad de ser estables y no ser degradado por la enzima AAD-12 cuando se expresa en las células transgénicas. R-diclorprop es un análogo cercano al 2,4-D que no es un sustrato para AAD-12 (v1) y utiliza un sustituto auxina no metabolizable en cultivos de células de tabaco que permite utilizar 2,4-D a altas tasas como un agente de selección. Este hecho se utilizó al ejemplificar que AAD-12 (v1) se puede utilizar como un marcador seleccionable in vitro.

24.1 Cultivo celular –auxinas alternativas

AAD-12 (v1) degrada 2,4-D, pero no ácido R-2,4-diclorofenoxipropiónico (R-diclorprop), que tiene al mismo tiempo el requerimiento estructural de un regulador del crecimiento auxínico. Otros mímicos de auxina de planta no metabolizables que se pueden usar en cultivo celular incluyen NAA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético), dicamba, picloram, y R-mecoprop. Se investigó si era posible sustituir R-diclorprop y mantener con éxito dos cultivos diferentes de células de tabaco PHL (Petite Havana) y suspensiones BY2. Por el contrario, para los explantes de algodón se analizaron R-diclorprop, dicamba, y picloram como auxinas alternativas y la respuesta de inducción del callo embriogénico en comparación con el regulador de crecimiento estándar, se evaluó 2,4-D. El tabaco Petite Havana (PHL) y los cotiledones de algodón Coker se utilizaron en sus experimentos.

24.1.1 Suspensión celular de tabaco = 2,4-D como agente de selección.

Un estudio de respuesta a la dosis se realizó tanto con las células de PHL habituadas a R-Diclorprop y las células de BY2 habituadas a R-Diclorprop en las que R-diclorprop fue sustituido directamente por 2,4-D en el medio de cultivo. Aunque la atención se centró en PHL, también se realizó una respuesta a la dosis con BY2 en caso de posibles estudios futuros, así como para ayudar a predecir la respuesta a la dosis para PHL. Para la respuesta a la dosis de PHL habituada a R-diclorprop, los niveles de 2,4-D utilizan (en un medio LSBY2C con R-diclorprop) fueron 0 (control), 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 40, 60, 80, 100, 120 mg/L de 2,4-D. Hubo cuatro repeticiones por concentración. Para la respuesta a la dosis de BY2 habituadas a R-Diclorprop, los niveles de 2,4-D utilizados (en un medio LSBY2C) fueron 0 (control), 1, 2, 3, 5, 8, 10, 20, 30, 40, mg/L de 2,4-D.

La respuesta a la dosis que se llevó a cabo mostró que toda la concentración de 2,4-D analizada fue letal por encima de las concentraciones de 10 mg/L. Sin embargo, se hubo crecimiento en todas las concentraciones de hasta 10 mg/L de 2,4-D, donde se observó un ligero crecimiento de la suspensión de PHL. El crecimiento de las colonias en suspensión de las concentraciones de 1-8 mg/L de 2,4-D fue comparable al crecimiento en los tratamientos de control. La observación realizada en las células en suspensión BY2 fueron similares excepto que se halló que la concentración de 10 mg/L fue letal y la concentración sub-letal fue de 8 mg/L de concentración.

24.1.2- Transformación de células de tabaco con AAD-12 (v1) y selección con 2,4-D.

Para el experimento de transformación de tabaco, había 11 tratamientos en total: un conjunto de control sembrado en medio LS-BY2C + diclorprop, y 10 conjuntos de LSBY2C + diclorprop + 2,4-D a diferentes niveles de concentración (1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20 mg/L). Hubo cuatro repeticiones por tratamiento. El vector de ADN plásmido utilizado fue pDAB724, y el vector utilizado para la transformación fue la cepa EHA101S de *Agrobacterium tumefaciens*. Cuatro ml de suspensión de PHL a DO_{660} 0,6 se mezclaron con 100 μ l de suspensión de *Agrobacterium* (cepas EHA101 o LBA4404) a DO_{660} 1,0 en una placa de Petri estéril y se mezclaron por completo y se cocultivaron juntos en una condición de no agitación en una cámara de crecimiento oscura durante 3 días a 25 °C. Después del período de cocultivo 1,5 ml de la mezcla de suspensión de Agro-tabaco se sembró en los 11 conjuntos de placas anteriores. El experimento se repitió con 13 tratamientos: un medio control de LS-BY2C + diclorprop (sin 2,4-D), y LS-BY2C + diclorprop + 2,4-D (1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20 mg/L); LSBY2C + 1 mg/L de 2,4-D + B10 (bialofós); LSBY2C + 10 2,4-D + B10 + R-diclorprop. Nuevamente, hubo cuatro repeticiones por tratamiento, así como un control positivo y negativo. Todos los medios contienen 500 mg/l de carbenicilina (C) para controlar el crecimiento de *Agrobacterium* en el medio de selección.

El plásmido utilizado en estos experimentos es pDAB724 y también tiene el marcador seleccionable PAT. Por lo tanto, los experimentos de transformación de control se iniciaron usando PHL habituado a R-diclorprop en presencia de bialofos 10 mg/L siguiendo el protocolo estándar descrito anteriormente. Los tratamientos se realizaron de a pares con 4 repeticiones para ver si la selección con bialofos es normal en esta suspensión.

Se observó poco crecimiento en todas las concentraciones de selección de 2,4-D analizadas por encima de 10 mg/L; sin embargo se encontraron varias colonias de crecimiento rápido en 2, 5, una concentración de 2, 5, a 8 mg/L de 2,4-D y una muestra representativa se transfirió al medio de selección fresco a razón de 10 mg/L para la selección para formar el callo. Además, se seleccionaron varias colonias putativas en 12, 15, 18 y 20 mg/L de 2,4-D, pero cuando se compararon con 10 mg/L había solo unas pocas colonias en esta placa de selección. El tratamiento de control realizado con la selección de bialofos mostró el desarrollo de colonia normal. Parece que 10 mg/L de 2,4-D es el subletal y por encima de esta concentración de 2,4-D parece ser letal para las células no transformadas. Todas las colonias identificadas se transfirieron a un medio fresco con 10 mg/L de selección y se examinaron para determinar la presencia del transgén por PCR como se describe en el Ejemplo 10. Las colonias seleccionadas y voluminizadas tenían los transgenes según lo determinado por PCR y la expresión de los genes establecida por los análisis Western (tal como se describe en el ejemplo 10). Se identificaron varias colonias con crecimiento activo y se transfirieron al medio de selección fresco con 10 mg/L de 2,4-D para aumentar el callo.

Los callos voluminizados se transfirieron luego al más alto nivel de 2,4-D para probar el nivel de tolerancia in vitro. Los niveles de 2,4-D utilizados fueron 20, 40, 60, 80, 100, y 120 mg/L de 2,4-D. Sin embargo, el callo no creció más allá de las concentraciones de 20 mg/L de 2, 4-D, lo que indica que puede existir una concentración umbral superior a 20 mg/L.

24.2.1 Explantes de algodón-alternativas de auxina

Un estudio de respuesta a la dosis se inició para probar múltiples alternativas de auxina como un sustituto para el uso de 2,4-D como un regulador del crecimiento en algodón. Las auxinas alternativas analizadas fueron 2,4 diclorprop, dicamba, y picloram. Estos compuestos se analizaron a concentraciones de 0,2, 2,0, y 20,0 μ M respectivamente. 2,4-D se usó como el tratamiento de control en la concentración de 0,02 M. El medio utilizado es el medio base para la inducción de callo de algodón (Ejemplo 12). Más allá de la fase inicial del cultivo, la auxina se extrae del medio para inducir al tejido hacia el proceso de regeneración.

R-diclorprop no fue efectivo en la inducción del callo de los segmentos cotiledonarios y parece tóxico para las células de algodón a la concentración más baja ensayada (0,02 μ M). Dicamba induce efectivamente el crecimiento de callo en todas las concentraciones ensayadas (0,02-20 μ M) y no tiene efectos tóxicos evidentes en este intervalo de concentración. La inducción del callo con picloram aumentó hasta un máximo cuando los explantes se trataron con 0,2 μ M a 20 μ M. La calidad del callo fue compatible con el tratamiento estándar de 2,4-D en la concentración de picloram 2 μ M. En la concentración más alta (20 μ M) 2,4-D también fue inhibitoria para la generación y el crecimiento del de callo de algodón.

El algodón ha mostrado capacidad inicial para responder efectivamente las auxinas alternativas (al 2,4-D) en el cultivo. A concentraciones suficientemente altas, 2,4-D es tóxico para los explantes cotiledonarios de algodón. R-diclorprop es de modo sorprendente significativamente más tóxico para el algodón de 2,4-D u otras auxinas. 2,4-D se puede usar como un agente de selección y en combinación con AAD-12 (v1) como el gen marcador seleccionable. Otros sustitutos de auxina no metabolizables (por ejemplo, dicamba, picloram, R-mecoprop, NAA, o IAA) pueden permitir el uso de AAD-12 como un marcador seleccionable en las dicotiledóneas con 2,4-D como el agente de selección.

Lista de referencias

Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker, and D.V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36:289-300.

Agrilience Crop Protection Guide. 2005. Agrilience, LLC. St Paul, MN. 614 p.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215:403-410.

Altschul, S. F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein databasesearch programs. *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.

An, G., B.D. Watson, S. Stachel, M.P. Gordon, E. W. Nester. 1985. New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4:277-284.

Armstrong C.L., C.E. Green, R.L. Phillips. 1991. Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genet Coop News Lett* 65:92-93.

Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbass, and F.C. Kafatos. 1983 *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100:266-285

Birch R.G. and T. Franks. 1991. Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:453-469.

- CDMS. Crop Data Management Systems Labels and MSDS. Online. Internet. March 13, 2004. Available at net/manuf/manuf.asp.
- Chee P.P., K.A. Fober, J.L. Slightom. 1989. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 91:1212-1218.
- 5 Cheng M., J.E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, T.W. Conner, and Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115: 971-980.
- Chu C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu, F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18:659-668.
- 10 Clemente T.E., B.J. LaVallee, A.R. Howe, D. Conner-Ward, R.J. Rozman, P.E. Hunter, D.L. Broyles, D.S. Kasten, M.A. Hinchee. 2000. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci* 40: 797-803.
- CPR: Crop Protection Reference. 2005 Chemical and Pharmaceutical Press, New York, NY. 2647 p.
- Devine, M. D. 2005. Why are there not more herbicide-tolerant crops? *Pest Manag. Sci.* 61:312-317.
- Dietrich, Gabriele Elfriede (1998) Imidazolinone resistant AHAS mutants. U.S. Patent 5,731,180.
- 15 Didierjean L, L. Gondet, R. Perkins, S.M. Lau, H. Schaller, D.P. O'Keefe, D. Werck-Reichhart. 2002. Engineering Herbicide Metabolism in Tobacco and Arabidopsis with CYP76B1, a Cytochrome P450 Enzyme from Jerusalem Artichoke. *Plant Physiol* 2002, 130:179-189.
- Ditta, G. S. Stranfield, D. Corbin, and D.R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium leiloti*. *PNAS* 77:7347-7351.
- 20 Edwards, R. A., L. H. Keller, and D. M. Schifferli. 1998. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene* 207:149-157.
- El-Shemy A, M.Teraishi, M. Khalafalla, T. Katsube-Tanaka, S. Utsumi, M. Ishimoto. 2004. Isolation of soybean plants with stable transgene expression by visual selection based on green fluorescent protein *Molecular Breeding* 14: 227-238.
- 25 El-Shemy A, M. Khalafalla, K. Fujita, M. Ishimoto. 2006. Molecular control of gene co-suppression of transgenic soybean. *J. Biochem. and Mole. Biol.* 39: 61-67.
- Falco S.C., T. Guida, M. Locke, J. Mauvais, C. Sanders, R.T. Ward, P. Webber. 1995. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Bio/Technology* 13:577-582.
- 30 Finer J. and M. McMullen. 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27P:175-182.
- Fraley, R.T., D.G. Rogers, and R. B. Horsch. 1986. Genetic transformation in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 4:1-46.
- 35 Frame B.R., P.R. Drayton, S.V. Bagnall, C.J. Lewnau, W.P. Bullock, H.M. Wilson, J.M. Dunwell, J.A. Thompson, and K. Wang. 1994. Production of fertile maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. *Plant J.* 6:941-948.
- Fukumori, F., and R.P. Hausinger. 1993. Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 268: 24311-24317.
- Gamborg, O.L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspensions of cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- 40 Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari, and J. A. Hoch. 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 153:1424-1431.
- Gianessi, L. R. 2005 Economic and herbicide use impacts of glyphosate-resistant crops. *Pest. Manag. Sci.* 61:241-245.
- 45 Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. March 18, 2005 . Available at weedsscience.com.
- Hiei Y., T. Komari, and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Mol. Biol.* 35:205-218.

- Hiei, Y., T. Komari (1997) Method for Transforming Monocotyledons. U.S. Patent 5,591,616.
- Hinchee M.A.W., D.V. Conner-Ward, C.A. Newell, R.E. McDonnell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley, R.B. Horsch. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology* 6:915-922.
- 5 Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal cristal proteins of *Bacillus thuringiensis*. 1989. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- Hoekema, A. 1985. In: *The Binary Plant Vector System*, Offset-drukkerij Kanters B.V., Alblasserdam, Chapter 5.
- Hogan, D.A.; S.R. Smith, E.A. Saari, J. McCracken, R.P. Hausinger. 2000. Site-directed mutagenesis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/a-ketoglutarate dioxygenase. Identification of residues involved in metallocenter formation and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 275:12400-12409.
- 10 Holsters, M., D. De Waele, A. Depicker, E. Messens, M. Van Montagu, and J. Schell. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen. Genet.* 163:181-187.
- Horsch, R., J. Fry, N. Hoffman, J. Neidermeyer, S. Rogers, and R. Fraley. 1988. In *Plant Molecular Biology Manual*, S. Gelvin et al., eds., Kluwer Academic Publishers, Boston
- 15 Horvath, M., G. Ditzelmüller, M. Lodl, and F. Streichsbier. 1990. Isolation and characterization of a 2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid-degrading soil bacterium. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 33:213-216.
- Jefferson, R. A. M. Bevan, and T. Kavanagh. 1987. The use of *Escherichia coli* β -glucuronidase gene as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* 15: 17-19.
- Karlin, S. and S.F. Altschul. 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *PNAS* 87:2264-2268.
- 20 Karlin, S. and S.F. Altschul. 1993. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *PNAS* 90:5873-5877
- Keller, G.H., and M.M. Manak. 1987. *DNA Probes*. Stockton Press, New York, NY, pp. 169-170.
- 25 Khalafalla M, S. Rahman, H. El-Shemy, Y. Nakamoto, K. Wakasa, M. Ishimoto. 2005. Optimization of particle bombardment conditions by monitoring of transient sGFP(S65T) expression in transformed soybean. *Breeding Sci.* 55:257-263.
- Khan M, L. Table, L. Heath, D. Spencer, T. Higgins. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Plant Physiol* 105:81-88.
- Kohler, H.P.E. 1999. *Delftia acidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. *J. Ind Microbiol and Biotech.* 23:336-340.
- 30 Li L, Qu R, Kochko A de, Fauquet CM, Beachy RN (1993) An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep* 12:250-255
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:100-127.
- 35 Lorraine-Colwill, D. F., S. B. Powles, T. R. Hoawkes, P.H. Hollingshead, S.A.J. Arner, and C. Preston. 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 74:62-73.
- Luo, H., Q. Hu, K. Nelson, C. Longo, A. P. Kausch, J. M. Chandless, J. K. Wipff and C. R. Fricker. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. *Plant Cell Reports* 22: 645-652.
- 40 Lyon, B.R., D. J. Llewellyn, J. L. Huppatz, E. S. Dennis, and W. J. Peacock. 1989. Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Mol. Bio.* 13:533-540.
- Lyon, B.R., Y. L. Cousins, D. J. Llewellyn, and E. S. Dennis. 1993. Cotton plants transformed with a bacterial degradation gene are protected from accidental spray drift damage by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Transgenic Res.* 2: 166-169.
- 45 Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Martin, J.R. and W.W. Witt. 2002. Response of glyphosate tolerant and susceptible biotypes of horseweed (*Conyza*

- canadensis) to foliar applied herbicides. *Proc.North Cent Weed Sci Soc.* 57:185.
- Martinell B.J., L.S. Julson, C.A. Emler, H. Yong, D.E. McCabe, E.J. Williams. 2002. Soybean Agrobacterium transformation method. U.S. Patent Application No. 6384301
- McCabe D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell, P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6:923-926.
- Miller S.D., P.W. Stahlman, P. Westra, G.W. Wicks, R.G. Wilson, J.M. Tichota. 2003. Risks of weed spectrum shifts and herbicide resistance in glyphosate-resistant cropping systems. *Proc.West.Soc.Weed Sci.* 56:61-62.
- Muller R, S. Jorks, S. Kleinsteuber, W. Babel. 1999. *Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. *Microbiol. Res.* 154:241-246.
- Muller T, S. Byrde, C. Werlen, J. Roelof van der Meer, H-P. Kohler. 2004. Genetic Analysis of Phenoxyalkanoic Acid Degradation in *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10):6066-6075.
- Muller T, T. Fleischmann, J. Roelof van der Meer, H-P. Kohler. 2006. Purification and Characterization of Two Enantioselective α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases, RdpA and SpdA from *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(7):4853-4861.
- Muller T, M. Zavodszky, M. Feig, L. Kuhn, R. Hausinger. 2006. Structural basis for the enantiospecificities of R- and S-specific phenoxypropionate/ α -ketoglutarate dioxygenases. *Protein Sci.* 15:1356-1368.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murphy G.P., T.E. Dutt, R.F. Montgomery, T.S. Willard, G.A. Elmore. 2002. Control of horseweed with glyphosate. *Proc.North Cent.Weed Sci.Soc.* 57:194.
- Ng, C.H., R. Wickneswari, S. Salmigah, Y.T. Teng, and B.S. Ismail. 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Res.* 43:108-115.
- Olhoft P.M. and D.A. Somers. 2001. L-Cysteine increases Agrobacterium-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20: 706-711
- Olhoft, P.M., L.E. Flagel, C.M. Donovan, and D.A. Somers. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216:723-735
- Padgett S.R., K.H. Kolacz, X. Delannay, D.B. Re, B.J. LaVallee, C.N. Tinius, W.K. Rhodes, Y.I. Otero, G.F. Barry, D.A. Eichholtz, V.M. Peschke, D.L. Nida, N.B. Taylor, and G.M. Kishore. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 1995;35:1451-1461.
- Parrott W.A., J. N. All, M.J. Adang, M.A. Bailey, H.R. Boerma, and C.N. Stewart, Jr. 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30P:144-149.
- Popelka, J. C. and F. Altpeter 2003. Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereale* L) *Mol. Breed* 11:203-211
- Powles, S.B. and C. Preston. 2006. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Tech* 20:282-289.
- Saari, R.E., D.A. Hogan, and R.P. Hausinger. 1999. Stereospecific degradation of the phenoxypropionate herbicide dichlorprop. *J. Mol. Catal. B: Enz.* 6:421-428.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2000. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt (1972) Methods and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.

- Sfiligoj, E. 2004. Spreading resistance. *Crop Life*. March issue.
- Simarmata, M., J.E. Kaufmann, and D. Penner. 2003. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 51:678-682.
- 5 Singh R.J., T.M. Klein, C.J. Mauvais, S. Knowlton, T. Hymowitz, C.M. Kostow. Cytological characterization of transgenic soybean. *Theor. Appl. Genet.* 1998; 96:319-324.
- Smejkal, C.W., T. Vallaey, S.K. Burton, and H.M. Lappin-Scott. 2001. Substrate specificity of chlorophenoxyalkanoic acid-degrading bacteria is not dependent upon phylogenetically related *tfdA* gene types. *Biol. Fertil. Sols* 33:507-513.
- Streber, W. and L. Willmitzer. 1989. Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. *Bio/Technology* 7:811-816.
- 10 Streber, W.R., K.N. Timmis, and M. H. Zenk. 2000. Microorganisms and plasmids for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) monooxygenase formation and process for the production of these plasmids and strains. US Pat. 6,153,401.
- Streber, W.R., K.N. Timmis, and M.H. Zenk. 1987. Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenylacetic monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J. Bacteriol.* 169:2950-2955.
- 15 Suggs, S.V., T. Miyake, E.H. Kawashime, M.J. Johnson, K. Itakura, and R.B. Wallace. 1981. ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes, D.D. Brown [ed.], Academic Press, New York, 23:683-693.
- Terakawa T, H. Hisakazu, Y. Masanori. 2005. Efficient whisker-mediated gene transformation in a combination with supersonic treatment. *Breeding science* 55: 456-358.
- Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, W. Mingbo, S. Thornton, and R. Bretell. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11:1369-1376.
- 20 Weigel, D. and J. Glazebrook. 2002. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 358 pp.
- Weising, K., J. Schell, and G. Kahl. 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477.
- 25 Welter, M.E., D.S. Clayton, M.A. miler, and J.F. Petolino. 1995. Morphotypes of friable embryogenic maize callus. *Plant Cell Rep.* 14:725-729.
- Westendorf A., D. Benndorf, R. Muller, W. Babel. 2002. The two enantiospecific dichlorprop/ α -ketoglutarate-dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1-protein and sequence data of RdpA and SdpA. *Microbiol. Res.* 157:317-22.
- 30 Westendorf, A., R.H. Muller, and W. Babel. 2003. Purification and characterization of the enantiospecific dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1 initiating the degradation of phenoxypropionates and phenoxyacetate herbicides. *Acta Biotechnol.* 23: 3-17.
- WSSA. 2002. *Herbicide Handbook* (8th ed). Weed Science Society of America. Lawrence, KS 492 pp.
- Zeng P, D. Vadnais, Z. Zhang, and J. Polacco. 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Rep.* 22: 478 - 482.
- 35 Zhang S (1995) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. *Plant Cell Rep* 15:68-71
- Zhang S, Chen L, Qu R, Marmey P, Beachy RN, Fauquet CM (1996) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. *Plant Cell Rep* 15:465-469.
- 40 Zhang S, Song W, Chen L, Ruan D, Taylor N, Ronald P, Beachy RN, Fauquet CM (1998) Transgenic elite Indica rice varieties, resistant to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Breed* 4:551-558.
- Zhang, Z., A. Xing, P.E. Staswick, and T. E. Clemente. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 56:37-46.
- Zhao, Z.Y., T. Cai, L. Tagliani, M. Miller, N. Wang, H. Pang, M. Rudert, S. Schroeder, D. Hondred, J. Seltzer, and D. Pierce. 2000. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation, *Plant Mol. Biol.* 44:789-798.
- 45 Zipper, C., M. Bunk, A. Zehnder, H. Kohler. 1998. Enantioselective uptake and degradation of the chiral herbicide dichlorprop [(RS)-2-(2,4-dichlorophenoxy) propanoic acid] by *Delftia acidovorans* MH. *J. Bact.* 13:3368-3374

Lista de secuencias

<110> Dow AgroSciences LLC

5 <120> Nuevos genes de resistencia a herbicidas

<130> 502-24 EPT1

<140> EP 06 844 227.6

10 <141> 2006-10-26

<150> US 60/731,044

<151> 2005-10-28

15 <160> 15

<170> Patent In version 3.3

<210> 1

20 <211> 879

<212> DNA

<213> Delftia acidovorans

<400> 1

25 atgcagacga cgctgcagat tccccccaca ggcgccaccc tgggcgccac cgtcaccggc 60

gtgcacctgg ccacgctgga cgacgcgggc ttgcgcgccc tgcacgcgcg ctggctgcag 120

catgcgctgc tgatcttccc cggccagcac ctcagcaacg accagcagat cacttttgcc 180

aaacgcttcg gcgcgatcga gcgcctcggc ggcggcgaca tcgtggccat ctccaatgtc 240

aaggccgatg gcacggtgcg ccagcacagc cccgccgagt gggacgacat gatgaaggtc 300

atcgctcgga acatggcctg gcatgccgac agcacctaca tgccggtgat ggcgcagggc 360

gcggtgttct cggccgaagt ggtgcccgca gtgggcgggc gcacctgctt cgccgacatg 420

cgcgccgctt acgacgcgct ggaagaggcc acccgcgccc tgggtcacca gcgctcggcg 480

cggcattcgc tgggtgtattc gcagagcaag ctgggccatg tgcagcaggc cggctcggcc 540

tacatcggct acggcatgga caccaccgcc acgcccctgc gcccgctggt caaggatgat 600

cccgagaccg gccgcccctc gctgctgatc ggccgccatg cccatgccat cccgggcatg 660

gacgccgccc aatccgagcg ctctctggaa ggcctggtcg actgggcctg ccaggcgccg 720

cgggtgcatg cccaaccaatg ggccgcgggc gacgtggtgg tgtgggacaa ccgctgcctg 780

ctgcaccgcg ccgagccctg ggatttcaag ctgccgcggg tgatgtggca cagccgcctg 840

gccggccgcc ccgagaccga gggcgccgcc ctggtgtaa 879

<210> 2

<211> 292

30 <212> PRT

<213> Delftia acidovorans

<400> 2

ES 2 637 948 T3

Met Gln Thr Thr Leu Gln Ile Thr Pro Thr Gly Ala Thr Leu Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Thr Gly Val His Leu Ala Thr Leu Asp Asp Ala Gly Phe Ala
20 25 30

Ala Leu His Ala Ala Trp Leu Gln His Ala Leu Leu Ile Phe Pro Gly
35 40 45

Gln His Leu Ser Asn Asp Gln Gln Ile Thr Phe Ala Lys Arg Phe Gly
50 55 60

Ala Ile Glu Arg Ile Gly Gly Gly Asp Ile Val Ala Ile Ser Asn Val
65 70 75 80

Lys Ala Asp Gly Thr Val Arg Gln His Ser Pro Ala Glu Trp Asp Asp
85 90 95

Met Met Lys Val Ile Val Gly Asn Met Ala Trp His Ala Asp Ser Thr
100 105 110

Tyr Met Pro Val Met Ala Gln Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val
115 120 125

Pro Ala Val Gly Gly Arg Thr Cys Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr
130 135 140

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

Arg His Ser Leu Val Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Val Gln Gln
165 170 175

Ala Gly Ser Ala Tyr Ile Gly Tyr Gly Met Asp Thr Thr Ala Thr Pro
180 185 190

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

Leu Ile Gly Arg His Ala His Ala Ile Pro Gly Met Asp Ala Ala Glu
210 215 220

Ser Glu Arg Phe Leu Glu Gly Leu Val Asp Trp Ala Cys Gln Ala Pro
225 230 235 240

Arg Val His Ala His Gln Trp Ala Ala Gly Asp Val Val Val Trp Asp
245 250 255

Asn Arg Cys Leu Leu His Arg Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys Leu Pro
260 265 270

Arg Val Met Trp His Ser Arg Leu Ala Gly Arg Pro Glu Thr Glu Gly
275 280 285

Ala Ala Leu Val
290

<210> 3

<211> 882

<212> DNA

<213> Delftia acidovorans

<400> 3

ES 2 637 948 T3

```

atggctcaga ccactctcca aatcacaccc actggtgcc a cttgggtgc cacagtcact      60
ggtgttcacc ttgccacact tgacgatgct ggtttcgctg ccctccatgc agcctggctt      120
caacatgcac tcttgatctt ccctgggcaa cacctcagca atgaccaaca gattaccttt      180
gctaaacgct ttggagcaat tgagaggatt ggcggaggtg acattgttgc catatccaat      240
gtcaaggcag atggcacagt gcgccagcac tctcctgctg agtgggatga catgatgaag      300
gtcattgtgg gcaacatggc ctggcacgcc gactcaacct acatgccagt catggctcaa      360
ggagctgtgt tcagcgcaga agttgtccca gcagttgggg gcagaacctg ctttgtgac      420
atgagggcag cctacgatgc ccttgatgag gcaaccogtg ctcttgttca ccaaaggctc      480
gctcgtcact cccttggtga ttctcagagc aagttgggac atgtccaaca ggccgggtca      540
gcctacatag gttatggcat ggacaccact gcaactcctc tcagaccatt ggtcaagggtg      600
catcctgaga ctggaaggcc cagcctcttg atcgcccgcc atgcccatgc catccctggc      660
atggatgcag ctgaatcaga gcgcttcctt gaaggacttg ttgactgggc ctgccaggct      720
cccagagtcc atgctcacca atgggctgct ggagatgtgg ttgtgtggga caaccgctgt      780
ttgctccacc gtgctgagcc ctgggatttc aagttgccac gtgtgatgtg gcactccaga      840
ctcgctggac gccagaaac tgaggggtgct gccttgggtt ga                        882

```

<210> 4

<211> 293

5 <212> PRT

<213> Delftia acidovorans

<400> 4

```

Met Ala Gln Thr Thr Leu Gln Ile Thr Pro Thr Gly Ala Thr Leu Gly
1          5          10          15

Ala Thr Val Thr Gly Val His Leu Ala Thr Leu Asp Asp Ala Gly Phe
20          25          30

Ala Ala Leu His Ala Ala Trp Leu Gln His Ala Leu Leu Ile Phe Pro
35          40          45

Gly Gln His Leu Ser Asn Asp Gln Gln Ile Thr Phe Ala Lys Arg Phe
50          55          60

```

10

ES 2 637 948 T3

Gly Ala Ile Glu Arg Ile Gly Gly Gly Asp Ile Val Ala Ile Ser Asn
65 70 75 80

Val Lys Ala Asp Gly Thr Val Arg Gln His Ser Pro Ala Glu Trp Asp
85 90 95

Asp Met Met Lys Val Ile Val Gly Asn Met Ala Trp His Ala Asp Ser
100 105 110

Thr Tyr Met Pro Val Met Ala Gln Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val
115 120 125

Val Pro Ala Val Gly Gly Arg Thr Cys Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala
130 135 140

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

Ala Arg His Ser Leu Val Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Val Gln
165 170 175

Gln Ala Gly Ser Ala Tyr Ile Gly Tyr Gly Met Asp Thr Thr Ala Thr
180 185 190

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

Leu Leu Ile Gly Arg His Ala His Ala Ile Pro Gly Met Asp Ala Ala
210 215 220

Glu Ser Glu Arg Phe Leu Glu Gly Leu Val Asp Trp Ala Cys Gln Ala
225 230 235 240

Pro Arg Val His Ala His Gln Trp Ala Ala Gly Asp Val Val Val Trp
245 250 255

Asp Asn Arg Cys Leu Leu His Arg Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys Leu
260 265 270

Pro Arg Val Met Trp His Ser Arg Leu Ala Gly Arg Pro Glu Thr Glu
275 280 285

Gly Ala Ala Leu Val
290

<210> 5

<211> 882

<212> DNA

<213> *Delftia acidovorans*

<400> 5

atggctcaga ctaccctgca gattaccccg actggtgcga ccctgggtgc aaccgttacc 60

ggcggtcacc tggcgactct ggatgacgca ggtttcgctg cgctgcacgc ggcttggtcg 120

caacatgctc tcttgatttt cccaggtcag cacctgtcca acgaccagca aatcactttt 180

ES 2 637 948 T3

gcaaaaacgct tcggtgcat cgaacgtatc ggtggcgggtg atattgtggc gatctccaac 240
 gtaaaagcgg atgggtactgt acgtcagcac agcccgccgg agtgggacga tatgatgaag 300
 gtgatcgtag gcaacatggc atggcatgct gacagcacct acatgccggg tatggcgag 360
 ggtgcgggtt tctctgctga agtgggtccg gcagtgggag gtcgcacctg ctctgcagac 420
 atgcgtgcag ctacgcagcg gttagacgaa gctaccgcgg cactggtaca ccagcgctct 480
 gcgcgtcact ctctgggtga ttcccagagc aaactggggc acgttcagca agcgggctcc 540
 gcataatatcg gctacggtat ggataccact gcgaccccgc tgcgtccgct ggtaaaagtg 600
 catccgaaa ccggccgtcc gtctctctg atcgcccgct acgctcatgc gattccgggt 660
 atggacgcgg cagaatccga gcgtttcctg gaaggctctg ttgattgggc ttgtcaggcg 720
 ccgcgtgtgc atgctcacca gtgggcagct ggcgacgtg ttgtatggga taaccgctgc 780
 ctgcttcacc gtgcagaacc gtgggacttt aagctgccac gtgttatgtg gcacagccgt 840
 ctggcaggcc gccagaaac cgaggcgcg gctctggtt aa 882

<210> 6

<211> 16

5 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador de secuenciación directo M13 sintetizado químicamente

<400> 6

gtaaaacgac ggccag 16

<210> 7

15 <211> 17

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador de secuenciación inverso M13 sintetizado químicamente

<400> 7

caggaaacag ctatgac 17

<210> 8

25 <211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Cebador AAD-12 (v1) PTU directo sintetizado químicamente

<400> 8

35 gaacagttag acatggtcta aagg 24

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Cebador AAD-12 (v1) PTU inverso sintetizado químicamente

<400> 9

45 gctgcaacac tgataaatgc caactgg 27

5 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR codificante de AAD-12 (v1) inverso sintetizado químicamente
 10 <400> 10
 atggctcaga ccactctcca aa 22
 <210> 11
 <211> 20
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR codificante de AAD-12 (v1) inverso sintetizado químicamente
 20 <400> 11
 agctgcatcc atgccaggga 20
 <210> 12
 25 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador de región codificante directo de SdpacodF : AAD-12 (v1) sintetizado químicamente
 <400> 12
 atggctcatg ctgccctcag cc 22
 35 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador de región codificante inverso de SdpacodF : AAD-12 (v1) sintetizado químicamente
 <400> 13
 45 cgggcaggcc taactccacc aa 22
 <210> 14
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente "Ncol de Brady"
 <400> 14
 55 tataccacat gtcgatcgcc atccggcagc tt ' 32
 <210> 15
 <211> 33
 <212> DNA
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintetizado químicamente "Sacl of Brady"
 65 <400> 15
 gagctcctat cactccgccg cctgctgctg cac 33

REIVINDICACIONES

1. Un método de cultivo de plantas que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que hibrida en condiciones rigurosas con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5 en una zona, comprendiendo dicho método: aplicar uno o más herbicidas de ariloxialcanoato a dicha zona para controlar las malas hierbas, incluyendo la aplicación pre-plantas de dicho herbicida a dicha zona antes de sembrar dicha zona con semillas para dichas plantas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho herbicida se aplica sobre la parte superior de dichas plantas.
3. El método de la reivindicación 1, en el que las plantas se están cultivando.
4. El método de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método además la aplicación de un segundo herbicida con un modo de acción diferente del modo de acción del mencionado herbicida de ariloxialcanoato.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha proteína es al menos 95% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dichas plantas comprenden un segundo polinucleótido que imparte a dichas plantas tolerancia a un segundo herbicida, y dicho método comprende aplicar dicho segundo herbicida a dicha zona.
7. El método de la reivindicación 6, en el que dichas plantas comprenden un tercer polinucleótido que imparte a dichas plantas tolerancia a un tercer herbicida, y dicho método comprende aplicar dicho tercer herbicida a dicha zona.
8. El método de la reivindicación 1, en el que dichas plantas son plantas de cultivo dicotiledóneas, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en algodón, tabaco, canola y soja.
9. El método de la reivindicación 1, en el que dicha aplicación se usa para inhibir el crecimiento de las malas hierbas mientras se protege una planta contra la inhibición del crecimiento mediante un herbicida de ariloxialcanoato dioxigenasa, comprendiendo dicho método el cultivo de una planta que comprende un gen AAD-12 y la aplicación de dicho herbicida a dicha planta.
10. El método de la reivindicación 1, en el que dichos herbicidas se aplican secuencial o concurrentemente, posiblemente a partir de una mezcla en tanque.
11. El método de la reivindicación 1, en el que dicho herbicida es un herbicida de fenoxi-auxina.
12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho herbicida de fenoxi-auxina se selecciona del grupo que consiste en 2,4-D y MCPA.
13. El método de la reivindicación 6, en el que dicho segundo polinucleótido es para resistencia al glifosato, resistencia al glufosinato, resistencia al inhibidor de ALS, resistencia al inhibidor de HPPD, resistencia al inhibidor de PPO, resistencia al inhibidor de ACC-asa o resistencia a dicamba.
14. El método de la reivindicación 7, en el que dicho tercer polinucleótido es para resistencia al glifosato, resistencia al glufosinato, resistencia al inhibidor de ALS, resistencia al inhibidor de HPPD, resistencia al inhibidor de PPO, resistencia al inhibidor de ACC-asa o resistencia a dicamba.
15. El método de la reivindicación 13 ó 14, en el que dicho segundo y / o tercer herbicida se selecciona del grupo que consiste en glifosato, glufosinato, un inhibidor de ALS, un inhibidor de HPPD, un inhibidor de PPO, un inhibidor de ACC-asa y dicamba.
16. El procedimiento de la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho segundo y / o tercer herbicida se selecciona del grupo que consiste en diclorprop, triclopyr y fluroxipir.
17. El método de la reivindicación 1, en el que dichas plantas son dicotiledóneas, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en algodón, tabaco, canola y soja.
18. El método de la reivindicación 13, en el que dicha aplicación se usa para tratar o prevenir malezas resistentes a herbicidas.
19. El método de la reivindicación 18, en el que dicha aplicación se usa para controlar malas hierbas tolerantes al glifosato y / o tolerantes al glufosinato.
20. El método de la reivindicación 19, en el que dichas malas hierbas comprenden al menos una planta voluntaria resistente al glifosato de una especie diferente de las plantas que se definen en la reivindicación 6, que comprende el segundo polinucleótido.

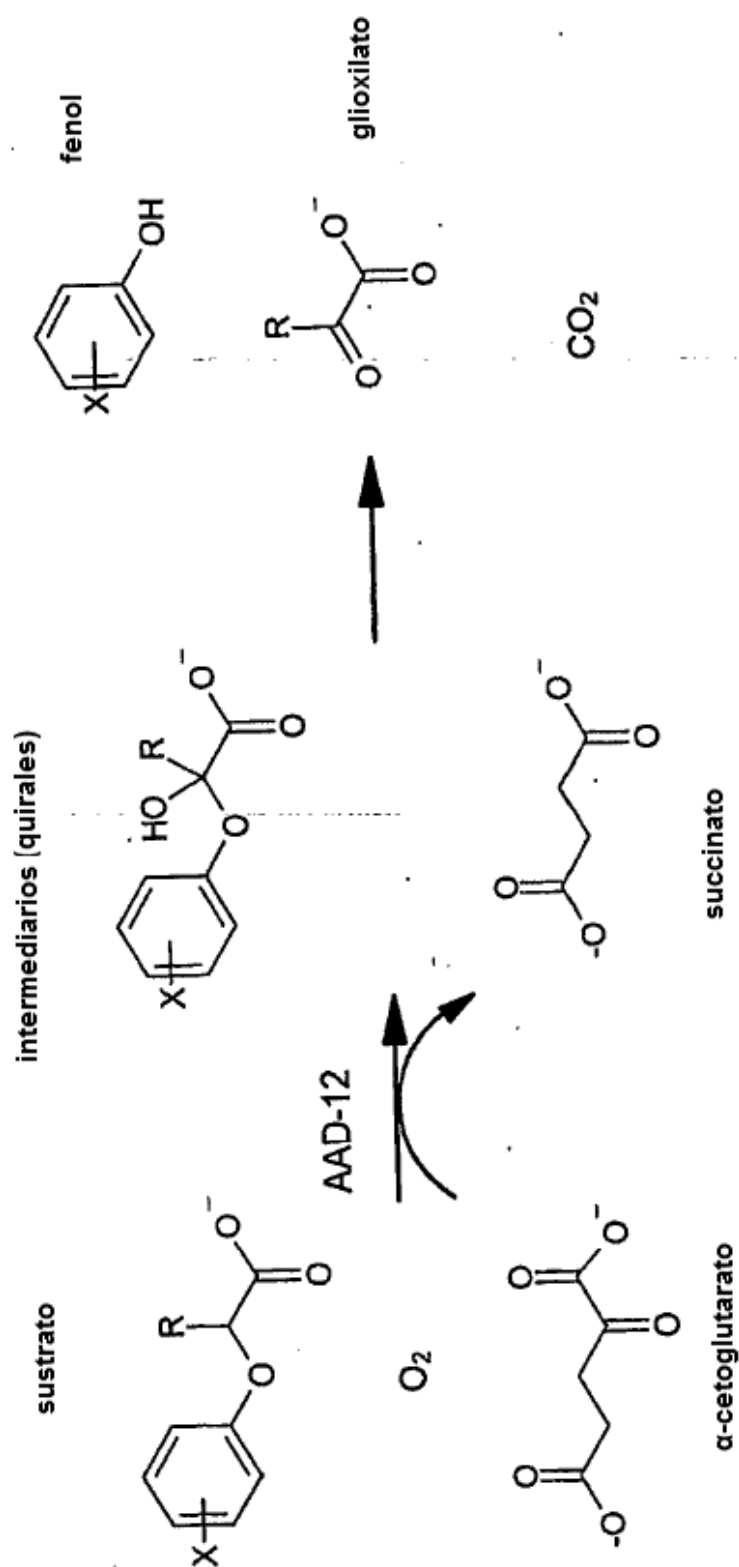
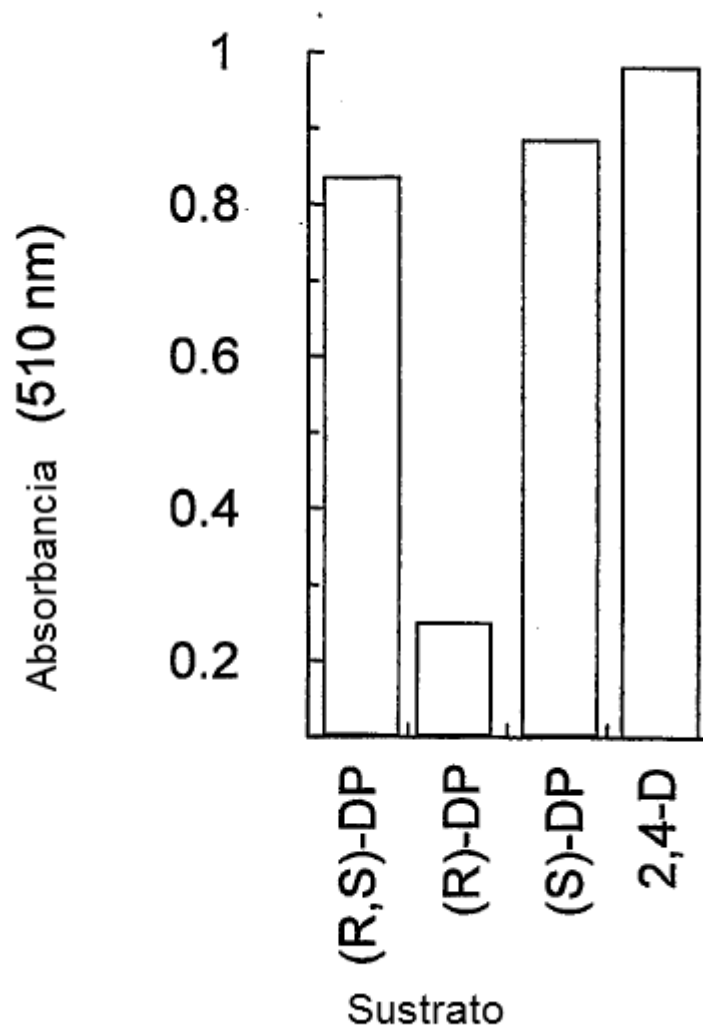


FIG. 1

	10	20	30	40	50	60	70	80
AAD-12	1							
tfda	1	-----MOTLQITPTGATIGAVVIGVHAT-EDDAGFAALHAAWLOHALITPQOHLSDNQOITFAKRFG-----						
AAD-2	1	-----MSVANPLHPLFAAGVEDIDREALGSTEVREIERLMDKSVLVRGQPLSQDQQIAFARNFGPLEG-----						
AAD-1	1	-----MTIATRQLQTHFVGQVSGDILRKPLTPGEAREVESAMDKYAVIYVHDQDITDEQQMAFALNFGOREDA-----						
taud	1	-----MHAALSPLSORFERIAVQPLTGVIGAEITGVDLREPLDDSTWNEILLDAFHTYQVIYFPGQAITNEGHIAFSRFG-----						
		-----NSERLSITPLGPYICAGQISGADLTRPLSDNQFEQLYFAVLRHQVFLRDQAITPQQORALACRFG-----						
	90	100	110	120	130	140	150	160
AAD-12	64							
tfda	67	-----AIERIGGGDIVAISNVKADGTVRQHSAPAEWDDMMKVIVGMAHMAHSTYMPVMAQGAVFSAEVVPAVGGGTCEADM-----						
AAD-2	69	-----GFIKVNOQFESRFKYAELADISNVSLDGKVAQORDAREVVGNFANQOLMHSDSSEQQPAARYSMLSAVVVPSPGGGTGFCDM-----						
AAD-1	75	-----RGGTVTKEKDYRLQ-SGLNDVSNLGDGKPLAKDSRTHLFNLGNCIMHSDSSEFPIPAKFSLLSARVVMPTGGNTERADM-----						
taud	65	-----PVDVPVLLKSIIEGYEVEQVMIRREANESGR-----VIGDDWHDSTFLDAPPAAVMRAIDVPEHGGDTGFLSM-----						
		-----ELHIHVPYPHAEGVDEIIVLDTHNDNPP-----DNDNWHTDVTFIETPPAGAILAAKELFSTGGDTLWTSG-----						
	170	180	190	200	210	220	230	240
AAD-12	141							
tfda	147	-----RAAYDALDEATRALVHORSARHSLSVYSQS-----KLGHVQQAGSALICYGMDTTATPLRPLVKVHPETGRPSLLIGR-HAH-----						
AAD-2	148	-----RAAYDALPRDLQSELEGLRAEHVALNSRF-----LLGDTYSEAQRNAMPVNPVPLVRTHAGSGRRFUGA-HAS-----						
AAD-1	144	-----RAAYDALDDETKAEIEDLVCEHSLMYSRG-----SLGFTETDEEKQMFKPLQRLVRTHPVHRKSLYLSS-HAG-----						
taud	132	-----YTAWETLSPTMQATIEGLNVVHSATRVFGSLYQAQNRFRSNTSVKVMVDVADGRETVPVPLVTHPGSGRKGLVYNQVYCO-----						
		-----IAAYEALSVPFROLLSGLRAEHDFRKSFP-----EYKYRKTETEEHQWRREAVAKNPPLLHPVVRTHPVSGKQALFVNEGFTT-----						
	250	260	270	280	290	300	310	
AAD-12	216							
tfda	217	-----ATPGMDAAESERFLEGLVDVWQAPRVHAHQWAGDVVVDNRCGLIHRAEPWDFKLPVVMHSLRACRPETEGAALV-----						
AAD-2	218	-----HVEGLPVAEGRMLLAELEHATQREFVYHRHMNVGDLVMDNRCVILHGRRRYDISAREELRATLDDAVV-----						
AAD-1	224	-----KTASMSVPEGRLLTRDIAHEHATQEFVYVHKWKLHDLVMDNRCVIMHVRURYDQSQPEMRATVAGTEPTVQQQAAE-----						
taud	209	-----RIEGMTDAESKPLIQFLVHEHATRFDFTCRVWKKDQVLVMDNLCVIMHRAVPDYAGKFEVLTETVGGVRPAR-----						
		-----RLVDVSEKESSEALLSFLFAHITKPEFQVRWRWQPNDLAIWMDNRVTCHEYANADYLPQRELIMHRAITILGDKPFYRAG-----						

FIG. 2

**FIG. 3**