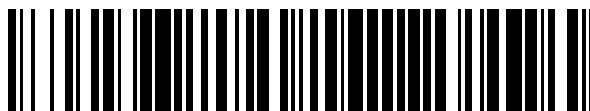


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 147**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2007 E 12181146 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2527452**

54 Título: **Péptidos de tránsito a cloroplastos para el direccionamiento eficaz de DMO y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**26.02.2007 US 891675 P**  
**05.06.2007 US 758659**

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

**14.03.2018**

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)**  
**800 North Lindbergh Blvd.**  
**St. Louis, MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**FENG, PAUL C.C.;**  
**MALVEN, MARIANNE y**  
**FLASINSKI, STANISLAW**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 659 147 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

Péptidos de tránsito a cloroplastos para el direccionamiento eficaz de DMO y usos de los mismos

### Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de la biotecnología de plantas. Más particularmente, la invención se refiere a la identificación y uso de péptidos de tránsito a cloroplastos que permiten el procesamiento eficaz y la localización de enzimas dicamba monooxigenasa en plantas.

### Descripción de la técnica relacionada

10 La DMO (dicamba monooxigenasa) cataliza la degradación del herbicida dicamba (ácido 3,6-dicloro-o-anísico) al ácido 3,6-diclorosalicílico (3,6-DCSA) no tóxico en plantas, confiriendo de esta manera tolerancia al herbicida. La actividad de la DMO necesita dos proteínas intermedias para el lanzamiento de electrones del NADH a dicamba, una reductasa y una ferredoxina (Patente de EE. UU. 7.022.896; Herman y col., 2005). Sin embargo, la tolerancia a la dicamba de las plantas transgénicas se ha demostrado mediante la transformación con DMO sola, indicando que una reductasa y ferredoxina endógenas de la planta pueden sustituir en el lanzamiento de los electrones. La ferredoxina vegetal que está implicada en la transferencia de electrones se localiza en los plástidos. Por lo tanto, con el fin de obtener una actuación eficaz de DMO y por tanto una mejor tolerancia a dicamba, existe la necesidad de dirigir la DMO a los cloroplastos.

20 En muchos casos, este direccionamiento se puede conseguir mediante la presencia de una extensión del extremo N, llamado péptido de tránsito a cloroplastos (CTP) o péptido de tránsito a plástido. Los transgenes cromosómicas de fuentes bacterianas deben tener una secuencia que codifique una secuencia CTP fusionada con una secuencia que codifique un polipéptido expresado si el polipéptido expresado se va a compartimentar en el plástido vegetal (por ejemplo, cloroplasto). En consecuencia, la localización de un polipéptido exógeno en un cloroplasto se consigue a menudo por medio de la unión operativa de una secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia CTP a la región 5' de un polinucleótido que codifica el polipéptido exógeno. El CTP se retira en una etapa de procesamiento durante la translocalización en el plástido. La eficacia del procesamiento, sin embargo, puede estar afectada por la secuencia de aminoácidos del CTP y las secuencias cercanas del extremo NH<sub>2</sub> del péptido.

30 Weeks y col. (Patente de EE. UU. 7.022.896) describe el uso potencial de una secuencia de señal cab-m7 del maíz (véase Becker y col., 1992 y PCT WO 97/41228; N° de acceso de GenBank X53398) y una secuencia de señal de glutatión reductasa de guisante (Creissen y col., 1992 y PCT WO 97/41228) en el direccionamiento de DMO a plástidos vegetales, pero no se dan datos de la eficacia del procesamiento o el direccionamiento. También se ha utilizado un CTP de subunidad pequeña de Rubisco de guisante (RbcS) que incluye una secuencia de 27 aa que incluye la secuencia codificante para la subunidad pequeña de la enzima Rubisco de guisante para dirigir la DMO a los cloroplastos (por ejemplo, Solic. Prov. de EE. UU. Ser. N° 60/811.152). Sin embargo, se ha descubierto durante los análisis de transferencia de Western que este CTP RbcS de guisante genera una banda proteica (~ 38 kDa) de DMO procesada correctamente, pero también una banda mayor (~ 41 kDa) que se corresponde con la de la DMO y la región codificante RbcS de 27 aa. Los aminoácidos extra podrían tener un impacto adverso en la actividad de la DMO. Además, hay proteínas adicionales en un producto transgénico debido al procesamiento de DMO incompleto que crean obstáculos reguladores y necesitan esfuerzos adicionales en la caracterización del producto para fines de registro del producto por las agencias gubernamentales aumentando de esta manera el coste del registro del producto. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar CTP que generen eficazmente una DMO procesada correctamente, proporcionando de esta manera la ventaja de una actividad completa de DMO así como una caracterización del producto fácil.

### Sumario de la invención

45 Un aspecto de la invención se refiere a una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica una dicamba monooxigenasa, en el que la secuencia de ADN que codifica el péptido de tránsito al cloroplasto comprende la SEQ ID NO: 17 y en el que

La secuencia de ADN que codifica la dicamba monooxigenasa codifica un polipéptido que se selecciona de entre las SEQ ID NO: 26, 28, 32, 34, 36, y 40. En una realización particularmente preferida, la molécula de ADN recombinante codifica una dicamba monooxigenasa seleccionada de entre las SEQ ID NO: 25, 27, 31, 33, 35, 37 y 39.

50 La presente invención proporciona adicionalmente una construcción de ADN que comprende moléculas de ADN como se define anteriormente unida operativamente a un promotor. El promotor se puede seleccionar por ejemplo, de entre un promotor FMV35S, un promotor At.ANT1, un promotor FMV.35S-EF1a, un promotor eIF4A10, un promotor AGRtu.nos, un promotor triosa fosfato isomerasa citosólica (OsTPI) de arroz, un promotor del gen 15 de actina (OsAct15) de arroz, y un promotor gama coixina; y es funcional en una célula vegetal.

55 En una realización adicional la invención proporciona una célula vegetal transformada con la construcción de ADN que se ha definido anteriormente y un cultivo tisular vegetal que comprende dicha célula vegetal, en la que la célula

vegetal es una célula vegetal de monocotiledónea. En un aspecto, la célula vegetal o el cultivo tisular vegetal es una célula vegetal de maíz.

5 En una realización relacionada, la invención proporciona una planta transgénica transformada con la construcción de ADN como se ha definido anteriormente, en la que la planta es una planta monocotiledónea. De nuevo, se prefiere que la planta transgénica sea una planta de maíz.

La presente invención proporciona además procedimientos para producir una planta tolerante a la dicamba que comprende la introducción de la construcción que se ha definido anteriormente en una célula vegetal y la regeneración de la planta de la misma que comprende la construcción como se ha definido anteriormente.

10 De manera similar, la presente invención también proporciona procedimientos para expresar la dicamba monooxigenasa en una célula vegetal que comprende el cultivo de una planta que comprende una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad pequeña del péptido de tránsito al cloroplasto unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica la dicamba monooxigenasa, expresando de esta manera la dicamba monooxigenasa, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad pequeña del péptido de tránsito al cloroplasto comprende la SEQ ID NO: 17.

15 En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona una semilla tolerante a la dicamba por la provisión de protección contra la aplicación pre-germinación de dicamba que comprende un ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto unido operativamente a un ADN que codifica la dicamba monooxigenasa, en el que el ADN que codifica el péptido de tránsito al cloroplasto comprende la SEQ ID NO: 17. Se prefiere que la semilla tolerante a la dicamba codifique la dicamba monooxigenasa que comprende una secuencia que se selecciona de  
20 entre las SEQ ID NO: 26, 28, 32, 34, 36, 38, y 40.

Finalmente, la invención proporciona el uso de una planta o parte de una planta como se ha definido anteriormente o una semilla como se ha definido anteriormente para la preparación de un alimento, un pienso, fibra o un producto industrial, en el que el alimento o el pienso es el grano, harina, aceite, almidón, harina o proteína, el producto industrial es biocombustible, fibra, productos químicos industriales, un producto farmacéutico, o nutracéutico.

## 25 **Breve descripción de los dibujos**

**FIG.1.** Uso de las construcciones CTP-DMO para el procesamiento apropiado de DMO y la provisión de tolerancia a la dicamba.

## **Descripción detallada de la invención**

30 De acuerdo con la invención, se proporcionan composiciones y procedimientos para expresar y transportar polipéptidos de dicamba monooxigenasa (DMO) con una eficacia aumentada a los cloroplastos en las células vegetales. Las composiciones y procedimientos de la invención son útiles por lo tanto para aumentar la tolerancia de las plantas y células al herbicida dicamba. Dirigiendo la DMO a los cloroplastos con un péptido de tránsito al cloroplasto (CTP) en particular, se puede conseguir una expresión mejorada de DMO y la tolerancia a la dicamba.

35 Sorprendentemente, sin embargo, los presentes inventores han descubierto que ciertos CTP no funcionan bien en combinación con la DMO. Por ejemplo, algunos CTP no dan como resultado una expresión proteica adecuada. Esto puede incluir la expresión incorrecta de la proteína, con la producción de proteínas de tamaño alterado y una actividad incompleta *in vivo*. Esto puede dar como resultado la tolerancia incompleta al herbicida y complicar la aprobación regulada. La presente invención proporciona CTP que, cuando se utilizan en combinación con la DMO, proporcionan beneficios inesperados, que incluyen, pero no se limitan necesariamente a, mejores niveles de  
40 transporte a los cloroplastos, aumento de tolerancia al herbicida en las plantas transgénicas que expresan DMO, niveles deseados de expresión proteica del tamaño correcto, y modificaciones post-traduccionales apropiadas. Uno de dichos ejemplos de un CTP que proporciona beneficios inesperados cuando se combina con DMO es el péptido de tránsito CTP2, que incluye los ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 4 o 5, e incluyen secuencias que codifican las SEQ ID NO: 15 y 16. En otras realizaciones, se utiliza una secuencia codificante de un CTP de la subunidad pequeña de Rubisco de guisante (*Pisum sativum*), tal como se representa por la SEQ ID NO: 2 o que codifica la  
45 SEQ ID NO: 13. Por lo tanto, una construcción de ADN que comprende una secuencia codificante de DMO unida operativamente a una secuencia codificante de un péptido de tránsito CTP forma un aspecto de la invención, como lo hace una proteína codificada de esta manera.

50 La dicamba monooxigenasa de *Pseudomonas maltophilia* cepa DI6 (Herman y col., 2005; Publicación de patente de EE. UU. 20030115626; acceso de GenBank AY786443, la secuencia codificante de DMO de la cual se incorpora en el presente documento por referencia) cataliza la detoxificación del herbicida dicamba. La DMO es parte de un sistema de 3 componentes para la detoxificación de dicamba al ácido 3,6-diclorosalicílico (3,6-DCSA) no tóxico, y como se ha señalado anteriormente necesita las funciones de una reductasa y ferredoxina para la transferencia de electrones. Como la ferredoxina endógena de la planta que está implicada en la transferencia de electrones se  
55 localiza en los plástidos, con el fin de obtener una actividad eficaz de la DMO y por tanto la tolerancia tal como en dicotiledóneas o la tolerancia mejorada tal como en monocotiledóneas a la dicamba, la DMO se dirige preferentemente a los plástidos (por ejemplo, a los cloroplastos).

Los péptidos de tránsito al cloroplasto (CTP) se ensayaron en cuanto a su eficacia en permitir el direccionamiento y procesamiento de la DMO a los plástidos. La localización en los plástidos y el procesamiento de la DMO en conexión con estos CTP variaba de ninguna, o parcial a completa. Se descubrió que solo algunos de los CTP permitían el procesamiento completo de DMO para un tamaño correcto. La capacidad de cada CTP determinado para proporcionar un procesamiento completo y eficaz de DMO por lo tanto era impredecible y se basaba sorprendentemente en sus secuencias de proteínas o nucleótidos.

Además, se ha descubierto también en *Arabidopsis* que sin un CTP apropiado, hay muy poca o ninguna expresión de DMO lo que se correlaciona con poca o ninguna tolerancia a la dicamba. Esto sugiere que el direccionamiento al cloroplasto es importante para la detoxificación de la dicamba y por tanto para la tolerancia. Los CTP que permiten el procesamiento eficaz de la DMO serán los útiles para dirigir la DMO a los plástidos, tales como los cloroplastos, de plantas de cultivos proporcionando de esta manera la ventaja de una actividad de DMO completa y una tolerancia mayor a la dicamba así como una caracterización fácil del producto con un costo de registro reducido.

Las moléculas de ADN quiméricas que comprenden un ADN que codifica el péptido de tránsito al cloroplasto unido operativamente a un ADN que codifica la dicamba monooxigenasa se pueden preparar por procedimientos de biología molecular conocidos por los expertos en esta técnica (por ejemplo, Sambrook y col., 1989). Se proporcionan CTP unidos operativamente a moléculas de ADN conocidas que codifican la DMO, incluyendo las identificadas en la Tabla 1, por la invención para la expresión mejorada de DMO en plantas.

Se puede ensayar un péptido de tránsito al cloroplasto de cualquier gen que se codifica en el núcleo y cuyo producto dirige un polipéptido al cloroplasto en cuanto a la expresión eficaz de DMO. Las secuencias de péptido de tránsito al cloroplasto se pueden aislar o sintetizar. La secuencia de nucleótidos que codifica un CTP puede estar optimizada para la expresión en dicotiledóneas, monocotiledóneas o ambas. Los siguientes péptidos de tránsito se ensayaron uniéndolos operativamente a una secuencia codificante de DMO: CTP derivados de PsRbcS (SEQ ID NO: 1 y 2: CTP de subunidad pequeña de Rubisco de *Pisum sativum*; Coruzzi y col., 1984); CTP AtRbcS (SEQ ID NO: 3: CTP de la subunidad pequeña 1A de Rubisco de *Arabidopsis thaliana*; CTP1; Patente de EE. UU. 5.728.925); CTP AtShkG (SEQ ID NO: 4: 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Arabidopsis thaliana*; CTP2; Klee y col., 1987); CTP AtShkGZm (SEQ ID NO: 5: CTP2 sintético; con codón optimizado para la expresión en monocotiledóneas; SEQ ID NO: 14 del documento WO04009761); CTP PhShkG (SEQ ID NO: 6: EPSPS de *Petunia hybrida*; CTP4; con codón optimizado para la expresión en monocotiledóneas; Gasser y col., 1988); CTP TaWaxy (SEQ ID NO: 7; CTP sintético de almidón sintasa unido a gránulos de *Triticum aestivum*, optimizado por codón para la expresión en maíz; Clark y col., 1991); CTP OsWaxy (SEQ ID NO: 8: CTP de almidón sintasa de *Oryza sativa*; Okagaki, 1992); CTP NtRbcS (SEQ ID NO: 9: péptido de tránsito al cloroplasto de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa de *Nicotiana tabacum*; Mazur, y col., 1985); CTP ZmAS (SEQ ID NO: 10: CTP del gen de la subunidad alfa 2 de antranilato sintasa de *Zea mays*; Gardiner y col., 2004); y CTP RgAS (SEQ ID NO: 11: CTP de antranilato sintasa de *Ruta graveolens*; Bohlmann, y col., 1995). Las secuencias de nucleótidos que codifican las SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 11 se dan en las SEQ ID NO: 12- SEQ ID NO: 22, respectivamente.

Otros péptidos de tránsito que pueden ser útiles incluyen la secuencia de señal cab-m7 (Becker y col., 1992; documento PCT WO 97/41228) y la secuencia de señal de glutatión reductasa de guisante (*Pisum sativum*) (Creissen y col., 1995; documento PCT WO 97/41228). Los CTP con aminoácidos adicionales derivados de la región codificante del gen son una parte de o están fusionados con, tal como el CTP AtRbcS que incluye el péptido de tránsito, 24 aminoácidos de la proteína Rubisco madura, y después una repetición de los últimos 6 aminoácidos del péptido de tránsito, se pueden utilizar para producir DMO. El CTP ZmAS también contiene 18 aminoácidos adicionales derivados de la región codificante del gen. También se pueden utilizar otros CTP con aminoácidos adicionales (por ejemplo 27 aminoácidos) derivados de la región codificante del gen que son una parte de, tal como el CTP PsRbcS, seguido por la introducción de aminoácidos por procedimientos de clonación (por ejemplo 3 aminoácidos) para producir DMO. Los CTP con menos aminoácidos (por ejemplo 21 aminoácidos) que codifican un CTP de longitud completa tal como el CTP RgAS también se puede utilizar para producir DMO. Preferentemente se utiliza una secuencia de ácido nucleico que codifique un CTP de longitud completa. Se pueden incluir una o más adiciones o eliminaciones de nucleótidos para facilitar la clonación de un CTP. Estas adiciones o eliminaciones pueden ser antes o después de otros elementos de expresión y regiones codificantes, dando como resultado la modificación de uno o más aminoácidos codificados, por ejemplo en o cerca de un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción.

Las comparaciones de polipéptido o polinucleótidos de estas y cualquiera otra secuencia como se describe en el presente documento se pueden llevar a cabo y determinarse la identidad como se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, utilizando MEGAlign (DNASar, Inc., 1228 S. Park St., Madison, WI) con los parámetros por defecto. Dicho software hace coincidir secuencias similares asignando los grados de similitud o identidad.

Se puede dirigir la DMO a otros orgánulos tales como las mitocondrias utilizando pre-secuencias que utilizan el sistema redox de ferredoxina presente en este orgánulo. De manera alternativa, el DMO se puede dirigir a los cloroplastos y las mitocondrias con un péptido de direccionamiento dual utilizando los dos sistemas redox de ferredoxina para que funcione incluso más eficazmente. Dichos elementos se conocen por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se describen pre-secuencias mitocondriales en Silva Filho y col., (1996). Las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias peptídicas de direccionamiento dual se pueden identificar de entre los

ácidos nucleicos que codifican las siguientes proteínas que se sabe que se dirigen a cloroplastos y mitocondrias: Zn-MP (Moberg y col., 2003), glutatión reductasa (Rudhe y col., 2002; Creissen y col., 1995) e histidil-ARNt sintetasa (Akashi y col., 1998). Ejemplos de secuencias que codifican DMO que se pueden utilizar a este respecto se encuentran por ejemplo, en las secuencias que codifican los polipéptidos de las SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, como se muestra en la Tabla 1.

5

**Tabla 1. DMO y variantes de DMO utilizadas**

DMO/o variante	SEQ ID de PRT	SEQ ID de ADN	Longitud del PRT	aa previsto en la posición 2	aa previsto en la posición 3	aa previsto en la posición 112	Uso del codón
DMO-Cat(A)	24	23	340	Ala	Thr	Cys	dicot.
DMO-Cat(L)	26	25	340	Leu	Thr	Cys	dicot.
DMO-Wat(L)	28	27	340	Leu	Thr	Trp	dicot.
DMO-Cnat(A)	30	29	340	Ala	Thr	Cys	bacterias
DMO-Wat(A)	32	31	340	Ala	Thr	Trp	dicot.
DMO-Wnat(T)	34	33	339	Thr	Phc	Trp (at 111)	bacteria
DMO-Cnat(L)	36	35	340	Leu	Thr	Cys	bacteria
DMO-Wmc(L)	38	37	340	Leu	Thr	Trp	monocot.
DMO-Wmc(A)	40	39	340	Ala	Thr	Trp	monocot.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica una dicamba monooxigenasa tiene al menos un 70 % de identidad con una secuencia que codifica un polipéptido de cualquiera de las SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40, que incluye al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % y más identidad de secuencia con estas secuencias. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, o 39, que incluyen, al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % y más de identidad de secuencia con una de estas secuencias. En realizaciones adicionales, una dicamba monooxigenasa puede ser una variante de cualquiera de dichas secuencias y/o puede ser una molécula de DMO sintética, modificada, por ejemplo, como se describe en la Solic. Prov. de EE. UU. Ser. N° 60/884,854, presentada el 12 de enero de 2007, titulada "DMO Methods And Compositions", cuya divulgación completa se incorpora específicamente en el presente documento por referencia.

10

15

Se pueden preparar variantes de DMO que tengan la capacidad para degradar herbicidas tipo auxina, así como el glifosato u otros genes de tolerancia y ensayarse en cuenta a la actividad de acuerdo con procedimientos convencionales. Dichas secuencias también se pueden identificar por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, a partir de organismos adecuados que incluyen bacterias que degradan los herbicidas tipos auxina, tales como la dicamba, u otros herbicidas (Patente de EE. UU. 5.445.962; Cork y Krueger, 1991; Cork y Khalil, 1995). Un medio de aislamiento de una DMO u otra secuencia es por hibridación de ácido nucleico, por ejemplo, para una biblioteca construida a partir del organismo fuente, o por RT-PCR utilizando el ARNm del organismo fuente y cebadores basados en las desaturadas desveladas. La invención por lo tanto engloba el uso de la hibridación de ácidos nucleicos en condiciones rigurosas con una secuencia que codifica DMO descrita en el presente documento. Un experto en la técnica entiende que las condiciones pueden hacerse menos rigurosas aumentando la concentración de sal y disminuyendo la temperatura. Por lo tanto, las condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente, y por lo tanto será generalmente un procedimiento de elección dependiendo de los resultados deseados. Un ejemplo de condiciones de alta rigurosidad son 5x SSC, 50 % de formamida y 42 °C. Llevando a cabo un lavado bajo dichas condiciones, por ejemplo, durante 10 minutos, las secuencias que no se hibridan a una secuencia diana particular en estas condiciones se pueden eliminar.

25

30

Las variantes también se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo, utilizando las secuencias de polinucleótidos de DMO conocidas de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN se pueden sintetizar por química fosforoamidita en un sintetizador de ADN automático. La síntesis química tiene varias desventajas. En particular, la síntesis química es deseable porque se pueden utilizar codones preferidos por el huésped en el que se expresará la secuencia de ADN para optimizar la expresión. No es necesario que se alteren todos los codones para obtener una expresión mejorada, pero preferentemente al menos los codones que se utilizan raramente en el huésped se cambian por codones preferidos para el huésped. Se pueden obtener altos niveles de expresión cambiando más de aproximadamente el 50 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, de los codones por codones preferidos por el huésped. Las preferencias de codón de muchas células huésped se conocen (por ejemplo, documentos PCT WO 97/31115; PCT WO 97/11086; EP 646643; EP 553494; y Patentes de EE. UU. N° 5.689.052; 5.567.862; 5.567.600; 5.552.299 y 5.017.692). Las preferencias de codón de otras células huésped se pueden deducir por procedimientos bien conocidos en la técnica. También, se puede cambiar fácilmente, utilizando síntesis química, la secuencia de la molécula de ADN o su proteína codificada para, por ejemplo, optimizar la expresión (por ejemplo, eliminando estructuras de ARNm secundarias que interfieren con la transcripción o la traducción), añadiendo sitios de restricción únicos en puntos convenientes, y eliminando sitios de escisión de proteasas.

Se pueden hacer modificaciones y cambios en la secuencia polipeptídica de una proteína tal como las secuencias de DMO que se proporcionan en el presente documento mientras que mantienen o se modifica la actividad enzimática, según se desee. Los procedimientos ilustrativos para generar secuencia de DMO se proporcionan en la Solic. Prov. de EE. UU. Ser. N° 60/884,854, presentada el 12 de enero de 2007. Los siguiente es una exposición basándose en el cambio de aminoácidos de una proteína para crear un equivalente, o incluso un polipéptido modificado, mejorado y las correspondientes secuencias codificantes. Se sabe, por ejemplo, que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos en una estructura proteica sin una pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como sitios de unión o moléculas de sustrato. Como es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, se pueden hacer sustituciones de ciertas secuencias de aminoácidos en una secuencia proteica, y, por supuesto, su secuencia codificante de ADN en la que se basa, y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares. Por lo tanto se contempla que se pueden hacer distintos cambios en las secuencias peptídicas de DMO descritas en el presente documento u otros polipéptidos de tolerancia a herbicidas y de las secuencias de ADN codificantes sin una pérdida apreciable de su utilizada o actividad biológica.

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

Se sabe en la técnica que los aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tengan un índice hidropático o puntuación similar es y sigue dando como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, se sigue obteniendo una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al hacer dichos cambios, la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están en 62 se prefieren, los que están en 61 se prefieren particularmente, y los que están en 60,5 son incluso más particularmente preferidos.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede hacer eficazmente basándose en la hidrofilia. La patente de EE. UU. 4.554.101 establece que el mayor promedio local de hidrofilia de una proteína, como se dirige por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la patente de EE. UU. 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a los restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 6 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tenga un valor de hidrofilia similar y seguir obteniendo una proteína biológicamente equivalente. En dichos cambios, la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están en 62 se prefieren, los que están en 61 son particularmente preferidos, y los que están en 60,5 incluso son más particularmente preferidos. Las sustituciones ejemplares que tienen en cuenta estas y varias de las características anteriores son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Una construcción de ADN que comprende una secuencia de CTP unida operativamente a una secuencia DMO se puede expresar en un sistema de ensayo tal como los protoplastos, células vegetales transformadas transitoria o establemente uniéndola operativamente a un promotor funcional en plantas. Los ejemplos que describen dichos promotores incluyen Patente de EE. UU. 6.437.217 (promotor RS81 de maíz), Patente de EE. UU. 5.641.876 (promotor actina de arroz; OsAct1), Patente de EE. UU. 6.426.446 (promotor RS324 de maíz), Patente de EE. UU.

6.429.362 (promotor PR-1 de maíz), Patente de EE. UU. 6.232.526 (promotor A3 de maíz), Patente de EE. UU. 6.177.611 (promotores constitutivos de maíz), Patentes de EE. UU. 5.322.938, 5.352.605, 5.359.142 y 5.530.196 (promotor 35S), Patente de EE. UU. 6.433.252 (promotor L3 de oleosina de maíz), Patente de EE. UU. 6.429.357 (promotor actina 2 de raíz así como el intrón 2 de actina de arroz), Patente de EE. UU. 5.837.848 (promotor específico de la raíz), Patente de EE. UU. 6.294.714 (promotores inducibles por la luz), Patente de EE. UU. 6.140.078 (promotores inducibles por sal), Patente de EE. UU. 6.252.138 (promotores inducibles por agentes patógenos), Patente de EE. UU. 6.175.060 (promotores inducibles por deficiencia de fósforo), Patente de EE. UU. 6.388.170 (por ejemplo, el promotor PC1SV), el promotor PC1SV de SEQ ID NO: 41, Patente de EE. UU. 6.635.806 (promotor de gamma-coixina), y Patente de EE. UU. No. 7.151.204 (promotor de aldolasa de cloroplastos de maíz).

5 Promotores adicionales que pueden ser útiles son el promotor de nopalina sintasa (NOS) (Ebert y col., 1987), el promotor octopina sintasa (OCS) (que se transporta sobre plásmidos que inducen tumor de *Agrobacterium tumefaciens*), promotores caulimovirus tales como el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Lawton y col., 1987), el promotor 35S de CaMV (Odell y col., 1985), el promotor 35S del virus del mosaico de escrofularia (Walker y col., 1987), el promotor de sacarosa sintasa (Yang y col., 1990), el promotor del complejo del gen R (Chandler y col., 1989), y el promotor del gen de unión a/b de clorofila, etc. En la presente invención, son particularmente beneficiosos, el promotor CaMV35S con secuencias amplificadoras (e35S; Patentes de EE. UU. N° 5.322.938; 5.352.605; 5.359.142; y 5.530.196), FMV35S (Patentes de EE. UU. 6.051.753; 5.378.619), caulimovirus de estrías cloróticas del maní (PC1SV; Patente de EE. UU. 5.850.019), At.Act 7 (n° de acceso U27811), At.ANT1 (Solicitud de Patente de EE. UU. 20060236420), FMV.35S-EF1a (Solicitud de Patente de EE. UU. 20050022261), eIF4A10 (n° de acceso X79008) y AGRtu.nos (Acceso del GenBank V00087; Depicker y col., 1982; Bevan y col., 1983), triosa fosfato isomerasa citosólica del arroz (OsTPI; Patente de EE. UU. N° 7.132.528), y gen 15 de actina del arroz (OsAct15); Solicitud de Patente de EE. UU. 2006-0162010).

Una 5' UTR que funciona como una secuencia líder de la traducción es un elemento genético de ADN que se localiza entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificante se puede incluir entre un promotor y la secuencia CTP-DMO. La secuencia líder de traducción está presente en el ARNm totalmente procesado corriente arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de traducción puede afectar el procesamiento del a transcripción primaria a ARNm, la estabilidad de ARNm o la eficacia de la traducción. Ejemplos de secuencias líder de traducción incluyen las líderes de proteína de choque térmico de petunia y maíz (Patente de EE. UU. N° 5.362.865), líderes de proteínas de revestimiento de virus de plantas, líderes de Rubisco de plantas, GmHsp (Patente de EE. UU. 5.659.122), PhDnaK (Patente de EE. UU. 5.362.865), AtAnt1, TEV (Carrington y Freed, 1990), y AGRtunos (Acceso del GenBank V00087; Bevan y col., 1983) entre otras. (Turner y Foster, 1995). En la presente invención, las 5' UTR que son beneficiosas en particular son GmHsp (Patente de EE. UU. 5.659.122), PhDnaK (Patente de EE. UU. 5.362.865), AtAnt1, TEV (Carrington y Freed, 1990), OsAct1 (Patente de EE. UU. 5.641.876), OsTPI (Patente de EE. UU. N° 7.132.528), OsAct15 (Publicación US 20060162010), y AGRtunos (Acceso del GenBank V00087; Bevan y col., 1983).

La secuencia 3' no traducida, región de terminación de la transcripción 3', o la región de poliadenilación significa una molécula de ADN unida y localizada corriente abajo de una molécula de polinucleótido estructural e incluye los polinucleótidos que proporcionan la señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción, el procesamiento del ARNm o la expresión genética. Las funciones del a señal de adenilación en las plantas para producir la adición de nucleótidos poliadenilados al extremo 3' del precursor del ARNm. La secuencia de poliadenilación se puede derivar del gen natural, a partir de una variedad de genes de plantas, o de los genes T-ADN. Estas secuencias se pueden incluir corriente abajo de una secuencia CTP-DMO. Un ejemplo de región 3' de terminación de la transcripción es la región 3' de la nopalina sintasa (nos 3'; Fraley y col., 1983). El uso de diferentes regiones 3' no traducidas se ejemplifica (Ingelbrecht y col., 1989). Las moléculas de poliadenilación de un gen RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi y col., 1984), AGRtu.nos (Acceso del Genbank E01312), E6 (Acceso n° U30508), y TaHsp17 (gen de la proteína del choque térmico de bajo peso molecular del trigo; Acceso n° X13431) en particular pueden ser beneficiosos para su uso en la invención.

Además de los elementos de expresión descritos anteriormente, puede ser necesario un intrón entre un promotor y una 3' UTR para expresar una región codificante, especialmente en monocotiledóneas. Un "intrón" se refiere a una molécula de polinucleótido que se puede aislar o identificar a partir de una secuencia que interviene de una copia genómica de un gen y se puede definir en general como una región que se corta durante el procesamiento del ARNm antes de la traducción. De manera alternativa, los intrones se pueden producir sintéticamente. Los intrones pueden contener ellos mismos sub-elementos tales como elementos cis o dominios amplificadores que efectúan la transcripción de genes unidos operativamente. Un "intrón de plantas" es un intrón nativo o no nativo que es funcional en células vegetales. Un intrón de plantas se puede utilizar como un elemento regulador para la modulación de la expresión de un gen o genes unidos operativamente. Una secuencia de una molécula de polinucleótidos en una construcción de transformación puede comprender intrones. Los intrones pueden ser heterólogos con respecto a la secuencia de la molécula de polinucleótido transcribible. Ejemplos de intrones incluyen el intrón de actina del maíz (Patente de EE. UU. 5.641.876), el intrón HSP70 de maíz (ZmHSP70; Patente de EE. UU. 5.859.347; Patente de EE. UU. 5.424.412), y el intrón TPI del arroz (OsTPI; Patente de EE. UU. N° 7.132.528) y son beneficiosos en la práctica de la invención.

Las construcciones CTP-DMO se pueden ensayar para proporcionar un procesamiento apropiado de DMO en un sistema de ensayo tal como protoplastos, o células vegetales transformadas transitoria o establemente de

monocotiledóneas o dicotiledóneas por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica del cultivo y transformación de tejidos vegetales. Cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica para la introducción de construcciones transgénicas en plantas se puede utilizar de acuerdo con la invención (véase, por ejemplo, Miki y col., 1993). Se cree que los procedimientos adecuados para la transformación de plantas incluyen virtualmente cualquier procedimiento por el que se puede introducir un ADN en una célula, tal como por electroporación como se ilustra en la Patente de EE. UU. N° 5.384.253; bombardeo de microproyectiles como se ilustra en las Patentes de EE. UU. N° 5.015.580; 5.550.318; 5.538.880; 6.160.208; 6.399.861; y 6.403.865; transformación mediada por *Agrobacterium* como se ilustra en las Patentes de EE. UU. N° 5.635.055; 5.824.877; 5.591.616; 5.981.840; y 6.384.301; y transformación de protoplastos como se ilustra en la Patente de EE. UU. N° 5.508.184. Mediante la aplicación de técnicas tal como estas, las células de virtualmente cualquier especie de planta se pueden transformar establemente, y estas células pueden desarrollarse en plantas transgénicas. Las técnicas que pueden ser particularmente útiles en el contexto de la transformación de algodón como se desvela en las Patentes de EE. UU. N° 5.846.797, 5.159.135, 5.004.863, y 6.624.344. Las técnicas para la transformación de plantas de Brassica se desvelan en particular, por ejemplo en la Patente de EE. UU. 5.750.871; y las técnicas para transformar la soja se desvelan, por ejemplo, en Zhang y col., 1999, Patente de EE. UU. 6.384.301, y documento US 7.002.058. Las técnicas para transformar el maíz se desvelan en el documento WO9506722. Algunos ejemplos no limitantes de plantas que pueden ser útiles en la invención incluyen alfalfa, cebada, judías, remolacha, brócoli, calabaza, zanahoria, canola, coliflor, apio, calabaza china, maíz, algodón, pepino, judía seca, berenjena, hinojo, judías, calabaza, puerro, lechuga, melón, avena, oca, cebolla, guisante, pimienta, calabaza, maní, patata, calabaza, rábano, arroz, sorgo, soja, espinacas, calabacín, maíz dulce, remolacha azucarera, girasol, tomate, sandía y trigo.

Después de efectuar el suministro del ADN exógeno a las células receptoras, las próximas etapas de la generación de plantas transgénicas generalmente conciernen a la identificación de las células transformadas para el cultivo posterior y la regeneración de la planta. Con el fin de mejorar la capacidad para identificar transformantes, se puede desear emplear un gen marcador que se puede seleccionar o explorar con un vector de transformación preparado de acuerdo con la invención. En este caso, se ensayaría entonces en general la población celular potencialmente transformada exponiendo las células a un agente o agentes selectivos, o uno exploraría las células por el gen rasgo genético marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición del agente selectivo, o las células que se han valorado como positivas en el ensayo de exploración, se pueden cultivar en un medio que sustenta la regeneración de plantas. Cualquier medio de cultivo tisular de plantas adecuado, por ejemplo, los medios MS o N6 (Murashige y Skoog, 1962; Chu y col., 1975); se puede modificar incluyendo sustancias adicionales tales como reguladores del crecimiento. El tejido se puede mantener en un medio básico con reguladores de crecimiento hasta que haya tejido suficiente disponible para comenzar los esfuerzos de regeneración de plantas, o siguiendo rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración, normalmente al menos 2 semanas, entonces se transfiere a un medio propicio para la formación de brotes. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se produce una formación de brotes suficiente. Una vez que se forman los brotes, se transfieren a un medio propicio para la formación de raíces. Una vez que se han formado suficientes raíces, las plantas se pueden transferir al suelo para el cultivo y maduración posteriores.

Para confirmar la presencia del ADN exógeno o "transgenes" en las plantas de regeneración, se pueden llevar a cabo una variedad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de "biología molecular", tales como transferencia de Southern o Northern y PCT™; ensayos "bioquímicos", tal como la detección de un producto proteico, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y transferencia de Western) o por la función enzimática; ensayos con partes de plantas, tal como ensayos con hojas o raíces; y también, analizando el fenotipo de la planta regenerada completa.

Una vez que se ha introducido un transgén en una planta, ese gen se puede introducir en cualquier planta sexualmente compatible con la primera planta por cruzamiento, sin necesidad de transformar directamente la segunda planta. Por lo tanto, como se utiliza en el presente documento, el término "progenie" denota los descendientes de cualquier generación de una planta parental preparada de acuerdo con la presente invención, en la que la progenie comprende una construcción de ADN seleccionada que se prepara de acuerdo con la invención. Una "planta transgénica" puede por lo tanto ser de cualquier generación. El "cruzamiento" de una planta para proporcionar una línea de plantas que tenga uno o más transgenes o alelos añadidos respecto con una línea de plantas de partida, como se desvela en el presente documento, se define como las técnicas que dan como resultado una secuencia particular que se va a introducir en una línea de plantas cruzando una línea de partida con una línea de plantas donantes que comprende un transgén o alelo de la invención. Para conseguir esto se podría, por ejemplo, llevara cabo las siguientes etapas: (a) se siembran semillas de la primera (línea de partida) y segunda (línea de planta donante que comprende un transgén o alelo deseado) plantas parentales; (b) cultivar las semillas de la primera y segunda plantas parentales en plantas que den flores; (c) polinizar una flor de la primera planta parental con polen de la segunda planta parental; y (d) recolectar las semillas producidas por la planta parental que albergaba la flor fertilizada.

Los tejidos de planta y plantas transformadas establemente se pueden ensayar en cuanto a la provisión de tolerancia a la dicamba por el correcto procesamiento de proteína DMO. La provisión de tolerancia a la dicamba en una planta de cultivo se puede utilizar para diseñar un procedimiento para controlar el crecimiento de malas hierbas



en un ambiente de cultivo que comprende la aplicación al medio ambiente en que crece el cultivo de una cantidad de herbicida dicamba eficaz para el control del crecimiento de malas hierbas. El herbicida dicamba se aplica por encima del ambiente de crecimiento del cultivo en una cantidad que no dañe la planta o semilla de cultivo transformada con una construcción CTP-DMO y que dañe una planta de cultivo del mismo genotipo que carezca de la construcción CTP-DMO.

La preparación de composiciones de herbicida para su uso en conexión con la invención actual será evidente para los expertos en la técnica en vista de la divulgación. Dichas composiciones, que están disponibles en el mercado, incluirán normalmente, además del principio activo, componentes tales como tensioactivos, vehículos sólidos o líquidos, disolventes y aglutinantes. Ejemplos de tensioactivos que se pueden utilizar para la aplicación a las plantas incluyen sales alcalimetálicas, metálicas alcalinotérricas o de amonio de ácidos sulfónicos aromáticos, por ejemplo ácido lingo-, fenol-, naftaleno- y dibutilnaftaleno-sulfónico, y de ácidos grasos de arilsulfonatos, de alquil éteres, de lauril éteres, de sulfatos alcohol grasos y de glicol alcohol graso, condensados de naftaleno sulfonado y sus derivados con formaldehído, condensados de naftaleno o de ácido naftaleno sulfónico con fenol y formaldehído, condensados de fenol o ácido fenol sulfónico con formaldehído, condensados de fenol con formaldehído y sulfito sódico, polioxietileno octilfenil éter, isoocil, octil, o nonil-fenol etoxilado, tributilfenil poliglicol éter, alquilaril polieter alcoholes, alcohol isotridecílico, aceite de ricino etoxilado, triarilfenoles etoxilados, sales de triarilfenoletoxilados fosfatadas, lauril alcohol poliglicol éter acetato, ésteres de sorbitol, líquidos de desecho de sulfito de lignina o metilcelulosa, o mezclas de estos. Una práctica común en el caso del uso de surfactante es aproximadamente del 0,25 % a 1,0 % por peso, y más comúnmente aproximadamente 0,25 % a 0,5 % por peso.

Las composiciones para aplicación en plantas pueden ser sólidas o líquidas. Cuando se utilizan composiciones sólidas puede desearse incluir uno o más materiales de vehículo con el principio activo. Ejemplos de vehículos incluyen tierras minerales tales como sílices, geles de sílice, silicatos, talco, caolín, arcilla, caliza, creta, loess, arcilla, dolomita, tierra de diatomeas, sulfato cálcico, sulfato magnésico, materiales de tierra sintética, fertilizantes tales como sulfato amónico, fosfato amónico, nitrato amónico, tiourea y urea, productos de origen vegetal tales como harinas de cereales, serrín de corteza de árboles, serrín, celulosa en polvo, atapulgitas, montmorilonitas, mica, vermiculitas, sílices sintéticos y silicatos de calcio sintéticos, o mezclas de estos.

Para las soluciones líquidas, se pueden incluir compuestos hidrosolubles o sales, tales como sulfato sódico, sulfato potásico, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, sulfato hidrógeno amónico, cloruro amónico, acetato amónico, formato amónico, oxalato amónico, carbonato hidrógeno amónico, tiosulfato amónico, difosfato hidrógeno amónico, monofosfato dihidrógeno amónico, fosfato hidrógeno sódico amónico, tiocianato amónico, sulfamato amónico o carbamato amónico.

Otros componentes ejemplares en las composiciones herbicidas incluyen aglutinantes tales como polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo parcialmente hidrolizado, carboximetilcelulosa, almidón, copolímeros de vinilpirrolidona/acetato de vinilo y acetato de polivinilo, o mezclas de estos; lubricantes tales como el estearato magnésico, estearato sódico, talco o polietilenglicol, o mezclas de estos; antiespumantes tales como emulsiones de silicona, alcoholes de cadena larga, ésteres fosfóricos, dioles de acetileno, ácidos grasos o compuestos organofluorados, y agentes quelantes tales como: sales del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sales del ácido trinitrilotriacético o sales de ácidos polifosfóricos, o mezclas de estos.

Se puede utilizar la dicamba desde aproximadamente 2,5 g/Ha a aproximadamente 10.080 g/Ha, incluyendo aproximadamente 2,5 g/Ha a aproximadamente 5.040 g/Ha, aproximadamente 5 g/Ha a aproximadamente 2.020 g/Ha, aproximadamente 10 g/Ha a aproximadamente 820 g/Ha y aproximadamente 50 g/Ha a aproximadamente 1.000 g/Ha, aproximadamente 100 g/Ha a aproximadamente 800 g/Ha y aproximadamente 250 g/Ha a aproximadamente 800 g/Ha.

Las construcciones CTP-DMO se pueden unir a una o más moléculas de polinucleótidos que contienen elementos genéticos para un marcador explorable/valorable/seleccionable y/o un gen que confiera otro rasgo deseado. Los genes que se utilizan comúnmente para explorar las presuntas células transformadas incluyen la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS),  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, y cloranfenicol acetiltransferasa (Jefferson, 1987; Teeri y col., 1989; Koncz y col., 1987; De Block y col., 1984), proteína fluorescente verde (GFP) (Chalfie y col., 1994; Haseloff y Amos, 1995; y Solicitud PCT WO 97/41228). Se describen ejemplos no limitantes de genes marcadores genéticos en, por ejemplo, Miki y McHugh, 2004.

La molécula de nucleótidos que confiere otro rasgo deseado puede incluir pero no se limita a, un gen que proporciona una característica deseable asociada con la morfología, fisiología, crecimiento y desarrollo, rendimiento, aumento nutricional, resistencia a enfermedades y plagas, o tolerancia ambiental o química de las plantas y puede incluir elementos genéticos que comprenden resistencia a herbicidas (Patentes de EE. UU. 6.803.501; 6.448.476; 6.248.876; 6.225.114; 6.107.549; 5.866.775; 5.804.425; 5.633.435; 5.463.175), aumento de rendimiento (Patentes de EE. UU. RE38.446; 6.716.474; 6.663.906; 6.476.295; 6.441.277; 6.423.828; 6.399.330; 6.372.211; 6.235.971; 6.222.098; 5.716.837), control de insectos (Patentes de EE. UU. 6.809.078; 6.713.063; 6.686.452; 6.657.046; 6.645.497; 6.642.030; 6.639.054; 6.620.988; 6.593.293; 6.555.655; 6.538.109; 6.537.756; 6.521.442; 6.501.009; 6.468.523; 6.326.351; 6.313.378; 6.284.949; 6.281.016; 6.248.536; 6.242.241; 6.221.649; 6.177.615; 6.156.573; 6.153.814; 6.110.464; 6.093.695; 6.063.756; 6.063.597; 6.023.013; 5.959.091; 5.942.664; 5.942.658. 5.880.275;

5.763.245; 5.763.241), resistencia a enfermedades fúngicas (Patentes de EE. UU. 6.653.280; 6.573.361; 6.506.962; 6.316.407; 6.215.048; 5.516.671; 5.773.696; 6.121.436; 6.316.407; 6.506.962), resistencia a virus (Patentes de EE. UU. 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; 5.304.730), resistencia a parásitos (Patente de EE. UU. 6.228.992), resistencia a enfermedades bacterianas (Patente de EE. UU. 5.516.671), crecimiento y desarrollo de la planta (Patentes de EE. UU. 6.723.897; 6.518.488), producción de almidón (Patentes de EE. UU. 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; 6.476.295), producción de aceite modificada (Patentes de EE. UU. 6.444.876; 6.426.447; 6.380.462), alta producción de aceites (Patentes de EE. UU. 6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; 6.476.295), contenido modificado de ácidos grasos (Patentes de EE. UU. 6.828.475; 6.822.141; 6.770.465; 6.706.950; 6.660.849; 6.596.538; 6.589.767; 6.537.750; 6.489.461; 6.459.018), alta producción proteica (Patente de EE. UU. 6.380.466), maduración de frutos (Patente de EE. UU. 5.512.466), aumento de nutrición animal y humana (Patentes de EE. UU. 6.723.837; 6.653.530; 6.5412.59; 5.985.605; 6.171.640), biopolímeros (Patentes de EE. UU. RE37.543; 6.228.623; 5.958.745 y Publicación de Patente de EE. UU. N° US20030028917), resistencia a estrés ambiental (Patente de EE. UU. 6.072.103), péptidos farmacéuticos y péptidos secretables (Patentes de EE. UU. 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; 6.080.560), rasgos de procesamiento mejorado (Patente de EE. UU. 6.476.295), digestibilidad mejorada (Patente de EE. UU. 6.531.648) refinosa baja (Patente de EE. UU. 6.166.292), producción industrial de enzimas (Patente de EE. UU. 5.543.576), sabor mejorado (Patente de EE. UU. 6.011.199), fijación de nitrógeno (Patente de EE. UU. 5.229.114), producción de semillas híbridas (Patente de EE. UU. 5.689.041), producción de fibras (Patente de EE. UU. 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; 5.869.720) y producción de biocombustible (Patente de EE. UU. 5.998.700). Cualquiera de estos u otros elementos genéticos, procedimientos y transgenes se pueden utilizar en la invención como apreciarán los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación.

De manera alterativa, la una o más moléculas de polinucleótido unidas a la construcción CTP-DMO pueden afectar la característica o fenotipo de la planta mencionada anteriormente codificando una molécula de ARN que produce la inhibición dirigida de la expresión de un gen endógeno, por ejemplo, mediante un ARN inhibidor (ARNi) antisentido, o mecanismos mediados por co-supresión. El ARN podría ser una molécula de ARN catalítica (es decir, una ribozima) modificada para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Por lo tanto, puede ser útil cualquier molécula de polinucleótido que codifique una molécula de ARN que afecta el fenotipo o cambia la morfología de interés.

La presente invención también desvela un procedimiento para la producción de alimento, pienso, o un producto industrial que comprende una planta que contiene una construcción CTP-DMO o una parte de dicha planta y preparar el alimento, pienso, fibra, o producto industrial de la planta o parte de la misma, en el que el alimento o pienso es un grano, harina, aceite, almidón, harina o proteína y el producto industrial es biocombustible, fibra, productos químicos industriales, un producto farmacéutico, o un nutracéutico.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar las realizaciones de la invención.

#### Ejemplo 1

##### Preparación de construcciones CTP-DMO para la transformación

Las construcciones de ADN como se muestran en la Tabla 2 se prepararon de acuerdo con procedimientos convencionales (por ejemplo, Sambrook y col., 1989), que comprenden un CTP unido operativamente a un gen DMO, o una variante del mismo, entre un promotor de plantas y una secuencia de señal de poliadenilación. Estas construcciones se ensayaron en un sistema de protoplastos de maíz o en plantas de *Arabidopsis* o soja transformadas como se describe posteriormente.

Tabla 1. Procesamiento de DMO y variantes de DMO por CTP diferentes

pMON	Promotor	CTP	SEQ ID PRT	SEQ ID ADN	Versión DMO	3' UTR	Sistema de ensayo	Nº de bandas	Tamaño de banda (banda 1/ banda 2)	% de expresión total (banda 1/banda 2)
84254	PCISV	PsRbcS CTP con región codificante	1	12	DMOc-nativa (A)	RbcS2-E9	Hoja de soja	2	41 kDa/38 kDa	10/90
58498	PCISV	PsRbcS CTP con región codificante	1	12	DMOc-nativa (A)	RbcS2-E9	Hoja de soja	2	41 kDa/38 kDa	50/50
73749	PCISV	PsRbcS CTP con región codificante	1	12	DMOc-dc(A)	E6	Hoja de Arabidopsis	2	41 kDa/38 kDa	50/50
73725	PCISV	PsRbcSCTP sin región codificante	2	13	DMOw-dc(A)	Nos	Hoja de Arabidopsis		38 kDa	100
73728	PCISV	PsRbcSCTP sin región codificante	2	13	DMOw-dc(L)	Nos	Hoja de Arabidopsis		38 kDa	100
73729	PCISV	AiRbcSCTP(CTP 1)	3	14	DMOw-dc(A)	Nos	Protoplastos de maiz		>41 kDa	100
73708	PCISV	AiRbcSCTP(CTP 1)	3	14	DMOw-mc(L)	Hsp17	Protoplastos de maiz		>41 kDa	100
73698	FMV 35S	AiRbcSCTP(CTP 1)	3	14	DMOc-dc(L)	RbcS2-E9	Hoja de Arabidopsis		>41 kDa	100
73731	CaMV 35S-amp	AiShkG CTP (CTP 2)	4	15	DMOw-mc(L)	Hsp17	Protoplastos de maiz		~38 kDa	100
73740	PCISV	AiShkG CTP (CTP 2)	4	15	DMOc-nativa (L)	Nos	Protoplastos de maiz		~38 kDa	100
73713	PCISV	AiShkG CTP (CTP 2 sintético)	5	16	DMOw-mc(L)	Hsp17	Protoplastos de maiz		~38 kDa	100
73742	PCISV	AiShkG CTP (CTP 2 sintético)	5	16	DMOc-nativa (L)	Hsp17	Protoplastos de maiz		~38 kDa	100

(continuación)

pMON	Promotor	CTP	SEQ ID PRT	SEQ ID ADN	Versión de DMO	3' UTR	Sistema de ensayo	Nº de Bandas	Tamaño de banda (banda 1/ banda 2)	% expresión total (banda 1/banda 2)
73724	PCISV	AtShkG CTP (CTP2 sintético)	5	16	DMOw-dc(A)	Nos	Hoja de Arabidopsis	1	~38 kDa	100
73727	PCISV	AtShkG CTP (CTP2 sintético)	5	16	DMOw-dc(L)	Nos	Hoja de Arabidopsis	2	>38 kDa/ ~38 kDa	50/50
73736	CaMV 35S-aum	PhShkG CTP (CTP4 sintético)	6	17	DMOw-mc(L)	Hsp17	Protoplastos de maiz	1	~38 kDa	100
73747	PCISV	PhShkG CTP (CTP4 sintético)	6	17	DMOw-mc(L)	Hsp17	Protoplastos de maiz	1	~38 kDa	100
73714	PCISV	TaWaxy CTP sintético	7	18	DMOw-mc(L)	Hsp17	Protoplastos de maiz	0	.	.
73716	PCISV	TaWaxy CTP sintético	7	18	DMOw-mc(L)	Hsp17	Protoplastos de maiz	0	.	.
73733	CaMV 35S-aum	OsWaxy CTP	8	19	DMOw-mc(L)	Hsp17	Protoplastos de maiz	1	<38 kDa	100
73734	CaMV 35S-aum	NIRtcS CTP	9	20	DMOw-mc(L)	Hsp17	Protoplastos de maiz	2	>41 kDa/ 38 kDa	75/25
73732	CaMV 35S-aum	ZmAS CTP	10	21	DMOw-mc(L)	Hsp17	Protoplastos de maiz	1	>38 kDa	100
73735	CaMV 35S-aum	RgAS CTP	11	22	DMOw-mc(L)	Hsp17	Protoplastos de maiz	1	>38 kDa	100

**Ejemplo 2****Análisis de construcciones CTP-DMO en protoplastos de maíz**

Los protoplastos de la hoja del maíz se prepararon a partir de plántulas etioladas de 12 días de edad (de un cruzamiento de LH200 x LH5). Se cortaron las partes medias de las hojas secundarias (de aproximadamente 6 cm de longitud) en tiras de 0,5 mm con una cuchilla de afeitar y se digirieron en un matraz en una solución enzimática que contenía un 2 % (p/v) de celulasa RS, un 0,3 % (p/v) de macerozyme R10 (ambos de Karlan Research Products Corp, Santa Rosa, CA), 0,6 M de manitol, 10 mM de MES (pH 5,7) y 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, durante no más de 2 h a 23 °C después de 30 minutos de infiltración al vacío. Los protoplastos del tejido foliar infiltrado y digerido se liberaron agitando el matraz a mano durante 5 min y se separaron por filtración a través de una malla de nilón de 60 µm. Los protoplastos se recolectaron por centrifugación a 150 g durante 2 min, se lavaron en una solución de manitol 0,6 M fría una vez, se centrifugó y se re-suspendió a  $2 \times 10^6$ /ml en manitol 0,6 M frío. Entonces se transformaron los protoplastos con 12,5 µg de ADN utilizando polietilenglicol (PEG) y se incubaron a temperatura ambiente durante 16 a 20 h.

Los protoplastos se almacenaron a -80 °C hasta el análisis por transferencia de western. Los protoplastos se descongelaron en hielo y se añadieron 1-3 volúmenes de 2x de tampón/colorante de muestra de Laemmli (BioRad) con un 5,0 % de β-ME a los protoplastos. Se calentaron entonces alícuotas de las muestras proteicas de protoplasto hasta aproximadamente 100 °C durante 5 minutos y se cargaron en un gel prefabricado Tris-HCl con un 10 % de poli(acrilamida). Se llevó a cabo la electroforesis con una corriente constante de aproximadamente 80-100 Amp durante aproximadamente 35 minutos. La proteína del gel se electro-transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 micrómetros durante 1-3 horas a un voltaje constante de 100 V. La membrana se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C con un 5 % (p/v) de leche en polvo en TBST. La membrana se hibridó con una dilución 1:200 de anticuerpo de cabra anti-DMO en TBST durante una hora. Se retiró el exceso de anticuerpo utilizando tres lavados de 5 min con TBS. La membrana se hibridó con IgG anti-cabra de conejo conjugada con peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO) a una dilución de 1:7.500 en un 0,5 % (p/v) de leche en polvo en TBST durante una hora. Se retiró el exceso de anticuerpo utilizando tres lavados de 5 min con TBS. Todos los procedimientos, incluyendo el bloqueo, y todas las otras incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, excepto cuando se señale. Se visualizaron las bandas inmunorreactivas utilizando el sistema de detección ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se expuso a una película Kodak BioMax™ MS La presencia de bandas inmunorreactivas de tamaño apropiado indica el procesamiento apropiado y la localización de DMO (Tabla 1). Por lo tanto, por ejemplo, el uso de CTP4 unido operativamente a DMO y transformados en protoplastos de maíz da como resultado una banda inmunorreactiva de 38 kDa siguiendo el análisis de transferencia de Western.

**Ejemplo 3****Ensayo de distintas construcciones CTP-DMO en *Arabidopsis***

Se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia de acuerdo con el procedimiento desarrollado por Clough y Bent (1998). Las semillas obtenidas mediante este procedimiento se colocaron en placas en un medio de selección de cultivo de plantas que contenía dicamba a distintas concentraciones desde 0,5, 1,0 a 2,0 o 4,0 mg/litro. Las placas se incubaron durante 48 horas a 4 °C y entonces se transfirieron a un equipo de incubación Percival a 23,5 °C con un fotoperiodo de 15 horas. Las semillas que se transformaron con las construcciones CTP-DMO crecieron en plantas en el medio que contenía dicamba y desarrollaron hojas primarias y secundarias, mientras que las semillas no transformadas y los segregantes negativos o morían o no desarrollaban hojas primarias ni secundarias. Las plantas transgénicas que se ensayaban positivas a 3' UTR por el ensayo PCR Invader® se utilizaron posteriormente para los análisis.

De tres a cinco perforaciones de las hojas de las plantas de *Arabidopsis* transgénicas se utilizaron para el análisis de transferencia de Western. Se llevó a cabo la extracción proteica con 500-1000 µl de PBST y 4 perlas de cristal en un agitador Harbil Paint durante 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos a 4 °C. Se añadió un volumen igual de 2 x de tampón/colorante de muestra de Laemmli (N° de catálogo 161-0737 BioRad) con un 5,0 % de β-ME a alícuotas del sobrenadante. Las etapas restantes del análisis de transferencia de Western eran las mismas que en el Ejemplo 2. La presencia de bandas inmunorreactivas del tamaño apropiado indica el procesamiento apropiado y la localización de DMO (Tabla 2). Por ejemplo, como se muestra en la Tabla 2, en una comparación de bandas que se ve después de la transformación de *Arabidopsis* con pMON73749 o pMON73725, el uso de RbcSnoc-CTP, que carece de la secuencia codificante del aa 27 derivada de la enzima Rubisco de guisante daba como resultado una DMO procesada apropiadamente localizada en el cloroplasto, mientras que el uso del RbcS CTP que incluye la secuencia codificante del aa 27 daba como resultado dos bandas inmunorreactivas.

**Ejemplo 4****Ensayo de las construcciones de CTP-DMO en soja**

Se obtuvieron las plantas de soja transgénica (por ejemplo, cvs. Thorne, NE3001 y A3525) por transformación mediada por *Agrobacterium* de soja utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, Zhang y col., 1999; documento US 7.002.058). Se utilizaron de tres a cinco perforaciones de hojas de las plantas de soja transgénicas

para el análisis de transferencia de Western. Se llevó a cabo la extracción proteica con 500-1000 µl de PSBT y 4 perlas de cristal en un agitador Harbil Paint durante 3 min. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos a 4 °C. Se añadió un volumen igual de 2x tampón/colorante de muestra de Laemmli (BioRad) con un 5,0 % de β-ME a alícuotas del sobrenadante. Las etapas restantes de los análisis de transferencia de Western eran las mismas que en el Ejemplo 2. La presencia de bandas inmunorreactivas del tamaño apropiado indica el procesamiento apropiado y la localización de la DMO (Tabla 2).

Las plantas de soja que se transformaron con una construcción que codifica una DMO unida a un péptido de tránsito de Rubisco de guisante unido a una región codificante de la Rubisco de 24 aminoácidos adicionales, y 3 aminoácidos debidos a la introducción de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, presentaba una tasa de daños del 17-209 % cuando se trataba con 0,23 kg de dicamba en el estadio de pre-germinación seguido por 0,91 kg de dicamba en el estadio de post germinación (V6). Esto se compara con plantas de soja que se transformaron con una construcción que codifica una DMO unida a solo un péptido de tránsito de Rubisco de guisante, que presentaban una tasa de daños de aproximadamente el 12 %. Estos resultados indican que el uso de un péptido de tránsito sin aminoácidos adicionales da como resultado la producción de una única actividad de DMO (más que múltiples polipéptidos procesados parcial o diferencialmente) y mayor tolerancia a la dicamba. La producción de una única forma de la enzima también dará lugar a facilitar la caracterización del producto y a reducir el coste del registro.

### Ejemplo 5

#### Una producción eficaz de DMO y mayor tolerancia a la dicamba necesita un CTP

Se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia con varias construcciones (FIG. 1) como se ha descrito en el Ejemplo 3. Las semillas transformadas se seleccionaron en un medio de cultivo tisular de plantas que contenía dicamba a distintas concentraciones desde 0,5, 1,0 a 2,0 mg/litro. Las semillas que se transformaron con las construcciones CTP-DMO crecieron en plantas en medio que contenía dicamba y desarrollaban hojas primarias y secundarias, mientras que la semilla no transformada y los segregantes negativos o morían o no desarrollaban hojas primarias y secundarias. Las plantas transgénicas que crecían y se ensayaban positivas para el gen DMO se utilizaron para análisis posteriores.

Como se muestra en la FIG. 1, las plantas que se transformaron con las construcciones sin CTP presentaban poca o ninguna tolerancia a la dicamba. Las plantas de soja transformadas con una construcción de ADN que codifica una DMO sin unirla a un CTP no presentaba tolerancia pre germinación mientras que las plantas transformadas con las construcciones en las que la DMO estaba unida al CTP presentaba tolerancia tanto pre como post germinación a la dicamba cuando se trataba con 0,23 kg/a de dicamba en el estadio de pre-germinación seguido por 0,91 kg/a de dicamba en el estadio post-germinación (V6).

### Ejemplo 6

#### Producción de plantas de maíz transgénicas tolerantes a dicamba

Para ensayar el uso de un gen DMO en la provisión de tolerancia a dicamba en monocotiledóneas, se produjeron plantas de maíz transgénico que comprendían el gen DMO (por ejemplo, SEQ ID NO: 29, 33, 35, 37,39) con o sin un péptido de tránsito (por ejemplo, TaWaxy, CTP1, CTP2 sintético, CTP4) bajo el control de elementos de expresión genética en plantas tales como un promotor (por ejemplo, PC1SV, e35S, OsAct1, OsTPI, OsAct15), y un intrón (por ejemplo, OsAct1, OsAct15, OsTPI, ZmHSP70). Este elemento de expresión contiene un primer intrón y secuencias de exón UTR flanqueantes del gen de actina 1 de arroz e incluye 3 nt del exón 1 en el extremo 5' y 7 nt del exón 2 en el extremo 3', y una 3' UTR (por ejemplo, TaHsp17).

Se produjeron plantas de maíz transgénicas esencialmente por el procedimiento descrito en la Solicitud de Patente de EE. UU. 20040244075. Los eventos de maíz transgénico que tienen una única copia se evaluaron en cuanto a tolerancia a la dicamba en un ensayo replicado de localización única. Se utilizaron seis eventos de cada una de las seis construcciones. El diseño experimental era el siguiente: filas/entrada: 1; tratamiento: 0,23 kg/a de dicamba en estadio V3 seguido por 0,455 kg/a de dicamba en estadio V8 (Clarity®, BASF, Raleigh, NC); repeticiones: 2; espaciado de filas: 76,2 cm; longitud de plantación: mínimo 6,1 m; densidad de plantas: aproximadamente 30 plantas/5,33 m; calles: 0,76 m. Se fertilizó la plantación completa uniformemente para obtener un cultivo agrónomicamente aceptable. Se aplicó un insecticida de suelo tal como Force® 3G (Syngenta Crop Protection, Greensboro, NC, USA) a 141,75 g por cada 304,8 m de la fila para el control del gusano de la raíz del maíz en el momento de la plantación. Si se observaba una infestación por orugas negras, se utilizó POUNCE® 3.2EC a 113,4 a 226,8 g por 4.046,86 m<sup>2</sup> (FMC Corporation, Filadelfia, PA). Además, se utilizó un programa de pulverización de insecticida para controlar todas las plagas de lepidópteros de tierra incluyendo el barrenador europeo del maíz, elotero del maíz, gusano cogollero del maíz. Se aplicó POUNCE® 3.2EC a 113,4 a 226,8 g por 4.046,86 m<sup>2</sup> cada 3 semanas para controlar las plagas por lepidópteros; se hicieron aproximadamente 4 aplicaciones. La plantación se mantuvo libre de malas hierbas con la aplicación pre-germinación de un herbicida tal como Harness® Xtra 5.6L (Monsanto, St. Louis, MO) y Degree Xtra® (Monsanto, St. Louis, MO). Si se observaban malas hierbas en un cuadro sin tratar, se controlaban a mano o con una aplicación post-germinación de PERMIT (Monsanto, St. Louis, MO) o

BUCTRIL® (Bayer, Research Triangle Park, NC) durante todo el ensayo.

Se ensayaron líneas endogámicas de maíz transformadas con construcciones de ADN que comprendían un transgén DMO en cuanto a la tolerancia a dicamba midiendo el daño de las raíces adventicias cuando se trataban con 0,23 kg/a de dicamba en estadio V3 seguido por 0,455 kg/a de dicamba en estadio V8. El daño de las raíces adventicias se evaluó visualmente por recuento del número de plantas en una fila que presentaba una morfología "atípica" que tenían las raíces adventicias fusionadas en comparación con una estructura de morfología típica "tipo dedos". Como se muestra en la Tabla 4, las plantas de maíz transformadas con construcciones de ADN que codificaban una DMO sin unirse a un CTP (pMON73699, pMON73704) presentaban un mayor nivel de daño las raíces adventicias, es decir, un menor nivel de protección al tratamiento con dicamba. Las construcciones que codifican una DMO unida a un CTP (pMON73716, pMON73700, pMON73715, pMON73703) presentaban un nivel más bajo de daño de las raíces adventicias, es decir, un nivel más alto de protección al tratamiento con dicamba.

**Tabla 4. Porcentaje de daño de las raíces adventicias que presentan las plantas de maíz transgénico transformadas con las construcciones de ADN que albergan la DMO cuando se ensayan en cuanto a tolerancia a dicamba**

Endogámicas/Construcciones	Detalles	Daño de raíces adventicias
01CSI6	Endogámico susceptible a la dicamba	95,4
LH244	Endogámico resistente a la dicamba	93,8
pMON73699	PC1SV/I-OsAct1/DMO-Wmc/TaHsp17	93,2
pMON73704	e35S/I-OsAct1/DMO-Wmc/TaHsp17	91,3
pMON73716	PC1SV/I-OsAct1/TaWaxy/DMO-Wmc/TaHsp17	78,8
pMON73700	PC1SV/1-OsAct1/CTP1/DMO-Wmc/TaHsp17	74,4
pMON73715	PC1SV/I-OsAct1/CTP2syn/DMO-Wmc/TaHsp17	68,2
pMON73703	e35S/I-OsAct1/CTP1/DMO-Wmc/TaHsp17	68,8

A partir de estos estudios en diversas especies de plantas (también, por ejemplo, en los Ejemplos 3, 4 y 8), un péptido de tránsito a cloroplastos es útil para el direccionamiento eficaz de la DMO y la producción completa de actividad de DMO, dando lugar a una mayor tolerancia a la dicamba. Además, la expresión de un CTP-DMO proporciona tolerancia pre-germinación a la dicamba en el maíz.

**Ejemplo 7**

**Construcción de unidades de expresión de DMO eficaces**

Varios elementos genéticos pueden tener influencia en la expresión eficaz de un gen tal como un promotor, secuencia peptídica de tránsito al cloroplasto, un intrón, una 5' UTR, región codificante del gen, 3' UTR. Sin embargo, no es obvia la construcción que funcione mejor. Las unidades o construcciones de expresión de DMO eficaces son necesarias para producir productos mejorados tales como una semilla y planta tolerantes a la dicamba. Varias unidades de expresión de DMO se construyeron uniendo operativamente uno de cada uno de distintos promotores, CTP, variante de DMO, y 3' UTR para obtener unidades de expresión de DMO eficaces para el desarrollo del producto. Estas construcciones se transformaron en soja por procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo los documentos U.S. 6.384.301, U.S. 7.002.058 o Zhang y col., 1999). Las semillas transgénicas se obtuvieron y ensayaron en cuanto a tolerancia pre y post-germinación al herbicida dicamba. La Tabla 4 muestra el % de daño causado por dicamba (el daño menor significa mayor tolerancia) cuando las semillas y plantas se trataron con 0,23 kg/acre de dicamba pre-germinación seguido por 0,91 kg/acre de dicamba post-germinación en estadio V6. Las semillas transformadas con las construcciones de ADN pMON68939 y pMON73723 que no llevaban el CTP eran incapaces de tolerar la aplicación pre-germinación de dicamba indicando que el direccionamiento de la DMO a los cloroplastos es necesario para obtener la tolerancia pre-germinación a la dicamba. Las plantas transformadas con pMON68939 y pMON73723 (sin CTP) que se trataron con dicamba en el estadio post-V3 con una tasa de 0,455 kg/a presentaban una tasa de daños del 55 % y 57 % respectivamente similar a la soja de tipo silvestre (60 %) mientras que las plantas transformadas con pMON68938 (con CTP) presentaban muy pocos daños. Estos resultados indican que es necesario un CTP para obtener tolerancia pre y post-germinación a la dicamba en soja.

**Tabla 5. Porcentaje de daño que presentan las plantas de soja transformadas con una unidad de expresión de DMO específica y tratadas con dicamba pre-germinación y post-germinación**

Unidad de expresión	Designación del pMON	% de daños
PC1SV/CTP2syn/DMO-Wat(A)/nos	73724	9
e35S/CTP1/DMO-Wat(L)/nos	68938	12
PC1SV/RbcSnoc/DMO-Wat(A)/nos	73725	12
PC1SV/RbcSnoc/DMO-Wat(L)/nos	73728	12
PCSV/CTP1/DMO-Wat(A)/nos	73729	13
PC1SV/CTP2syn/DMO-Wat(L)/nos	73727	13
ANT1/CTP1/DMO-Wat(L)/nos	68945	14
PC1SV/RbcSnoc/DMO-Wat(A)/nos	73730	15
PC1SV/RbcS-CTP/DMO-Cnat(A)/nos	68934	17
Act7/CTP1/DMO-Wat(L)/nos	68942	17
FMV.35S-EF1a/CTP1/DMO-Wat(L)/nos	68940	17
PC1SV/RbcS-CTP/DMO-Cnat(A) /E9	84254	20
FMV/CTP1/DMO-Wat(L)/nos	68941	29
eIF4A10/CTP1/DMO-Wat(L)/nos	68943	60
e35S/CTP1/DMO-Cat(A)/nos	68937	62
e35S/CTP1/DMO-Cnat(L)/nos	68946	73
e35S/DMO-Wat(A)/nos	68939	100 (Pre)
PC1SV/DMO-Wat(A)/nos	73723	100 (Pre)

**Ejemplo 8****5 Producción de plantas de algodón transgénico tolerantes a la dicamba**

Para ensayar el uso del gen de la DMO para la provisión de tolerancia a la dicamba al algodón, se produjeron plantas de algodón transgénico. Se produjeron construcciones de ADN que albergaban la región codificante de DMO (por ejemplo, las SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 35) con un péptido de tránsito (por ejemplo, PsRbcS CTP, CTP1, CTP2) bajo el control de elementos de expresión genética tales como un promotor (por ejemplo, PC1SV, FMV, o e35S), y una 3' UTR (por ejemplo, E6; Acceso n° U30508) y se transformaron en algodón (*Gossypium hirsutum*) de la siguiente manera. El medio utilizado se señala en la Tabla 6.

Las semillas de algodón cv Cocker 130 se cultivaron *in vitro* y se cortaron secciones de hipocotilo y se inocularon con una suspensión líquida de *Agrobacterium tumefaciens* que albergaban la construcción de ADN, se secaron por transferencia y se co-cultivaron durante 2 días. Los explantes de hipocotilo inoculados se transfirieron entonces a un medio de selección de glucosa durante 4 semanas, medio de selección por sacarosa durante 1 semana, y al medio de selección de glucosa durante otras 4 semanas adicionales para inducir los callos. Los cultivos se incubaron en un ciclo de 16/8 (luz/oscuridad) y 28 °C de temperatura. Los callos resistentes a kanamicina se transfirieron entonces a un medio UMO y se cultivaron en oscuridad durante 16-24 semanas en oscuridad a 28-30 °C para inducir los callos embriogénicos. Los callos embriogénicos se recolectaron entonces de estos callos y se mantuvieron hasta 4-16 semanas en oscuridad a 28-30 °C en medio TRP+. Los pequeños embriones de los callos embriogénicos se recolectaron y germinaron en medio SHSU en un ciclo de 16/8 (luz/oscuridad) y 28-30 °C de temperatura. Las plántulas que parecían normales se transfirieron entonces al suelo para obtener plantas de algodón maduras. La naturaleza transgénica de los transformantes se confirmó por ensayo del ADN.



**Tabla 6. Composición de distintos medios utilizados para la transformación de algodón**

Componentes	Cantidad/l				
	Glucosa	Sacarosa	UMO	TRP+	SHSU
Sales básicas MS (Phytotech.)	4,33 g	4,33 g	4,33 g	4,33 g	-
Vitaminas B5 de Gamborg (Phytotech) (500X)	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	-
2,4-D (1 mg/ml)	0,1 ml	0,1 ml	-	-	-
Stewart y Hsu mayores (10X)	-	-	-	-	100 ml
Stewart y Hsu menores (100X)	-	-	-	-	10 ml
Stewart y Hsu orgánicos (100X)	-	-	-	-	10 ml
Cinetina (0.5 mg/ml)	1 ml	1 ml	-	-	-
Hierro quelado (100X)	-	-	-	-	1,5 ml
Glucosa	30 g	30 g	30 g	30 g	5 g
Nitrato potásico	-	-	-	1,9 g	-
Hidrolizado de Caseína	-	-	-	0,1 g	-
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	6,8
Phytigel (Sigma)	2,5 g	2,5 g	-	-	-
Gelrite (Kelco)	-	-	3,5 g	3,5 g	2,2 g
Carbenicillina (250 mg/ml)	1,7 ml	1,7 ml	1,7 ml	1,7 ml	-
Cefotaxima (100 mg/ml)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-
Benlato (50 mg/ml)	-	-	-	1 ml	1 ml
Kanamycina (50 mg/ml)	0,8-1,0 ml	0,8-1,0 ml	1 ml	-	-
Sacarosa	-	0,1 g	-	-	-
Ácido ascórbico	-	-	100 mg	-	-

Las plantas de algodón transformadas que comprenden dicha construcción de ADN, comprende cada una, una combinación diferente de una región codificante de DMO con un péptido de tránsito, un promotor , y una 3' UTR, se trataron con dicamba (Clarity®, BASF, Raleigh, NC) como tratamiento post-germinación en el estadio V4-5 a una tasa de 561 g ae/Ha (0,6 lb/a) y se descubrió que eran tolerantes mientras que las plantas de algodón sin transformar presentaban una tasa de daños del 79 % al 86 %. Las plantas transgénicas que presentaban más del 95 % de tolerancia (igual a menos de un 5 % de daños) se seleccionaron para estudios adicionales. Las plantas transgénicas también eran tolerantes a un tratamiento posterior post-germinación de dicamba. Por ejemplo, las plantas se trataron con 0,23 kg/acre de dicamba en el estadio V3-4 seguido por 0,45 o 0,91 kg/acre de dicamba en el estadio V5 o posteriores eran aún tolerantes a la dicamba. Esos ejemplos demuestran que un gen de DMO puede proporcionar tolerancia a la dicamba al algodón en distintos estadios de crecimiento, haciendo posible así la aplicación de dicamba en distintos estadios para obtener un control de las malas hierbas eficaz.

### Ejemplo 9

#### 15 Procedimiento para mejorar la capacidad de mantenerse erguido del maíz

Ciertas monocotiledóneas tales como el maíz producen raíces adventicias que crecen de los nodos por encima de la superficie del suelo y ayudan al soporte de la planta y penetran en las capas superiores del suelo en busca de agua y nutrientes durante los estadios reproductivos. Un sistema saludable de raíces adventicias es importante si las plantas están sometidas a fuertes vientos o cuando el sistema radical bajo tierra se vuelve más débil por una infección de gusanos de las raíces o bajo un déficit de agua en el suelo. Está permitido el uso de herbicidas sintéticos tales como dicamba y 2,4-D en monocotiledóneas tales como el maíz para el control de malas hierbas de hoja ancha. Para el control de malas hierbas post-germinación en el maíz la dicamba es el 5º herbicida más utilizando. Aunque la tasa óptima para el control de malas hierbas de hoja ancha está ente 280 a 560 gramos/hectárea (g/Ha) o 0,25 a 0,5 lb/acre, la tasa de uso media en el maíz es de 168 g/Ha o 0,15 lb/acre ya que a tasas más altas y en ciertas condiciones ambientales tales como en días calurosos, la dicamba puede dañar el maíz.

Además, varios híbridos de maíz tales como DKC61-42, DKC64-77, DKC63-46, DKC66-21 y DKC61-44 y endogámicos tales como 01CS16, 16IUL2, 70LDL5, y 90LCL6 son sensibles a las aplicaciones de dicamba. La sensibilidad se manifiesta de muchas maneras tales como la existencia de hojas como de cebolla, malformación de las panojas, altura reducida de la planta, o formación anormal de raíces adventicias, por ejemplo, formación de raíces fusionadas o retorcidas. Las raíces adventicias se vuelven nudosas, que tienden a crecer juntas y no crecen hacia el suelo para sustentar la planta. Esto puede dar como resultado la mala capacidad de mantenerse erguido de un cultivo de maíz, alta susceptibilidad a arrasarse, y eventualmente una pérdida de rendimiento. Varios productos herbicidas que contienen dicamba, por ejemplo, Clarity®, BANVEL, MARKSMAN, DISTINCT, NORTHSTAR, y CELEBRITY PLUS, pueden causar estos efectos. El aumento de la tolerancia del maíz a la dicamba también será útil para proteger los campos de maíz plantados cerca de especies de cultivo tal como la soja y el algodón que son tolerantes a dicamba y donde se permite la aplicación de una tasa más alta de dicamba.

El presente ejemplo proporciona un procedimiento para mejorar la capacidad de mantenerse erguido del maíz y otras monocotiledóneas incorporando un gen de DMO en el maíz y tratando el maíz con dicamba. En una realización, el gen de DMO se expresa bajo el control de un promotor constitutivo que también es capaz de expresar la DMO en una región nodal y/o en raíces adventicias. En otra realización el gen de la DMO se expresa bajo el control de un promotor constitutivo quimérico y específico de los nodos/raíces adventicia. En otra realización, el gen DMO se expresa bajo el control de un promotor específico de la raíz tal como RCc3 o una variante del mismo (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-6 como se encuentra en el documento US20060101541). La expresión de DMO en las raíces adventicias da como resultado en ningún o menor daño en las raíces adventicias y una mejor capacidad de mantenerse erguido del maíz, se arrasa menos, y por lo tanto mejor rendimiento.

Las semillas R1 o F1 de tres eventos de única copia de plantas de maíz transformadas con distintas construcciones de DMO (representado en la Tabla 7) se germinaron en bandejas de 10,16 cm. Las plantas saludables se trasplantaron en tiestos de aproximadamente 25,4 cm. Los medios de germinación y crecimiento comprendían Redi-earth™ (Scotts-Sierra Horticultural Products Co., Marysville, Ohio). Los tiestos se colocaron sobre una estera de capilaridad en bandejas de riego de fibra de vidrio de 88,9 cm x 152,4 cm para la sub-irrigación durante la duración del periodo de ensayo de manera que se mantiene una humedad de suelo óptima para el crecimiento de la planta. Los tiestos se fertilizaron con Osmocote (14-14-14 liberación lenta; Scotts-Sierra Horticultural Products Co., Marysville, Ohio) a una tasa de 1,11 kg/m<sup>2</sup> para sustentar el crecimiento de la planta durante los ensayos en el invernadero. Las plantas se cultivaron en invernaderos a 29 °C/21 °C temperatura día/noche, con una humedad relativa entre el 25 %-75 % para simular las condiciones de crecimiento de la estación cálida del final de la primavera. Se proporcionó un fotoperiodo mínimo de 14 h con luz suplementaria a aproximadamente 600 mE si era necesario.

Las aplicaciones de dicamba se hicieron con el camión pulverizador utilizando un Teejet 9501E con boquilla de ventilador plana (Spraying Systems Co, Wheaton, IL) con un equipo de presión de aire a un mínimo de 24 psi (165 kpa). La boquilla del pulverizador se mantuvo a una altura de aproximadamente 40,64 cm por encima de la parte superior del material vegetal para la pulverización. El volumen de la pulverización era de 10 galones por acre o 93 litros por hectárea. Las aplicaciones se hicieron cuando las plantas habían alcanzado un estadio de hoja V4-5.

Las plantas de una línea endogámica de maíz transformadas con construcciones de ADN que comprenden una unidad de expresión de DMO que se ensayaron en cuanto al daño en las raíces adventicias y arrasamiento tratándolas con 907 g/acre o 1.814 g/acre de dicamba en un estadio V4-5 y evaluando las plantas en cuanto al daño en raíces adventicias (0%; daño de la planta no visible) al 100% (muerte completa de la planta); y arrasamiento (grado de encame) a los 24 DAT. Como se muestra en la Tabla 7, las plantas de maíz transformadas con las construcciones de ADN que tienen una unidad de expresión de DMO presentaban ninguna o poco daño de raíces adventicias y arrasamiento en comparación con la línea endogámica sin transformar de control con solo una unidad de expresión de marcador genético (pMON73746). Este ejemplo demuestra que proporcionar plantas que contienen DMO se puede utilizar para proporcionar una capacidad de mantenerse erguidas mejorada cuando se tratan con dicamba.

**Tabla 7. Plantas de maíz transformadas con distintas construcciones de DMO que presentan ningún o pocos daños a las raíces adventicias y arrasamiento cuando se tratan con dicamba**

Endogámica/ construcción	Evento	Detalles de construcción	Nivel de aplicación de dicamba	
			907 g/acre	1.814 g/acre
			% de daño de raíces adventicias y arrasamiento a	
			24 DAT	24 DAT
control			17,5	31,7
73746 R1	S214540	Sin unidad de expresión de DMO	20,0	28,1
73746 F1	S215886		33,8	40,0
73703 F2	S183001	e35S/I-OsAct1/CTP1-DMO Wmc/ TaHsp17	0,9	1,0

(continuación)

Endogámica/ construcción	Evento	Detalles de construcción	Nivel de aplicación de dicamba	
73744 F1	S208388	OsAct1/I-OsAct1/CTP2syn-DMOWmc/ TaHsp17	0,0	0,2
73744 F1	S208373		0,0	0,4
73744 F1	S208382		0,0	0,0
73747 R1	S207612	PC1SV/I-OsAct1/CTP4-DMOWmc/ TaHsp17	0,6	1,8
73747 R1	S207608		0,8	1,0
73747 R1	S208367		0,0	0,0
73743 R1	S208476	PCSV/I-OsAct1/CTP2syn/DMO-Cmc/ TaHsp17	3,9	19,6
73743 R1	S208469		1,3	22,9
73743 R1	S208071		2,7	13,5
73742 R1	S213404	PC1SV/I-OsAct1/CTP2syn-DMO-Cnat/ TaHsp17	0,0	0,0
73742 R1	S213395		0,2	0,4
73742 R1	S212111		0,4	0,5

### Referencias

5 Las referencias enumeradas posteriormente se incorporan en el presente documento por referencia hasta el extremo que suplementan, explican, proporcionan un antecedente, o enseñan la metodología, técnicas, y/o composiciones empleadas en el presente documento.

10 Patentes de EE. UU. 4.554.101; 5.015.580; 5.846.797; 5.004.863; 5.017.692; 5.159.135; 5.229.114; 5.304.730; 5.322.938; 5.352.605; 5.359.142; 5.362.865; 5.378.619; 5.384.253; 5.424.412; 5.463.175; 5.508.184; 5.512.466; 5.516.671; 5.530.196; 5.538.880; 5.543.576; 5.550.318; 5.552.299; 5.641.876; 5.567.600; 5.567.862; 5.591.616; 5.608.149; 5.633.435; 5.635.055; 5.641.876; 5.659.122; 5.689.041; 5.689.052; 5.716.837; 5.728.925; 5.750.871; 5.750.876; 5.763.241; 5.763.245; 5.773.696; 5.804.425; 5.824.877; 5.837.848; 5.850.019; 5.850.023; 5.859.347; 5.866.775; 5.869.720; 5.942.664; 5.958.745; 5.959.091; 5.981.834; 5.981.840; 5.985.605; 5.998.700; 5.942.658; 5.880.275; 6.5412.59; 6.011.199; 6.013.864; 6.015.940; 6.023.013; 6.051.753; 6.063.597; 6.063.756; 6.072.103; 6.080.560; 6.093.695; 6.107.549; 6.110.464; 6.121.436; 6.140.075; 6.140.078; 6.153.814; 6.156.573; 6.160.208; 15 6.166.292; 6.171.640; 6.175.060; 6.177.611; 6.177.615; 6.215.048; 6.221.649; 6.222.098; 6.225.114; 6.228.623; 6.228.992; 6.232.526; 6.235.971; 6.242.241; 6.248.536; 6.248.876; 6.252.138; 6.271.443; 6.281.016; 6.284.949; 6.294.714; 6.313.378; 6.316.407; 6.326.351; 6.372.211; 6.380.462; 6.380.466; 6.384.301; 6.388.170; 6.399.330; 6.399.861; 6.403.865; 6.423.828; 6.426.446; 6.426.447; 6.429.357; 6.429.362; 6.433.252; 6.437.217; 6.441.277; 6.444.876; 6.448.476; 6.459.018; 6.468.523; 6.476.295; 6.476.295; 6.483.008; 6.489.461; 6.495.739; 6.501.009; 20 6.506.962; 6.506.962; 6.518.488; 6.521.442; 6.531.648; 6.537.750; 6.537.756; 6.538.109; 6.538.178; 6.538.179; 6.538.181; 6.555.655; 6.573.361; 6.576.818; 6.589.767; 6.593.293; 6.596.538; 6.608.241; 6.617.496; 6.620.988; 6.624.344; 6.635.806; 6.639.054; 6.642.030; 6.645.497; 6.653.280; 6.653.530; 6.657.046; 6.660.849; 6.663.906; 6.686.452; 6.706.950; 6.713.063; 6.716.474; 6.723.837; 6.723.897; 6.770.465; 6.774.283; 6.803.501; 6.809.078; 6.812.379; 6.822.141; 6.828.475; 7.022.896; 7.002.058; 7.132.528; 7.151.204; RE38.446 y RE37.543; Publ. de 25 Patente de EE. UU. N° 20030028917; 20030135879; 20030115626; 20040244075; 20050022261; 20060101541; 20060162010 y 0060236420; y Sol. Prov. de EE. UU. Ser. N° 60/811.152 y 60/884.854.

30 Akashi y col., FEBS Lett. 431:39-44, 1998.  
Becker y col., Plant Mol. Biol. 20:49, 1992.  
Bevan y col., Nature, 304:184-187, 1983.  
Bohlmann y col., Plant J., 7 (3): 491-501, 1995.  
Carrington y Freed, J. of Virology 64:1590-1597, 1990.  
Chalfie y col., Science, 263(5148):802-805, 1994.  
Chandler y col., Plant Cell, 1:1175-1183, 1989.  
35 Chu y col. Scientia Sinica 18:659, 1975.  
Clark y col., Plant Mol. Biol., 16 (6): 1099-1101, 1991.

### Referencias

Las referencias enumeradas posteriormente suplementan, explican, proporcionan un antecedente, o enseñan la metodología, técnicas y/o composiciones empleadas en el presente documento.

40 Patente de EE. UU. 4.554.101; Patente de EE. UU. 5.015.580; Patente de EE. UU. 5.846.797; Patente de EE. UU. 5.004.863; Patente de EE. UU. 5.017.692; Patente de EE. UU. 5.159.135; Patente de EE. UU. 5.229.114; Patente de

EE. UU. 5.304.730; Patente de EE. UU. 5.322.938; Patente de EE. UU. 5.352.605; Patente de EE. UU. 5.359.142; Patente de EE. UU. 5.362.865; Patente de EE. UU. 5.378.619; Patente de EE. UU. 5.384.253; Patente de EE. UU. 5.424.412; Patente de EE. UU. 5.463.175; Patente de EE. UU. 5.508.184; Patente de EE. UU. 5.512.466; Patente de EE. UU. 5.516.671; Patente de EE. UU. 5.530.196; Patente de EE. UU. 5.538.880; Patente de EE. UU. 5.543.576; Patente de EE. UU. 5.550.318; Patente de EE. UU. 5.552.299; Patente de EE. UU. 5.641.876; Patente de EE. UU. 5.567.600; Patente de EE. UU. 5.567.862; Patente de EE. UU. 5.591.616; Patente de EE. UU. 5.608.149; Patente de EE. UU. 5.633.435; Patente de EE. UU. 5.635.055; Patente de EE. UU. 5.641.876; Patente de EE. UU. 5.659.122; Patente de EE. UU. 5.689.041; Patente de EE. UU. 5.689.052; Patente de EE. UU. 5.716.837; Patente de EE. UU. 5.728.925; Patente de EE. UU. 5.750.871; Patente de EE. UU. 5.750.876; Patente de EE. UU. 5.763.241; Patente de EE. UU. 5.763.245; Patente de EE. UU. 5.773.696; Patente de EE. UU. 5.804.425; Patente de EE. UU. 5.824.877; Patente de EE. UU. 5.837.848; Patente de EE. UU. 5.850.019; Patente de EE. UU. 5.850.023; Patente de EE. UU. 5.859.347; Patente de EE. UU. 5.866.775; Patente de EE. UU. 5.869.720; Patente de EE. UU. 5.942.664; Patente de EE. UU. 5.958.745; Patente de EE. UU. 5.959.091; Patente de EE. UU. 5.981.834; Patente de EE. UU. 5.981.840; Patente de EE. UU. 5.985.605; Patente de EE. UU. 5.998.700; Patente de EE. UU. 5.942.658; Patente de EE. UU. 5.880.275; Patente de EE. UU. 6.5412.59; Patente de EE. UU. 6.011.199; Patente de EE. UU. 6.013.864; Patente de EE. UU. 6.015.940; Patente de EE. UU. 6.023.013; Patente de EE. UU. 6.051.753; Patente de EE. UU. 6.063.597; Patente de EE. UU. 6.063.756; Patente de EE. UU. 6.072.103; Patente de EE. UU. 6.080.560; Patente de EE. UU. 6.093.695; Patente de EE. UU. 6.107.549; Patente de EE. UU. 6.110.464; Patente de EE. UU. 6.121.436; Patente de EE. UU. 6.140.075; Patente de EE. UU. 6.140.078; Patente de EE. UU. 6.153.814; Patente de EE. UU. 6.156.573; Patente de EE. UU. 6.160.208; Patente de EE. UU. 6.166.292; Patente de EE. UU. 6.171.640; Patente de EE. UU. 6.175.060; Patente de EE. UU.

Teeri y col., EMBO J., 8(2):343-350, 1989.  
 Turner y Foster, Molecular Biotech., 3:225, 1995.  
 Walker y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:6624, 1987.  
 Yang y Russell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4144-4148, 1990.  
 Zhang y col., Plant Cell Tissue Organ Cult. 56:37-46, 1999.

Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica la dicamba monooxigenasa, en el que la secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto codifica una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1-11.

La molécula de ADN recombinante que se ha definido anteriormente, en la que la secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto comprende una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 12-22.

Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica la dicamba monooxigenasa, en la que la secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto codifica una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en la secuencia de péptido de tránsito a cloroplasto de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa de *Arabidopsis thaliana* CTP2 y una secuencia de péptido de tránsito al cloroplasto de la subunidad pequeña de Rubisco del guisante.

La molécula de ADN recombinante que se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica la dicamba monooxigenasa, en la que la secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto codifica una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 2-7.

La molécula de ADN recombinante que se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica la dicamba monooxigenasa, en la que la secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto codifica una secuencia seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5.

La molécula de ADN recombinante que se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica la dicamba monooxigenasa, en la que la secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto comprende una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 13-18.

La molécula de ADN recombinante que se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica la dicamba monooxigenasa, en la que la secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto comprende una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 13, 15 y 16.

La molécula de ADN recombinante que se ha definido anteriormente, en la que la secuencia de ADN que codifica una dicamba monooxigenasa codifica un polipéptido seleccionado de entre las SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, y 40.

## ES 2 659 147 T3

La molécula de ADN recombinante que se ha definido anteriormente, en la que la secuencia de ADN se selecciona de entre las SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, y 39.

Una construcción de ADN que comprende la molécula de ADN que se ha definido anteriormente unida operativamente a un promotor.

- 5 Una construcción de ADN como se define anteriormente, en la que el promotor se selecciona de entre el grupo que consiste en un promotor FMV35S, un promotor At.ANT1, un promotor FMV.35S-EF1a, un promotor eIF4A10, un promotor AGRtu.nos, un promotor de triosa fosfato isomerasa citosólico (OsTPI), un promotor del gen 15 de actina de arroz (OsAct15), y un promotor gamma coixina.

La construcción que se ha definido anteriormente, en la que el promotor es funcional para una célula vegetal.

- 10 Una célula vegetal transformada con la construcción de ADN que se ha definido anteriormente.

La célula que se ha definido anteriormente, en la que la célula vegetal es una célula vegetal de dicotiledónea.

La célula que se ha definido anteriormente, en la que la célula vegetal es una célula vegetal de monocotiledónea.

La célula que se ha definido anteriormente, en la que la célula vegetal es una célula celular de soja, algodón, maíz, o canola.

- 15 Un cultivo tisular vegetal que comprende la célula que se ha definido anteriormente.

El cultivo tisular vegetal que se ha definido anteriormente, que comprende una célula vegetal de dicotiledónea.

El cultivo tisular vegetal que se ha definido anteriormente, que comprende una célula vegetal de monocotiledónea.

El cultivo tisular vegetal que se ha definido anteriormente, que comprende una célula vegetal de soja, algodón, maíz, o canola.

- 20 Una planta transgénica transformada con la construcción de ADN que se ha definido anteriormente.

La planta transgénica que se ha definido anteriormente, en la que la planta es una planta dicotiledónea.

La planta transgénica que se ha definido anteriormente, en la que la planta es una planta monocotiledónea.

La planta transgénica que se ha definido anteriormente, en la que la planta es una planta de soja, algodón, maíz o canola.

- 25 Un procedimiento para producir una planta tolerante a la dicamba que comprende la introducción de la construcción que se ha definido anteriormente en una célula vegetal y regenerar una planta a partir de la misma que comprende la construcción que se ha definido anteriormente.

El procedimiento que se ha definido anteriormente, que comprende adicionalmente la producción de una planta tolerante a la dicamba cruzando una planta parental con ella misma o con una segunda planta, en el que la planta parental y/o la segunda planta comprende la construcción de ADN y la planta tolerante a la dicamba hereda la construcción de ADN de dicha planta parental y/o de la segunda planta.

- 30

Un procedimiento para expresar dicamba monooxigenasa en una célula vegetal que comprende unido operativamente un CTP seleccionado con una secuencia que codifica una dicamba monooxigenasa.

- 35 Un procedimiento para controlar malas hierbas que crecen en un ambiente de crecimiento de un cultivo que comprende una planta como se ha definido anteriormente o una semilla de la misma, y aplicar al ambiente de crecimiento de un cultivo una cantidad del herbicida dicamba eficaz para controlar el crecimiento de malas hierbas.

El procedimiento que se ha definido anteriormente, en el que el herbicida dicamba se aplica por encima de la parte superior del ambiente de crecimiento del cultivo.

- 40 El procedimiento que se ha definido anteriormente, en el que la cantidad del herbicida dicamba no daña dicha planta como se ha definido anteriormente o la semilla de la misma y daña una planta con el mismo genotipo que la planta que se ha definido anteriormente pero que carece de la construcción que se ha definido anteriormente.

Un procedimiento para la producción de alimento, pienso, fibra, o un producto industrial que comprende:

a) la obtención de la planta que se ha definido anteriormente o una parte de la misma; y

b) la preparación del alimento, pienso, fibra, o producto industrial a partir de la planta o una parte de la misma.

- 45 El procedimiento que se ha definido anteriormente, en el que el alimento o el pienso es en grano, harina, aceite, almidón, harina, o proteína.

El procedimiento que se ha definido anteriormente, en el que el producto industrial es biocombustible, fibra, productos químicos industriales, un producto farmacéutico, o un nutracéutico.

5 Una semilla tolerante a la dicamba para proporcionar protección contra la aplicación pre-germinación de dicamba que comprende un ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto unido operativamente a un ADN que codifica una dicamba monooxigenasa.

La semilla tolerante a la dicamba que se ha definido anteriormente, en la que el ADN codifica un péptido de tránsito al cloroplasto seleccionado de las SEQ ID NO: 1-11.

La semilla tolerante a la dicamba que se ha definido anteriormente, en la que el ADN que codifica el péptido de tránsito al cloroplasto comprende una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 12-22.

10 La semilla tolerante a la dicamba que se ha definido anteriormente, en el que el ADN codifica una dicamba monooxigenasa que comprende una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, y 40.

15 Un procedimiento para mejorar la capacidad de mantenerse erguida de una planta monocotiledónea que comprende: a) cultivar una planta o semilla producida por el procedimiento que se ha definido anteriormente; y b) tratar la planta o la semilla con dicamba.

El procedimiento que se ha definido anteriormente, que comprende adicionalmente; c) medir un parámetro relacionado con la capacidad de mantenerse erguida que se selecciona de entre el grupo que consiste en el número, el tamaño, longitud o estructura de raíces adventicias; el porcentaje de arrasamiento; y el rendimiento.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Monsanto Technology LLC
- <120> PÉPTIDOS DE TRÁNSITO AL CLOROPLASTO PARA EL DIRECCIONAMIENTO EFICAZ DE DMO Y USOS DE LOS MISMOS
- 25 <130> MONS: 107EP
- <150> EP 07798176.9
- <151> 06-06-2007
- 30 <150> US 11/758.659
- <151> 05-06-2007
- <150> US 60/891.675
- 35 <151> 26-02-2007
- <160> 41
- <170> 3.3
- 40 <210> 1
- <211> 84
- <212> PRT
- <213> *Pisum sativum*
- 45 <400> 1

ES 2 659 147 T3

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

5 <210> 2  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> *Pisum sativum*  
 <400> 2

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

10 50 55  
 15 <210> 3  
 <211> 85  
 <212> PRT  
 <213> *Arabidopsis thaliana*  
 <400> 3

ES 2 659 147 T3

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

5 <210> 4  
 <211> 76  
 <212> PRT  
 <213> *Arabidopsis thaliana*  
 <400> 4

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

10 <210> 5  
 <211> 76  
 <212> PRT  
 15 <213> *Arabidopsis thaliana*  
 <400> 5

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

20



ES 2 659 147 T3

5 <210> 6  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> *Petunia hybrida*

<400> 6

```

Met Ala Gln Ile Asn Asn Met Ala Gln Gly Ile Gln Thr Leu Asn Pro
1           5           10           15
Asn Ser Asn Phe His Lys Pro Gln Val Pro Lys Ser Ser Ser Phe Leu
20           25           30
Val Phe Gly Ser Lys Lys Leu Lys Asn Ser Ala Asn Ser Met Leu Val
35           40           45
Leu Lys Lys Asp Ser Ile Phe Met Gln Lys Phe Cys Ser Phe Arg Ile
50           55           60
Ser Ala Ser Val Ala Thr Ala Cys
65           70
  
```

10 <210> 7  
 <211> 69  
 <212> PRT  
 <213> *Triticum aestivum*

15 <400> 7

```

Met Ala Ala Leu Val Thr Ser Gln Leu Ala Thr Ser Gly Thr Val Leu
1           5           10           15
Ser Val Thr Asp Arg Phe Arg Arg Pro Gly Phe Gln Gly Leu Arg Pro
20           25           30
Arg Asn Pro Ala Asp Ala Ala Leu Gly Met Arg Thr Val Gly Ala Ser
35           40           45
Ala Ala Pro Lys Gln Ser Arg Lys Pro His Arg Phe Asp Arg Arg Cys
50           55           60
Leu Ser Met Val Val
65
  
```

20 <210> 8  
 <211> 77  
 <212> PRT  
 <213> *Oryza sativa*

25 <400> 8

ES 2 659 147 T3

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

5 <210> 9  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> *Nicotiana tabacum*  
 <400> 9

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

10 <210> 10  
 <211> 65  
 <212> PRT  
 <213> *Zea mays*  
 15 <400> 10

Met Glu Ser Leu Ala Ala Thr Ser Val Phe Ala Pro Ser Arg Val Ala  
 1 5 10 15  
 Val Pro Ala Ala Arg Ala Leu Val Arg Ala Gly Thr Val Val Pro Thr  
 20 25 30  
 Arg Arg Thr Ser Ser Arg Ser Gly Thr Ser Gly Val Lys Cys Ser Ala  
 35 40 45  
 Ala Val Thr Pro Gln Ala Ser Pro Val Ile Ser Arg Ser Ala Ala Ala  
 50 55 60  
 Ala  
 65

20 <210> 11  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> *Ruta graveolens*



ES 2 659 147 T3

atgggttcct ctatgctctc ttccgctaact atggttgcoct ctccggotca ggccaactatg 60  
 gtcgctcctt tcaacggact taagtccctcc gctgccttcc cagccaaccog caaggctaac 120  
 aacgacatta cttccatcac aagcaacggc ggaagagtta actgtatgca ggtgtggcct 180  
 ccgattgaaa agaagaagtt tgagactctc tcttaccttc ctgacottac cgattccggt 240  
 ggtcgcgtca actgc 255

5 <210> 15  
 <211> 228  
 <212> ADN  
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 15

atggcgcaag ttagcagaat ctgcaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc 60  
 tcgaaatcca gtcaacgcaa atctccctta tcggtttctc tgaagacgca gcagcatcca 120  
 cgagcttatac cgatttcgtc gtcgtgggga ttgaagaaga gtgggatgac gttaattggc 180  
 tctgagcttc gtcctcttaa ggtcatgtct tctgtttcca cggcgtgc 228

10

<210> 16  
 <211> 228  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<400> 16

atggcgcaag ttagcagaat ctgcaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc 60  
 tcgaaatcca gtcaacgcaa atctccctta tcggtttctc tgaagacgca gcagcatcca 120  
 cgagcttatac cgatttcgtc gtcgtgggga ttgaagaaga gtgggatgac gttaattggc 180  
 tctgagcttc gtcctcttaa ggtcatgtct tctgtttcca cggcgtgc 228

20

<210> 17  
 <211> 216  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<400> 17

atggcccaga tcaacaacat ggcccagggc atccagacc tgaaccctaa ctctaacttc 60  
 cacaagccgc aagtgcccaa gtctagctcc ttctctgtgt tcggctccaa gaagctcaag 120  
 aatagcgcca attccatgct ggtcctgaag aaagactcga tcttcatgca gaagttctgc 180  
 tcctttcgca tcagtgttc ggttgcgact gcctgc 216

30

<210> 18  
 <211> 207  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <400> 18

ES 2 659 147 T3

atggcgggcac tggtgacctc ccagctcgcg acaagcggca ccgtcctgtc ggtgacggac 60  
 cgcttccggc gtcccggctt ccagggactg aggccacgga acccagccga tgccgctctc 120  
 gggatgagga cgggtggcgc gtccggggct cccaagcaga gcaggaagcc acaccgtttc 180  
 gaccgcccgt gcttgagcat ggtcgtc 207

5 <210> 19  
 <211> 231  
 <212> ADN  
 <213> *Oryza sativa*

<400> 19

atggcgggctc tcaccacgtc ccagctcgcg acctcggcca ccggcttcgg catcgcgcgac 60  
 aggtcggcgc cgtcgtcgtc gtcocgccac gggttccagg gcctcaagcc ccgcagcccc 120  
 gccggcggcg acgcgacgtc gctcagcgtg acgaccagcg cgcgcgcgac gcccaagcag 180  
 cagcggtcgg tgcagcgtgg cagccggagg ttccccctcc tcgtcgtgtg c 231

10  
 15 <210> 20  
 <211> 171  
 <212> ADN  
 <213> *Nicotiana tabacum*

<400> 20

atggcttctt cagttctttc ctctgcagca gttgccaccc gcagcaatgt tgctcaagct 60  
 aacatggttg cacctttcac tggccttaag tcagctgcct cattccctgt ttcaaggaag 120  
 caaaaccttg acatcacttc cattgccagc aacggcggaa gagtgcaatg c 171

20  
 25 <210> 21  
 <211> 195  
 <212> ADN  
 <213> *Zea mays*

<400> 21

atggaatccc tagccgccac ctccgtgttc ggcacctccc gcgtcgcctt cccggcggcg 60  
 cgggcccttg ttagggcggg gacgggtgta ccaaccaggc ggacgagcag ccggagcggg 120  
 accagcgggg tgaaatgctc tgctgccgtg acgcgcgagg cgagcccagt gattagcagg 180  
 agcgtgcgg cggcc 195

30 <210> 22  
 <211> 216  
 <212> ADN  
 <213> *Ruta graveolens*

35 <400> 22

ES 2 659 147 T3

atgggtgcag cggcaacgtc gatgcaatcc cttaaattct ccaacogtct ggtcccaccc 60  
 agtcgccgtc tgtctccggt tccgaacaat gtcacctgca ataacctccc caagtctgca 120  
 gctcccgtcc ggacagtcaa atgotgogct tcttctgga acagtaccat caacggcgcg 180  
 gccgccacga ccaacgggtgc gtccgcccgc agtagc 216

5 <210> 23  
 <211> 1023  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<400> 23

atggccactt tcgttagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttcctgagga gttgagcgag 60  
 aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgtca acctgacgga 120  
 gttgtcgtcg ccctgcttga tatttgtccg categettcg ctccgttgag tgacgggtatt 180  
 ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggctctgg aatttgacgg aggtggccag 240  
 tgtgtccaca acccgcacgg caacggagcc cgcctgctt ctctgaacgt gcgatcattc 300  
 cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctgcctg gagatccagc actcgcagat 360  
 cccggtgcta tcctgactt tgggtgtcgt gttgatccag ettaccgtac tgtcggaggt 420  
 tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc ctgtggata acctcatgga tcttggacac 480  
 gctcagtaag tgcaccgcgc taacgcccaa acagacgcct tcgatagact tgagcgtgag 540  
 gtgatcgttg gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tccctggtgg cacaccctca 600  
 gttctcatgg ctaagttctt gogtgggtgct aacacaccag ttgacgcctg gaacgacatc 660  
 cgggtggaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcacgcggg tcgcgccgga agggacgccg 720  
 aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc 780  
 tgccattact tcttcggtag ttcccgcaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggg 840  
 gttctcagga gctggcaagc tcaagcctg gtgaaggagg acaaagtggg cgttgaagct 900  
 atcgaaaggc ggagggctta cgtogaagcg aacgggatca gaccgccat gttgtcctgc 960  
 gacgaggcag ccgtcagggg atccagggag attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg 1020  
 tga 1023

10 <210> 24  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<400> 24

ES 2 659 147 T3

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

ES 2 659 147 T3

Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys  
 100 105 110

Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly  
 115 120 125

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

Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His  
 145 150 155 160

Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg  
 165 170 175

Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met  
 180 185 190

Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg  
 195 200 205

Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys  
 210 215 220

Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro  
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu  
 245 250 255

Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly  
 260 265 270

Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln  
 275 280 285

Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg  
 290 295 300

Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys  
 305 310 315 320

Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln  
 325 330 335

Leu Glu Ala Ala  
 340

<210> 25  
 <211> 1023  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

10

<400> 25



ES 2 659 147 T3

```

atgctcactt tcgtagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttcctgagga gttgagcgag 60
aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgta acctgacgga 120
gttgctgctg ccctgcttga tatttgctcg catcgcttgc ctccgctgag tgacgggtatt 180
ctagtcaacg gacatctoca gtgtccatat cacggctctg aatttgacgg aggtggccag 240

tgtgtccaca acccgcaagg caacggagcc cgcctgctt ctctgaacgt gcgatcattc 300
cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctgccttg gagatccagc actcgcagat 360
cccggtgcta tccctgactt tgggtgctgt gttgatccag cttaccgtac tgtcggaggt 420
tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tcttggacac 480
gctcagtagc tgcaccgccc taacgcccac acagacgctt tcgatagact tgagcgtgag 540
gtgatcgttg gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tcctggtgg cacaccctca 600
gttctcatgg ctaagttott gcgtggtgct aacacaccag ttgacgctg gaacgacatc 660
cggtggaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcctcggcg tcgcccga agggacgccc 720
aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc 780
tgccattact tcttcggtag ttcccgaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggt 840
gttctcagga gctggcaagc tcaagcctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct 900
atcgaaaggc ggagggctta cgtcgaagcg aacgggatca gaccggccat gttgtcctgc 960
gacgaggcag ccgtcagggc atccagggag attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg 1020

tga 1023

```

5 <210> 26  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <400> 26

ES 2 659 147 T3

Met Leu Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu  
 1 5 10 15

Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu  
 20 25 30

Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile  
 35 40 45

Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly  
 50 55 60

His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln  
 65 70 75 80

Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn  
 85 90 95

Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys  
 100 105 110

Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly  
 115 120 125

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

ES 2 659 147 T3

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

<210> 27  
 <211> 1023  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<400> 27

ES 2 659 147 T3

atgctcactt tcgtagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttctgagga gttgagcgag 60  
 aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgta acctgacgga 120  
 gttgctgctg cctgcttga tatttgctcg catcgcttcg ctccggtgag tgacgggtatt 180  
 ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggctctgg aatttgacgg aggtggccag 240  
 tgtgtccaca acccgcacgg caacggagcc cgcctgctt ctctgaacgt gogatcattc 300  
 cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctggcctg gagatccagc actogcagat 360  
 cccggtgcta tcctgactt tgggtgtcgt gttgatccag cttaccgtac tgtcggaggt 420  
  
 tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tottggacac 480  
 gctcagtagc tgcaccgccc taacgcccac acagacgctc tcgatagact tgagcgtgag 540  
 gtgatcgttg gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tccctggtgg cacaccctca 600  
 gttctcatgg ctaagttctt gcgtggtgct aacacaccag ttgacgctc gaacgacatc 660  
 cgggtgaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcatcgcgg tcgcgccgga agggacgccg 720  
 aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc 780  
 tgccattact tcttcggtag ttcccgcaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggt 840  
 gttctcagga gctggcaagc tcaagcctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct 900  
 atcgaaggc ggagggctta cgtcgaagcg aacgggatca gaccgccat gttgtcctgc 960  
 gacgaggcag ccgtcagggt atccaggag attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg 1020  
  
 tga 1023

<210> 28  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

10

<400> 28

ES 2 659 147 T3

Met	Leu	Thr	Phe	Val	Arg	Asn	Ala	Trp	Tyr	Val	Ala	Ala	Leu	Pro	Glu
1				5					10					15	
Glu	Leu	Ser	Glu	Lys	Pro	Leu	Gly	Arg	Thr	Ile	Leu	Asp	Thr	Pro	Leu
			20					25					30		
Ala	Leu	Tyr	Arg	Gln	Pro	Asp	Gly	Val	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	Asp	Ile
		35					40					45			
Cys	Pro	His	Arg	Phe	Ala	Pro	Leu	Ser	Asp	Gly	Ile	Leu	Val	Asn	Gly
	50					55					60				
His	Leu	Gln	Cys	Pro	Tyr	His	Gly	Leu	Glu	Phe	Asp	Gly	Gly	Gly	Gln
65					70					75					80
Cys	Val	His	Asn	Pro	His	Gly	Asn	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Ser	Leu	Asn
				85					90					95	
Val	Arg	Ser	Phe	Pro	Val	Val	Glu	Arg	Asp	Ala	Leu	Ile	Trp	Ile	Trp
			100					105						110	
Pro	Gly	Asp	Pro	Ala	Leu	Ala	Asp	Pro	Gly	Ala	Ile	Pro	Asp	Phe	Gly
		115					120					125			
Cys	Arg	Val	Asp	Pro	Ala	Tyr	Arg	Thr	Val	Gly	Gly	Tyr	Gly	His	Val
	130					135					140				
Asp	Cys	Asn	Tyr	Lys	Leu	Leu	Val	Asp	Asn	Leu	Met	Asp	Leu	Gly	His
145					150					155					160
Ala	Gln	Tyr	Val	His	Arg	Ala	Asn	Ala	Gln	Thr	Asp	Ala	Phe	Asp	Arg
				165					170					175	

ES 2 659 147 T3

Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met  
 180 185 190  
 Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg  
 195 200 205  
 Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys  
 210 215 220  
 Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly  
 260 265 270  
 Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln  
 275 280 285  
 Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg  
 290 295 300  
 Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys  
 305 310 315 320  
 Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln  
 325 330 335  
 Leu Glu Ala Ala  
 340

<210> 29  
 <211> 1023  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

10

<400> 29

ES 2 659 147 T3

```

atggccacct tcgtccgcaa tgccctggtat gtggcggcgc tgcccgagga actgtccgaa 60
aagccgctcg gcgggacgat tctcgacaca ccgctcgcgc tctaccgcca gcccgacggt 120
gtggtcgogg cgtgctcga catctgtccg caccgcttcg cgcgctgag cgacggcatc 180
ctcgtcaacg gccatctcca atgcccctat caogggctgg aattcgatgg cggcgggcag 240
tgcgctccata acccgcaogg caatggcgcc cgcccggctt cgctcaacgt ccgctccttc 300
ccgggtggtgg agcgcgacgc gctgatctgg atctgtcccg gcgatccggc gctggccgat 360
cctggggcga tccccgactt cggctgccgc gtcgatcccg cctatcggac cgtcggcggc 420
tatgggcatg tcgactgcaa ctacaagctg ctggtcgaca acctgatgga cctcggccac 480
goccaatatg tccatcgcgc caacgcccag accgacgct tcgaccggct ggagcgcgag 540
gtgatcgtcg gcgacggtga gatacaggcg ctgatgaaga ttcccggcgg caccgcgagc 600
gtgctgatgg ccaagttcct gcgcggcgcc aatacccccg tcgacgcttg gaacgacatc 660

cgctggaaca aggtgagcgc gatgctcaac ttcatcgcgg tggcgcggga aggcaccccg 720
aaggagcaga gcatocactc ggcgggtacc catatcctga cccccgagac ggaggcgagc 780
tgccattatt tcttcggctc ctgcgcgaat ttcggcatcg acgatccgga gatggacggc 840
gtgctgcgca gctggcaggc tcaggcgctg gtcaaggagg acaaggctcgt cgtcgaggcg 900
atcgagcggc gccgcgccta tgtcgaggcg aatggcatcc gcccgcgat gctgtcgtgc 960
gacgaagccg cagtccgtgt cagccgcgag atcgagaagc ttgagcagct cgaagccgcc 1020

tga 1023

```

5 <210> 30  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <400> 30

ES 2 659 147 T3

Met Ala Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu  
1 5 10 15

Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu  
20 25 30

Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile  
35 40 45

Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly  
50 55 60

His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln  
65 70 75 80

Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn  
85 90 95

Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys  
100 105 110

Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly  
115 120 125

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

Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His  
145 150 155 160

Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg  
165 170 175

Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met  
180 185 190

Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg  
195 200 205

Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys



ES 2 659 147 T3

210		215		220															
Val	Ser	Ala	Met	Leu	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Ala	Pro	Glu	Gly	Thr	Pro				
225					230					235					240				
Lys	Glu	Gln	Ser	Ile	His	Ser	Arg	Gly	Thr	His	Ile	Leu	Thr	Pro	Glu				
				245					250					255					
Thr	Glu	Ala	Ser	Cys	His	Tyr	Phe	Phe	Gly	Ser	Ser	Arg	Asn	Phe	Gly				
			260					265					270						
Ile	Asp	Asp	Pro	Glu	Met	Asp	Gly	Val	Leu	Arg	Ser	Trp	Gln	Ala	Gln				
		275					280					285							
Ala	Leu	Val	Lys	Glu	Asp	Lys	Val	Val	Val	Glu	Ala	Ile	Glu	Arg	Arg				
	290					295					300								
Arg	Ala	Tyr	Val	Glu	Ala	Asn	Gly	Ile	Arg	Pro	Ala	Met	Leu	Ser	Cys				
305					310					315					320				
Asp	Glu	Ala	Ala	Val	Arg	Val	Ser	Arg	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu	Glu	Gln				
				325					330					335					
Leu	Glu	Ala	Ala																
			340																

- <210> 31
- <211> 1023
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <400> 31

ES 2 659 147 T3

```

atggccactt tegttagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttcttgagga gttgagcgag 60
aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgtca acctgacgga 120
gttgctgctg ccctgcttga tatttgctcg catcgcttgc ctccgttgag tgacgggtatt 180
ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggctctg aatttgacgg aggtggccag 240
tgtgtocaca acccgcacgg caacggagcc cgcctgctt ctctgaacgt gcgatcattc 300
cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctggcctg gagatccagc actcgcagat 360
ccgggtgcta tccctgactt tgggtgtcgt gttgatccag cttaccgtac tgtcggaggt 420
taaggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tcttgacac 480
gctcagtagc tgcaccgcgc taacgoccaa acagacgcct tccatagact tgagcgtgag 540
gtgatcgttg gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tccctggtgg cacaccctca 600
gttctcatgg ctaagttctt gcgtggtgct aacacaccag ttgacgcctg gaacgacatc 660
cgggtggaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcctcgcgg tcgcgcggga agggacgccg 720
aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc 780
tgccattact tcttcggtag ttcccgaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggt 840
gttctcagga gctggcaagc tcaagccctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct 900

atcgaaaggc ggagggotta cgtcgaagcg aacgggatca gacccgccat gttgtcctgc 960
gacgaggcag ccgtcagggt atccagggag attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg 1020

tga 1023

```

5 <210> 32  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <400> 32

ES 2 659 147 T3

Met Ala Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu  
1 5 10 15  
Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu  
20 25 30  
Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile  
35 40 45  
Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly  
50 55 60  
His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln  
65 70 75 80  
Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn  
85 90 95  
Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp  
100 105 110  
Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly  
115 120 125  
Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val  
130 135 140  
Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His  
145 150 155 160  
Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg  
165 170 175  
Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met  
180 185 190  
Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg  
195 200 205  
Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys  
210 215 220  
Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro  
225 230 235 240  
Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu  
245 250 255

ES 2 659 147 T3

Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly  
 260 265 270  
 Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln  
 275 280 285  
 Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg  
 290 295 300  
 Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys  
 305 310 315 320  
 Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln  
 325 330 335  
 Leu Glu Ala Ala  
 340

<210> 33  
 <211> 1020  
 <212> ADN  
 <213> *Pseudomonas maltophilia*  
 <400> 33

5

atgacottcg tccgcaatgc ctggtatgtg gcgggcgtgc ccgaggaact gtccgaaaag 60  
 ccgctcggcc ggaogattct cgacacaccg ctccgcctct accgccagcc cgacgggtgtg 120  
 gtcggggcgc tgctcgacat ctgtccgcac cgcttcgcgc cgctgagcga cggcatcctc 180  
 gtcaacggcc atctccaatg ccctatcac gggctggaat tcgatggcgg cgggcagtgc 240  
 gtccataacc cgcaocggcaa tggcgcccgc ccggcttcgc tcaacgtccg ctcttcccg 300  
 gtggtggagc gcgacgcgct gatctggatc tggcccggcg atccggcgct ggccgatcct 360  
 ggggcgatcc ccgacttcgg ctgcgcgctc gatcccgcct atcggaccgt cggcggctat 420  
 gggcatgtcg actgcaacta caagctgctg gtcgacaacc tgatggacct cggccacgcc 480  
 caatatgtcc atcgcgccaa cggccagacc gacgccttcg accggctgga gcgcgaggtg 540  
 atcgtcggcg acggtgagat acaggcgcgt atgaagattc ccggcggcac gccgagcgtg 600  
 ctgatggoca agttcctgcg cggcgccaat acccccgtcg acgcttgaa cgacatccgc 660  
 tggacaagg tgagcgcgat gctcaacttc atcgcgggtg cggcggagg caccocgaag 720  
 gagcagagca tccactcgcg cggtaacctat atcctgacct ccgagacgga ggcgagctgc 780  
 cattatttct tcggctcctc gcgcaatttc ggcatcgacg atccggagat ggacggcgtg 840  
 ctgcgcagct ggcaggctca ggcgctggtc aaggaggaca aggtcgtcgt cgaggcgtc 900  
 gagcgcgcc gcgcctatgt cgaggcgaat ggcacccgcc cggcgtatgct gtcgtgcgac 960  
 gaagcgcgag tccgtgtcag ccgcgagatc gagaagcttg agcagctcga agccgcctga 1020

10

<210> 34  
<211> 339  
<212> PRT  
<213> *Pseudomonas maltophilia*

5

<400> 34

ES 2 659 147 T3

Met Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu  
1 5 10 15  
Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu Ala  
20 25 30  
Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile Cys  
35 40 45  
Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly His  
50 55 60  
Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln Cys  
65 70 75 80  
Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn Val  
85 90 95  
Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp Pro  
100 105 110  
Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly Cys  
115 120 125  
Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val Asp  
130 135 140  
Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His Ala  
145 150 155 160  
Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg Leu  
165 170 175  
Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met Lys  
180 185 190  
Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg Gly  
195 200 205  
Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys Val  
210 215 220  
Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro Lys  
225 230 235 240  
Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu Thr  
245 250 255  
Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly Ile  
260 265 270  
Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln Ala  
275 280 285  
Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg Arg  
290 295 300  
Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys Asp  
305 310 315 320  
Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln Leu  
325 330 335  
Glu Ala Ala

ES 2 659 147 T3

<210> 35  
 <211> 1023  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<400> 35

```

atgctcacct tcgtccgcaa tgcttggat gtggcggcgc tgcccggagga actgtccgaa 60
aagccgctcg gccggacgat tctogacaca ccgctcgcgc tctaccgcca gcccgacggt 120
gtggctgcgg cgctgctcga catctgtccg caccgcttcg cgcgctgag cgacggcatc 180
ctcgtcaacg gccatctcca atgcccctat caccggcttg aattcgatgg cggcgggcag 240
tgcgctccata acccgcacgg caatggcgcc cgcgccgctt cgctcaacgt ccgctccttc 300
ccgggtggtgg agcgcgacgc gctgatctgg atctgtcccg gcgatccggc gctggccgat 360
cctggggcga tccccgactt cggctgccgc gtcgatcccg cctatcggac cgtcggcggc 420
tatgggcatg tcgactgcaa ctacaagctg ctggtcgaca acctgatgga cctcggccac 480
gccaatatg tccatcgcgc caacgcccag accgacgcct tcgaccggct ggagcgcgag 540
gtgatogtcg gcgacgggta gatacaggcg ctgatgaaga ttcccggcgg cacgcccgagc 600
gtgctgatgg ccaagttcct gcgcggcgcc aatacccccg tcgacgcttg gaacgacatc 660
cgctggaaca aggtgagcgc gatgctcaac ttcctcgcgg tggcgcggga aggcaccccc 720
aaggagcaga gcatccactc gcgcgggtacc catatcctga cccccgagac ggaggcggagc 780
tgccattatt tcttcggctc ctccgcgaat ttggcatcg acgatccgga gatggacggc 840
gtgctgcgca gctggcaggc tcaggcgcgtg gtcaaggagg acaaggtcgt cgtcggaggc 900
atcgagcgcg gccgcgccta tgtcggaggc aatggcatcc gcccggcgat gctgtcgtgc 960
gacgaagccg cagtcggtgt cagccgcgag atcgagaagc ttgagcagct cgaagccgcc 1020
tga 1023
    
```

10 <210> 36  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <400> 36

```

Met Leu Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu
1           5           10           15

Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu
20           25           30

Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile
35           40           45
    
```

ES 2 659 147 T3

Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly  
 50 55 60  
 His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln  
 65 70 75 80  
 Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn  
 85 90 95  
 Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys  
 100 105 110  
 Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly  
 115 120 125  
 Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val  
 130 135 140  
 Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His  
 145 150 155 160  
 Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg  
 165 170 175  
 Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met  
 180 185 190  
 Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg  
 195 200 205  
 Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys  
 210 215 220  
 Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly  
 260 265 270  
 Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln  
 275 280 285  
 Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg  
 290 295 300  
 Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys  
 305 310 315 320  
 Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln  
 325 330 335  
 Leu Glu Ala Ala  
 340

<210> 37  
 <211> 1023  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial



ES 2 659 147 T3

<400> 37

```

atgctcacct tcgttaggaa cgcttggtag gtcgcccctc tccctgagga gctgagcag 60
aagcccttgg gtcgcacccat cctagacact ccgcttagccc ttaccgcca gctgacggc 120
gtagtggcgg cctgtgttga catctgcccg cataggttcg ctccgctcag cgacggcatc 180
ctcgtcaacg ggcattctca gtgcccgtac cacgggctgg aatttgacgg cgggtggcag 240
tgtgtccaca acccgcacgg caacggcgca cggccagctt cctcaacgt taggtcgttc 300
cctgttgtcg agcgcgacgc actgatctgg atctggcctg gcgaccagc tctggccgat 360
ccaggagcca ttcccgaact cggttgcgcg gtggaccag cctatcgac ggtcggcggg 420
tacgggcaag tcgattgtaa ctataagctc cttgtggaca acctatgga ttggggccac 480
gctcagtaag tgcaccgggc taacgctcag actgacgcct ttgaccgtct cgaaaggag 540
gtcatcgtcg gcgacggaga gattcaggcg ctgatgaaga tccctggagg cacgccctct 600
gtgctcatgg cgaagtttct cagaggcgcg aacacgcccg tggacgcctg gaacgacatc 660
cgctggaata aggtctccgc gatgctgaac ttcacgcgcg ttgcgcccga gggcacacc 720
aaagagcagt caatccacag cagagggacc catattctta caccggaac cgaggctagt 780
tgccactact tcttcggctc gtcacggaat ttcgggatag acgatccgga gatggacggg 840
gttcttcgat cttggcaagc gcaagctctc gtcaaggaag ataagtggt cgtggaggct 900
atcgagcgtg ggcgcgccta cgttgaggcg aacggatta ggcccgcgat gctgtcctgc 960
gacgaggccg cagttagagt gtcgcgcgag atagaaaagc tggagcagct agaggccgcc 1020
tga 1023

```

5 <210> 38  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <400> 38



ES 2 659 147 T3

Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly  
 115 120 125

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

Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His  
 145 150 155 160

Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg  
 165 170 175

Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met  
 180 185 190

Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg  
 195 200 205

Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys  
 210 215 220

Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro  
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu  
 245 250 255

Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly  
 260 265 270

Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln  
 275 280 285

Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg  
 290 295 300

Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys  
 305 310 315 320

Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln  
 325 330 335

Leu Glu Ala Ala  
 340

<210> 39  
 <211> 1023  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<400> 39

ES 2 659 147 T3

```

atggccacct tegttaggaa cgectggtac gtcgcogctc tcctgagga gctgagcgag 60
aagcccttgg gtgcacccat cotagacact cggtagccc tttaccgcca gcctgacggc 120
gtagtggcgg ccctgcttga catctgccc gataggttgg ctccgctcag cgacggcatc 180
ctcgtcaacg ggcattctca gtgcccgtac cacgggctgg aatttgacgg cggtagggcag 240
tgtgtccaca acccgcacgg caacggcgca cggccagctt ccctcaacgt taggtcgttc 300

cctgttgtcg agcgcgacgc actgatctgg atctggcctg ggcaccagc tctggccgat 360
ccaggagcca ttcccgactt cggttgcgc gtggaccag cctatcggac ggtcggcggg 420
tacgggcacg tcgattgtaa ctataagctc cttgtggaca accttatgga tttgggccac 480
gctcagtacg tgcaccgggc taacgctcag actgaogcct ttgaccgtct cgaaagggag 540
gtcatcgtcg ggcacggaga gattcaggcg ctgatgaaga tccttgaggg cacgcctct 600
gtgctcatgg cgaagtttct cagagggcgc aacacgccc tggacgcctg gaacgacatc 660
cgctggaata aggtctcgc gatgctgaac ttcatcgcg ttgogccga gggcacaccc 720
aaagagcagt caatccacag cagagggacc catattotta caccgaaac cgaggctagt 780
tgccactact tcttcggctc gtcacggaat ttcgggatag acgatccgga gatggacggg 840
gttcttcgat cttggcaagc gcaagctctc gtcaaggaag ataaggtggg cgtggaggct 900
atcgagcgta ggcgcgccta cgttgaggcg aacgggatta ggcccgcgat gctgtcctgc 960
gacgaggccg cagttagagt gtcgcgcgag atagaaaagc tggagcagct agaggccgcc 1020
tga 1023

```

5  
<210> 40  
<211> 340  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<400> 40

ES 2 659 147 T3

Met Ala Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu  
 1 5 10 15

Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu  
 20 25 30

Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile  
 35 40 45

Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly  
 50 55 60

His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln  
 65 70 75 80

Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn  
 85 90 95

Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp  
 100 105 110

Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly  
 115 120 125

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

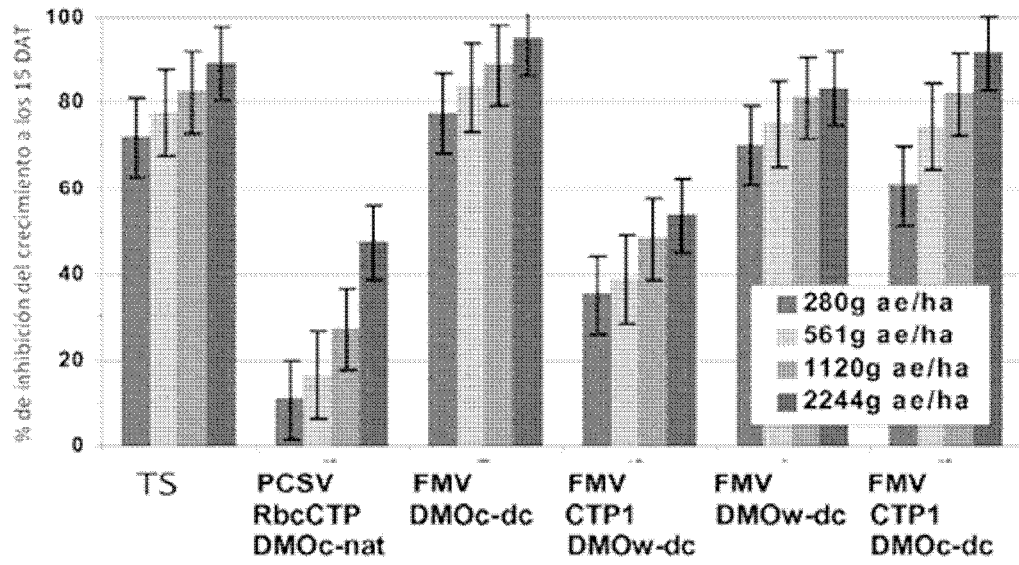
Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His  
 145 150 155 160

Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una dicamba monooxigenasa, en la que la secuencia de ADN que codifica el péptido de tránsito al cloroplasto comprende la SEQ ID NO: 17 y en la que la secuencia de ADN que codifica la dicamba monooxigenasa codifica un polipéptido seleccionado de entre las SEQ ID NO: 26, 28, 32, 34, 36, 38, y 40.
2. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que la secuencia de ADN que codifica la dicamba monooxigenasa se selecciona de entre las SEQ ID NO: 25, 27, 31, 33, 35, 37, y 39.
- 10 3. Una construcción de ADN que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 1 unida operativamente a un promotor.
4. La construcción de ADN de la reivindicación 3, en la que el promotor
- 15 (i) se selecciona de un promotor FMV35S, un promotor At.ANT1, un promotor FMV.35S-EF1a, un promotor eIF4A10, un promotor AGRtu.nos, un promotor triosa fosfato isomerasa citosólica (OsTPI) de arroz, un promotor del gen 15 de actina (OsAct15) de arroz, y un promotor gama coixina; o
- (ii) es funcional en una célula vegetal.
5. Una célula vegetal transformada con la construcción de ADN de la reivindicación 3 y un cultivo tisular vegetal que comprende dicha célula vegetal, en la que la célula vegetal es una célula vegetal de monocotiledónea.
6. La célula vegetal o cultivo tisular vegetal de la reivindicación 5, en la que la célula vegetal es una célula vegetal de maíz.
- 20 7. Una planta transgénica transformada con la construcción de ADN de la reivindicación 3, en la que la planta es una planta monocotiledónea.
8. La planta transgénica de la planta de la reivindicación 7, en la que la planta es una planta de maíz.
9. Un procedimiento de producción de una planta tolerante a dicamba que comprende la introducción de la construcción de la reivindicación 3 en una célula vegetal y la regeneración de una planta a partir de la misma que comprende la construcción de la reivindicación 3.
- 25 10. Un procedimiento para la expresión de dicamba monooxigenasa en una célula vegetal que comprende el cultivo de una planta que comprende una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad pequeña de péptido de tránsito al cloroplasto, unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una dicamba monooxigenasa, expresando de esta manera la dicamba monooxigenasa, en la que la secuencia de nucleótido que codifica la subunidad pequeña del péptido de tránsito al cloroplasto comprende la SEQ ID NO: 17.
- 30 11. Una semilla tolerante a la dicamba para la provisión de protección contra la aplicación pre-germinación de dicamba que comprende un ADN que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto unido operativamente a un ADN que codifica una dicamba monooxigenasa, en la que el ADN que codifica el péptido de tránsito al cloroplasto comprende la SEQ ID NO: 17.
- 35 12. La semilla tolerante a la dicamba de la reivindicación 11, en la que el ADN que codifica una dicamba monooxigenasa comprende una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 26, 28, 32, 34, 36, 38, y 40.
- 40 13. El uso de una planta o parte de una planta de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 u 8 o una semilla de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 o 12, para la preparación de un alimento, un pienso, fibra, o un producto industrial, en el que el alimento o pienso es un grano, harina integral, aceite, almidón, harina, o proteína, el producto industrial es un biocombustible, fibra, un producto químico industrial, un producto farmacéutico, o un nutracéutico.



	Nombre de la construcción	Promotor	CTP	DMO	3' UTR
1	TS de control	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
2	pMON68933	PCISV	PsRbcS con 27 aminoácidos extra	DMOc-nat	RbcS2-E9
3	pMON73690	FMV	Ninguno	DMOc-dc	RbcS2-E9
4	pMON73696	FMV	AtRbcS (CTP1)	DMOw-dc	RbcS2-E9
5	pMON73697	FMV	Ninguno	DMOw-dc	RbcS2-E9
6	pMON73698	FMV	AtRbcS (CTP1)	DMOc-dc	RbcS2-E9

FIG. 1