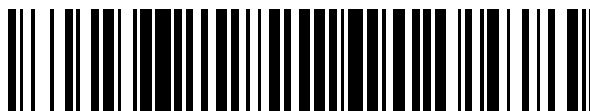


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 481**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
A01H 5/00 (2008.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
A01N 57/20 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2013 PCT/US2013/024410**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13116700**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2013 E 13744288 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2809147**

54 Título: **Plantas resistentes al glifosato y métodos asociados**

30 Prioridad:

01.02.2012 US 201261593555 P
17.04.2012 US 201261625222 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2019

73 Titular/es:

DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, US

72 Inventor/es:

LIRA, JUSTIN M.;
CICCHILLO, ROBERT M.;
YERKES, CARLA y
ROBINSON, ANDREW E.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 716 481 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

Plantas resistentes al glifosato y métodos asociados

Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a biotecnología vegetal. Las realizaciones particulares se refieren a nuevos polipéptidos implicados en el metabolismo de la N-(fosfonometil) glicina y a ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos. Las realizaciones particulares se refieren a plantas, partes de plantas y células de plantas que comprenden unos polipéptidos y/o ácidos nucleicos anteriores.

Antecedentes

10 Las especies de malezas han sido durante mucho tiempo un problema en los campos de cultivo. Aunque el control de malezas puede ser una operación que requiere mucha mano de obra, se ha hecho más fácil gracias a la disponibilidad de herbicidas químicos eficaces para eliminar las malezas. El uso generalizado de herbicidas, junto con variedades mejoradas de cultivos y fertilizantes, ha contribuido significativamente a la "revolución verde" en la agricultura. Herbicidas particularmente útiles son aquellos que tienen un amplio espectro de actividad herbicida. Por desgracia, los herbicidas de amplio espectro tienen típicamente un efecto perjudicial sobre las plantas de cultivo expuestas al herbicida. Una forma de superar este problema es producir plantas de cultivo que sean tolerantes al herbicida de amplio espectro.

20 Un ejemplo de un herbicida de amplio espectro es la N-fosfonometil-glicina, también conocida como glifosato. El glifosato ha sido utilizado ampliamente por los agricultores de todo el mundo para controlar las malezas antes de la siembra de cultivos, por ejemplo en la agricultura sin labranza. Además, el glifosato es un medio eficaz para controlar las malezas y las plantas voluntarias entre ciclos de producción o rotaciones de cultivos. El glifosato no se arrastra de los suelos después de su uso, y se considera en general como uno de los herbicidas químicos más seguros para el medio ambiente y más efectivos para la agricultura.

25 El glifosato mata a las plantas inhibiendo la ruta del ácido shikímico. Esta ruta conduce a la biosíntesis de compuestos aromáticos, incluyendo los aminoácidos, las vitaminas y las hormonas vegetales. El glifosato bloquea la condensación del ácido fosfoenolpirúvico (PEP) y del ácido 3-fosfoshikímico para dar ácido 5-enolpiruvil-3- fosfoshikímico mediante la unión de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, e inhibición de su actividad, comúnmente conocida como "EPSP sintetasa" y " EPSPS".

30 Desgraciadamente, no se conocen plantas de cultivo que sean por naturaleza tolerantes al glifosato y, por tanto, la utilidad de este herbicida para el control de malezas en cosechas cultivadas ha sido limitada. Un método para producir plantas de cultivo tolerantes al glifosato es introducir un gen que codifica una forma heteróloga tolerante al glifosato de un gen de EPSPS en la planta de cultivo, utilizando las técnicas de ingeniería genética. Usando mutagénesis química, se han producido formas de EPSPS tolerantes al glifosato en bacterias, y se introdujeron genes heterólogos en las plantas para producir plantas tolerantes al glifosato. Véase, por ejemplo, Comai et al. (1983) Science 221: 370 - 71. Los genes heterólogos de EPSPS se pueden sobreexpresar en las plantas de cultivo para obtener un nivel de tolerancia deseado. La entrada de la base de datos UniProt con el número de acceso de la base de datos nº B5HND8 describe una secuencia de polipéptidos de una sintasa de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSPS) de *Streptomyces* *sviceus*. Haghani K. et al., "Comparative studies of wild type *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimato 3-phosphate synthase with three glyphosate-insensitive mutated forms: Activity, stability and structural characterization", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, Elsevier, Netherlands, vol. 1784, nº 9, pp 1167 - 1175, describe tres formas mutadas insensibles al glifosato de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Escherichia coli*. El documento WO2010/078156 A1 describe algas resistentes a herbicidas, *Chlamydomonas reinhardtii*, que expresan formas mutantes de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Escherichia coli*. Pollegioni L. et al., "Molecular basis of glyphosate resistance - different approaches through protein engineering", *FEBS Journal*, vol. 278, nº 16, pp 2753 - 2766, describe formas mutadas insensibles al glifosato de la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de varios organismos que incluyen *Escherichia coli*.

Los ejemplos anteriores de la técnica relacionada y las limitaciones relacionadas con los mismos pretenden ser ilustrativos y no excluyentes. Otras limitaciones de la técnica relacionada se harán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de la memoria descriptiva.

Descripción de la invención

50 La invención se define en las reivindicaciones. En este documento se describen polipéptidos aislados que tienen al menos un 90% de identidad con la SEC ID NO: 1, y ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad con la SEC ID NO: 1 (por ejemplo, SEC ID NO: 2-4).

55 También se describen plantas, partes de plantas, órganos de plantas, semillas de plantas y células vegetales que comprenden un polipéptido heterólogo que tiene al menos un 90% de identidad con la SEC ID NO: 1. En particular, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que confiere a una planta la tolerancia al glifosato, en donde la EPSPS

es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 y, cuando se alinea con la SEC ID NO: 1, comprende una alanina en la posición correspondiente a la posición 84 de la SEC ID NO: 1, en donde el polinucleótido es una secuencia sintética que ha sido diseñada para la expresión en una planta seleccionada entre el grupo formado por:

5 un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 3; y

un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con otro ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 3 en condiciones de rigor alto,

10 en donde el polinucleótido está unido operativamente a un promotor, en donde preferiblemente el promotor está dirigiendo la expresión de un gen.

Algunas realizaciones incluyen una planta transgénica tolerante al glifosato, parte de la planta, órgano de la planta, semilla de la planta y/o célula vegetal que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que confiere a una planta la tolerancia al glifosato, en donde la EPSPS es al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 y cuando está alineada con la SEC ID NO: 1 comprende una alanina en la posición correspondiente a la posición 84 de la SEC ID NO: 1, en donde el polinucleótido es una secuencia sintética que ha sido diseñada para la expresión en una planta seleccionada entre el grupo que consiste en:

15 un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 3; y

20 un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con otro ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 3 en condiciones de rigor alto,

en donde el polinucleótido está unido operativamente a un promotor, en donde preferiblemente el promotor está dirigiendo la expresión de un gen.

25 En otras realizaciones, la descripción se refiere a métodos para generar una planta, parte de planta, órgano de planta, semillas de planta y/o células vegetales resistentes al glifosato, que comprenden: transformar una planta, una parte de la planta, un órgano de la planta, una semilla de la planta y/o células vegetales con una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que confiere a una planta tolerancia al glifosato, en donde la EPSPS es al menos un 90% idéntica con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 y cuando se alinea con la SEC ID NO: 1 comprende una alanina en la posición correspondiente a la posición 84 de la SEC ID NO: 1, en donde el polinucleótido es una secuencia sintética que se ha diseñado para la expresión en una planta seleccionada entre el grupo que consiste en:

30 un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 3; y

35 un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con otro ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 3 en condiciones de rigor alto,

en donde el polinucleótido está unido operativamente a un promotor, en donde preferiblemente el promotor está dirigiendo la expresión de un gen.

40 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a un cultivo de tejido de células vegetales regenerables tolerantes al glifosato, que comprenden la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con lo precedente. Tal cultivo de tejidos puede ser capaz de regenerar plantas que tienen las características fisiológicas y morfológicas de las anteriores plantas resistentes al glifosato, y también de plantas regeneradoras que tienen sustancialmente el mismo genotipo que las plantas resistentes al glifosato. Las células regenerables de plantas tolerantes al glifosato en tales cultivos de tejidos pueden ser, por ejemplo, embriones, protoplastos, células meristemáticas, callos, polen, hojas, anteras, raíces, puntas de la raíz, flores, semillas, vainas y tallos. Realizaciones particulares se refieren a plantas transgénicas tolerantes al glifosato regeneradas a partir de un cultivo de tejido de acuerdo con lo precedente.

45 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a células vegetales transgénicas tolerantes al glifosato que no son regenerables para producir plantas, por ejemplo para su uso en la producción de líneas de células vegetales resistentes al glifosato. En otras realizaciones la descripción se refiere a plantas transgénicas tolerantes al glifosato que comprenden en parte tales células.

50 En otras realizaciones, la presente descripción se refiere a métodos y composiciones para hacer y usar una planta que es tolerante a más de un herbicida o de una clase o subclase de herbicida, como se describe más adelante. En algunas formas de realización particulares, se proporciona una planta que es tolerante al glifosato y al menos a otro herbicida (o clase o subclase de herbicida) o producto químico (o clase o subclase de producto químico) (por ejemplo, fungicidas, insecticidas, reguladores del crecimiento de plantas y similares). Tales plantas pueden encontrar

aplicación, por ejemplo, en métodos que comprenden el tratamiento de plantas de cultivo con múltiples herbicidas. Por lo tanto, la descripción proporciona plantas resistentes a herbicidas que toleran el tratamiento con un herbicida o una combinación de herbicidas (incluida una combinación de herbicidas que actúan a través de un modo diferente de actividad herbicida) o que toleran el tratamiento con una combinación de al menos un herbicida y al menos otro producto químico. De esta manera, la descripción describe métodos mejorados para cultivar plantas de cultivo en las que las malezas se controlan selectivamente.

Una planta resistente a los herbicidas de acuerdo con algunas realizaciones puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo que confiere tolerancia al glifosato y una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere tolerancia al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). De acuerdo con los párrafos anteriores, se proporcionan plantas que comprenden al menos una tercera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que imparte a la planta un rasgo seleccionado entre el grupo que consiste en un rasgo de tolerancia a herbicidas; un rasgo de resistencia a los insectos; un rasgo agronómico; un rasgo de resistencia a las enfermedades; un rasgo de ácido graso modificado; y un rasgo de fitato reducido.

En algunos ejemplos, una planta resistente a un herbicida comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido que confiere tolerancia al glifosato y una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere tolerancia al glufosinato. Algunos ejemplos incluyen una planta resistente a los herbicidas, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que imparte a la planta un rasgo seleccionado entre el grupo que consiste en un rasgo de tolerancia al herbicida; un rasgo de resistencia a los insectos; un rasgo agronómico; un rasgo de resistencia a la enfermedad; un rasgo de ácido graso modificado; y un rasgo de fitato reducido.

En ejemplos particulares, una planta resistente a un herbicida comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido que confiere tolerancia al glifosato y una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere tolerancia a un herbicida que inhibe la acetolactato sintasa (ALS) (Lee et al. (1988) EMBOJ. 7: 1241), también conocida como enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) (Miki et al. (1990) Theor. Appl. Genet. 80: 449). Algunos ejemplos incluyen una planta resistente a los herbicidas que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que imparte a la planta un rasgo seleccionado entre el grupo que consiste en un rasgo de tolerancia a herbicidas; un rasgo de resistencia a los insectos; un rasgo agronómico; un rasgo de resistencia a las enfermedades; un rasgo de ácido graso modificado; y un rasgo de fitato reducido.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede combinarse (o "apilarse") en una planta con cualquier otra molécula de ácido nucleico, por ejemplo, y sin que sea limitante, para proporcionar resistencia o tolerancia adicionales al glifosato o a otro herbicida, para proporcionar resistencia a insectos o enfermedades seleccionados, para proporcionar mejoras nutricionales, para proporcionar mejores características agronómicas, y para proporcionar una proteína u otro producto útil en piensos, alimentos, usos industriales, usos farmacéuticos y/u otros usos. Los ejemplos incluyen el apilamiento de dos o más ácidos nucleicos de interés dentro del genoma de una planta. Tal "pila de genes" puede conseguirse a través del desarrollo de plantas convencional utilizando dos o más eventos, la transformación de una planta con un constructo que contiene las secuencias de interés, la re-transformación de una planta transgénica o la adición de nuevos rasgos a través de la integración dirigida vía recombinación homóloga. Ejemplos particulares de tal apilamiento incluyen cualquier combinación de los siguientes: un ácido nucleico *dgt-28*; un ácido nucleico *Cry34Ab1*; un ácido nucleico *Cry35Ab1*; un ácido nucleico *Cry1F*; un ácido nucleico *Cry1Ac*; un ácido nucleico *aad-12*; un ácido nucleico *aad-1*; un ácido nucleico *pat*; y un ácido nucleico *DSM-2*.

Además de los aspectos y realizaciones ejemplares descritos anteriormente, se harán evidentes otros aspectos y realizaciones adicionales por el estudio de las siguientes descripciones.

Breve descripción de las figuras

La Fig.1 incluye una alineación de secuencia parcial de enzimas EPSP sintasas ejemplares (es decir, DGT-28, DGT-32, DGT-33, y otras). Los tres ejemplos de estas enzimas DGT comparten una alanina conservada en la posición de aminoácido 96 de la enzima *aroA* EPSP sintasa. La ubicación de este aminoácido está indicada por un asterisco, y el resto de aminoácido está subrayado.

La Fig. 2 incluye una alineación de enzimas DGT ejemplares (es decir, DGT-1, DGT-3 y DGT-7). La ubicación de un resto de aminoácido mutado que fue cambiado de una glicina por una alanina está indicada por el primer asterisco. La ubicación de un segundo resto de aminoácido mutado que fue cambiado de una treonina por una isoleucina está indicada por el segundo asterisco. La ubicación de un tercer resto de aminoácido mutado que fue cambiado de una prolina por una a serina está indicada por el tercer asterisco.

Las Figs. 3-30 incluyen mapas de diversos plásmidos ejemplares: pDAB107527 (Fig. 3); pDAB105530 (Fig. 4); pDAB105531 (Fig. 5); pDAB105532 (Fig. 6); pDAB105533 (Fig. 7); pDAB105534 (Fig. 8); pDAB4104 (Fig. 9); pDAB102715 (Fig. 10); pDAB107532 (Fig. 11); pDAB107534 (Fig. 12); pDAB102785 (Fig. 13); pDAB100445 (Fig. 14); pDAB102946 (Fig. 15); pDAB100469 (Fig. 16); pDAB102028 (Fig. 17); pDAB102029 (Fig. 18); pDAB102032 (Fig. 19); pDAB102034 (Fig. 20); pDAB100429 (Fig. 21); pDAB100442 (Fig. 22); pDAB100430 (Fig. 23); pDAB102036 (Fig. 24); pDAB102038 (Fig. 25); pDAB102040 (Fig. 26); pDAB102042 (Fig. 27); pDAB107712 (Fig. 28); pDAB107713 (Fig. 29); y pDAB107714 (Fig. 30).

La Fig. 31 incluye los valores de IC50 obtenidos después de la introducción de varias mutaciones dentro de DGT-1 (A) y DGT-7 (B) usando 1 mM de PEP. Tanto para curvas de IC50 de la Fig. 31 (A) como para las de la Fig. 31 (B), los triángulos cerrados representan tipo silvestre, los círculos cerrados representan mutantes GA, los cuadrados abiertos representan mutantes GAPS y los cuadrados cerrados representan mutantes TIPS. Las figs. 32-46 incluyen mapas de diversos plásmidos ejemplares: pDAB102719 (Fig. 32); pDAB102718 (Fig. 33); pDAB107663 (Fig. 34); pDAB107664 (Fig. 35); pDAB107665 (Fig. 36); pDAB107666 (Fig. 37); pDAB109812 (Fig. 38); pDAB101556 (Fig. 39); pDAB107698 (Fig. 40); pDAB108384 (Fig. 41); pDAB108385 (Fig. 42); pDAB108386 (Fig. 43); pDAB108387 (Fig. 44); pDAB102716 (Fig. 45); pDAB102717 (Fig. 46); pDAB110828 (Fig. 47); pDAB110827 (Fig. 48); pDAB107545 (Fig. 49); pDAB107548 (Fig. 50); pDAB107553 (Fig. 51); pDAB102792 (Fig. 52); pDAB107602 (Fig. 53); y pDAB107533 (Fig. 54).

Modo(s) para llevar a cabo la invención

I. Perspectiva general.

La invención se define en las reivindicaciones. En el presente documento se describen nuevos polipéptidos implicados en el metabolismo de N-(fosfonometil) glicina y ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos. En algunos ejemplos, dicho polipéptido confiere la tolerancia al glifosato (o la aumenta) en una célula vegetal en donde el polipéptido se expresa de forma heteróloga, por ejemplo sin afectar adversamente a la unión de EPSP sintasa con su sustrato natural, fosfoenolpiruvato (PEP).

II. Términos.

Para aclarar mejor la amplitud de esta descripción, se proporcionan las siguientes definiciones, términos y abreviaturas específicas.

A menos que se defina específicamente otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la técnica. A menos que se indique otra cosa en el contexto en el que aparece, un término singular incluirá los plurales, y se entenderá que los términos plurales incluyen el singular. Así, los artículos indefinidos "un" y "una", usados precediendo a un elemento o componente, son no restrictivos con respecto al número de instancias (es decir, ocurrencias) del elemento o del componente. Cuando se proporcionan rangos de valores numéricos en el presente documento (por ejemplo, "menos que aproximadamente X", "menos que X" y "por ejemplo, X_1 ... y X_2 "), se entiende que los rangos incluyen todos los valores y rangos de valores incluidos dentro del rango proporcionado, como si estos valores y rangos incluidos hubieran sido citados expresamente.

Como se usan en el presente documento, los términos "que comprende", "que incluyen", "que tienen" y "que contienen", y sus variaciones, están abiertos (es decir, no son excluyentes). Por ejemplo, una composición o método que comprende una lista de elementos no está necesariamente limitado a solo esos elementos. Dicha composición o método puede (o no) incluir otros elementos no listados expresamente o inherentes a la composición o al método. Además, a menos que se indique expresamente otra cosa, "o" se utiliza en el sentido inclusivo (y no exclusivo). Por ejemplo, una condición "A o B" es satisfecha por cualquiera de las siguientes: A es verdadera (o presente) y B es falsa (o no presente); A es falsa (o no presente) y B es verdadera (o presente); y tanto A como B son verdaderas (o presentes).

Planta: como se usa en el presente documento, el término "planta" incluye una planta completa y cualquier descendiente, célula, tejido o parte de una planta. La expresión "partes de la planta" incluye cualquier parte o partes de una planta, incluyendo, por ejemplo y sin limitación: semilla (incluyendo semilla madura y semilla inmadura); una planta de corte; una célula vegetal; un cultivo de células vegetales; un órgano vegetal (p. ej., polen, embriones, flores, frutos, brotes, hojas, raíces, tallos y explantes. Un tejido u órgano vegetal puede ser una semilla, protoplasto, callo, o cualquier otro grupo de células vegetales que se organiza en una unidad estructural o funcional. Un cultivo de células o tejidos vegetales puede ser capaz de regenerar una planta que tiene las características fisiológicas y morfológicas de la planta a partir de la cual se obtuvieron las células o tejidos y de regenerar una planta que tenía sustancialmente el mismo genotipo que la planta. En cambio, algunas células vegetales no pueden regenerarse para producir plantas. Células regenerables en una célula vegetal o tejido de cultivo pueden ser embriones, protoplastos, células meristemáticas, callos, polen, hojas, anteras, raíces, puntas de raíces, seda, flores, granos, espigas, mazorcas, cáscaras o tallos.

Las partes de la planta incluyen partes cosechables y partes útiles para la propagación de las plantas de progenie. Las partes de la planta útiles para la propagación incluyen, por ejemplo y sin ser limitación: semilla; fruta; esqueje; muda; un tubérculo; y un portainjerto. Una parte cosechable de una planta puede ser cualquier parte útil de una planta, incluyendo, por ejemplo y sin limitación: flor; polen; plantón; tubérculo; hoja; tallo; fruta; semilla; y raíz.

Una célula vegetal es la unidad estructural y fisiológica de la planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. Una célula vegetal puede estar en forma de una sola célula aislada, o un agregado de células (por ejemplo, un callo friable y una célula cultivada), y puede ser parte de una unidad organizada superior (por ejemplo, un tejido vegetal, un órgano vegetal y una planta). Así, una célula vegetal puede ser un protoplasto, una célula productora de gametos, o una célula o colección de células que pueden regenerarse en una planta completa. Como tal, una semilla que comprende múltiples células vegetales y es capaz de regenerarse en una planta completa, se considera una "célula

vegetal" en realizaciones del presente texto.

Resistencia/tolerancia a los herbicidas: Cuando se hace referencia a plantas que son resistentes o tolerantes al glifosato, se entiende que una aplicación de una cantidad de glifosato en la planta no afecta significativamente o mata a la planta, en donde una planta de tipo silvestre de la misma especie se vería significativamente afectada y/o mataría por la aplicación de la cantidad de glifosato. Una planta puede ser por naturaleza tolerante a un herbicida en particular, o una planta puede ser tolerante a un herbicida como resultado de ingeniería genética, como por ejemplo, la cría selectiva; la transformación genética y/o la introducción de un transgén en el genoma de la planta. Una "planta resistente al glifosato" se refiere a una planta que contiene un polipéptido o una molécula de ácido nucleico que confiere tolerancia a los herbicidas cuando se proporciona a una planta heteróloga u otro organismo que lo exprese (es decir, que hace que una planta u otro organismo sea tolerante a los herbicidas).

Una planta que es resistente o tolerante al glifosato puede mostrar algo de impacto mínimo de la aplicación de glifosato a la planta. Por ejemplo, puede haber una alteración en el crecimiento y desarrollo normal de la planta, en donde la planta puede exhibir signos o síntomas que están asociados con estrés o enfermedad. Tal mínimo impacto resultante de la aplicación de glifosato a plantas que son resistentes o tolerantes al glifosato contrasta con el impacto adverso que resulta de la aplicación de glifosato a las plantas que son susceptibles al glifosato. Un experto en la técnica puede distinguir entre plantas que son resistentes al glifosato y plantas que son susceptibles al glifosato. La aplicación de glifosato a plantas que comprenden un ácido nucleico que confiere tolerancia al glifosato tiene como resultado un impacto significativamente menor que la aplicación de la misma cantidad de glifosato a una planta de la misma especie que no comprende una molécula de ácido nucleico que confiere tolerancia al glifosato.

Una planta que es tolerante a un herbicida u otro producto químico muestra una tolerancia mejorada en comparación con una planta testigo o de control apropiada. El daño que resulta de un tratamiento con herbicida u otro tratamiento químico puede establecerse evaluando cualquier parámetro de crecimiento o bienestar de la planta. Tales parámetros son conocidos por los expertos en la técnica, y su selección es a discreción del profesional experto. El daño a las plantas se puede establecer mediante inspección visual y/o mediante análisis estadísticos de uno o más parámetros adecuados del crecimiento o el bienestar de las plantas en plantas individuales o en uno o más grupos de plantas. Por tanto, el daño puede establecerse evaluando parámetros que incluyen, por ejemplo y sin limitación: altura de la planta; peso de la planta; color de las hojas; longitud de las hojas; floración; fertilidad; floración femenina; rendimiento; y producción de semilla. El daño también puede ser establecerse evaluando el tiempo transcurrido hasta una etapa particular de desarrollo (por ejemplo, floración femenina, floración y emisión de polen), o el tiempo transcurrido hasta que una planta se ha recuperado del tratamiento con un producto químico y/o herbicida en particular.

Al realizar evaluaciones de daños, los valores pueden asignarse a grados particulares de daño para que se puedan realizar los análisis estadísticos o comparaciones cuantitativas. El uso de rangos de valores para describir grados particulares de daño es conocido en la técnica, y se puede usar cualquier rango o escala adecuados. Por ejemplo, pueden ser asignadas puntuaciones de daños del herbicida (también llamadas puntuaciones de tolerancia). En consecuencia, la tolerancia a los herbicidas también puede estar indicada por otras clasificaciones en esta escala, donde una planta de control apropiada (o grupo de plantas de control) presenta una puntuación estadísticamente más baja en la escala en respuesta a un tratamiento herbicida que un grupo de plantas en cuestión.

El daño causado por un herbicida u otro producto químico se puede evaluar en varios momentos después de que una planta ha sido tratada con un herbicida. A menudo el daño se evalúa aproximadamente en el momento en que la planta de control presenta el daño máximo. A veces, el daño se evalúa después de un período de tiempo durante el cual una planta de control que no fue tratada con herbicida u otro producto químico ha crecido y/o se ha desarrollado de manera medible en comparación con el tamaño o la etapa en la que se realizó el tratamiento administrado. El daño puede evaluarse en cualquiera de los muchos momentos adecuados, por ejemplo, a las 12 horas; en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y/o 14 días; a las 3 y/o 4 semanas o más, después de ser tratada con herbicida una planta en cuestión. Cualquier tiempo de evaluación es adecuado siempre que permita detectar una diferencia en la respuesta a un tratamiento de plantas de prueba y control.

Un herbicida no "afecta significativamente" a una planta cuando no tiene efecto sobre la planta, cuando tiene algún efecto en la planta del cual la planta se recupera más tarde, o bien cuando tiene un efecto en la planta que es perjudicial pero que es compensado, por ejemplo, por el impacto sobre las malezas del herbicida en particular. Así, por ejemplo, una planta de cultivo no puede ser "significativamente afectada" por un herbicida u otro tratamiento si la planta presenta menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 9%, menos de aproximadamente el 8%, menos de aproximadamente el 7%, menos de aproximadamente el 6%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2% o menos de aproximadamente el 1% de disminución, en al menos un parámetro adecuado que sea indicativo de la salud y/o la productividad de la planta, en comparación con una planta testigo o de control (por ejemplo, una planta de la misma especie no tratada). En realizaciones particulares, una planta es tolerante a un herbicida u otro producto químico si muestra daño en comparación con una planta de control apropiada que es menor que el daño presentado por la planta de control en al menos un 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% o 1.000% o más. Una planta de cultivo que no es significativamente afectada por un herbicida u otro tratamiento puede mostrar una disminución en al menos un parámetro, pero la disminución es

de naturaleza temporal, y la planta se recupera completamente al cabo de, por ejemplo, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, o aproximadamente 6 semanas. En realizaciones particulares, una planta que es tolerante a un herbicida u otro producto químico puede caracterizarse por el hecho de que la planta no esté afectada significativamente por la aplicación del herbicida u otro producto químico.

Los parámetros adecuados que son indicativos de la salud y/o la productividad de la planta incluyen, por ejemplo, y sin que sean limitantes: altura de la planta; peso de la planta; longitud de la hoja; tiempo transcurrido hasta una fase particular de desarrollo; floración; rendimiento; y producción de semilla. La evaluación de un parámetro se puede realizar mediante inspección visual y/o análisis estadístico del parámetro. Una vez evaluada en una planta en cuestión y una planta de control, puede hacerse una comparación para determinar si la planta en cuestión se ve afectada significativamente por el herbicida u otro tratamiento, en su caso.

Las plantas de control apropiadas que pueden usarse para determinar la resistencia a un herbicida (u otro producto químico) incluyen plantas de la misma especie que no comprenden un ácido nucleico y/o polipéptido putativo de tolerancia a herbicidas heterólogos, y plantas que sí comprenden el supuesto ácido nucleico y/o polipéptido de tolerancia a herbicidas heterólogos, pero que no han sido tratados con el herbicida.

Herbicida: Un "herbicida" es un producto químico que causa a una planta una lesión temporal o permanente. Ejemplos no limitantes de herbicidas se enumeran y analizan con más detalle en otra parte de este documento. Un herbicida puede ser incorporado en una planta o sus células, o puede actuar sobre la planta o células sin ser incorporado. Un "ingrediente activo" es un producto químico de una formulación herbicida que es responsable de la fitotoxicidad de la formulación. Los ingredientes activos en las formulaciones de herbicidas comerciales se identifican típicamente como ingrediente activo en la etiqueta del producto. La información de la etiqueta del producto está disponible en la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. y se actualiza *on line* en oaspub.epa.gov/pestlabl/ppls.own. La información de la etiqueta del producto también está disponible *on line* en www.cdms.net.

Cuando se usa en relación con un herbicida, la expresión "equivalente de ácido" se refiere a la tasa o cantidad como ácido parental activo como herbicida.

Aislado: un componente biológico "aislado" (como un ácido nucleico o un polipéptido) ha sido sustancialmente separado, producido aparte o purificado de otros componentes biológicos de la célula del organismo en el que el componente se presenta de forma natural (es decir, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, y proteínas), mientras que efectúa un cambio químico o funcional en el componente (por ejemplo, un ácido nucleico puede aislarse de un cromosoma) rompiendo enlaces químicos que conectan el ácido nucleico con el ADN restante en el cromosoma). Las moléculas de ácido nucleico y las proteínas que han sido "aisladas" incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas por métodos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por expresión recombinante en una célula hospedadora, así como moléculas de ácido nucleico, proteínas y péptidos sintetizados químicamente.

Ácido nucleico: los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente en el presente texto, y abarcan un ácido nucleico singular; ácidos nucleicos plurales; un fragmento de ácido nucleico, variante o derivado del mismo; y un constructo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) y ADN plasmídico (ADNp)). Un polinucleótido o ácido nucleico puede contener la secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADNc de longitud completa, o un fragmento de la misma, incluyendo las secuencias 5' y/o 3' no traducidas y secuencias de codificación. Un polinucleótido o ácido nucleico puede estar formado por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede incluir ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos no modificados o ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos modificados. Por ejemplo, un polinucleótido o ácido nucleico puede estar compuesto por ADN de doble cadena; ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias; ARN monocatenario y bicatenario; y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Las moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN pueden ser monocatenarias, bicatenarias o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Las expresiones anteriores incluyen también formas modificadas químicamente, enzimáticamente y metabólicamente de un polinucleótido o ácido nucleico.

Se entiende que un ADN específico se refiere también al complemento del mismo, cuya secuencia se determina de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases de desoxirribonucleótido.

Como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a un ácido nucleico que codifica un producto funcional (ARN o polipéptido/proteína). Un gen puede incluir secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes 5') y/o que siguen (secuencias no codificantes 3') a la secuencia que codifica el producto funcional.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos específica. Una "secuencia reguladora" se refiere a una secuencia de nucleótidos localizada aguas arriba (por ejemplo, secuencias no codificantes 5'), dentro, o aguas abajo (por ejemplo, secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, que influye en la transcripción, el procesamiento o estabilidad de ARN o la traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras incluyen, por ejemplo y sin que sean limitantes: promotores; secuencias líder de traducción; intrones;

secuencias de reconocimiento de poliadenilación; sitios de procesamiento de ARN; sitios de unión de efector; y estructuras de horquilla.

Como se usa en el presente documento, el término "degeneración de codones" se refiere a la redundancia del código genético que permite la variación de una secuencia de nucleótidos particular sin afectar a la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado. Dado que cada codón consta de tres nucleótidos, y los nucleótidos que comprenden el ADN están restringidos a cuatro bases específicas, existen 64 combinaciones posibles de nucleótidos, 61 de los cuales codifican aminoácidos (los tres codones restantes codifican señales de terminación de la traducción). Como resultado, muchos aminoácidos están designados por más de un codón. Por ejemplo, los aminoácidos alanina y prolina están codificados por cuatro tripletes, la serina y la arginina por seis, mientras que el triptófano y la metionina están codificados por un solo triplete. El "código genético" que muestra qué codones son los que codifican qué aminoácidos, se conoce comúnmente en la técnica. La degeneración en el mismo permite que las bases de un ADN varíen en un amplio margen sin alterar la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por el ADN.

En algunas realizaciones en el presente documento, cuando se diseña una secuencia codificante para una expresión mejorada en una célula huésped, el gen se diseña de tal manera que la frecuencia de uso del codón se acerque a la frecuencia del uso del codón de la célula huésped preferido. Por consiguiente, la expresión "optimizado en codones" ("codón-optimizado") se refiere a genes o secuencias codificantes de ácidos nucleicos para la transformación de varios hospedadores, en donde los codones del gen o secuencia codificante se han alterado para reflejar el uso de codones típico del organismo huésped sin alterar el polipéptido codificado por el ácido nucleico. En ejemplos, dicha optimización incluye reemplazar al menos uno, más de uno, un número significativo y/o todos los codones en el gen o secuencia de codificación con uno o más codones que se usan con más frecuencia en los genes de ese organismo.

Muchos organismos muestran un sesgo para el uso de codones particulares para codificar la inserción de un aminoácido en particular en una cadena peptídica en crecimiento. Las diferencias de preferencia de codón, o sesgo de codón, en el uso del codón entre organismos, se produce por la degeneración del código genético, y están bien documentadas entre muchos organismos. El sesgo del codón a menudo se correlaciona con la eficiencia de la traducción del ARN mensajero (ARNm), que a su vez se cree que depende, entre otras cosas, de las propiedades de los codones que se están traduciendo y de la disponibilidad de moléculas de ARN de transferencia (ARNt) particulares. El predominio de los ARNt seleccionados en una célula es generalmente un reflejo de los codones utilizados con mayor frecuencia en la síntesis de péptidos. En consecuencia, los genes se pueden hacer a la medida o diseñar para una expresión génica óptima en un organismo determinado en función de la optimización del codón.

Dado el gran número de secuencias de genes disponibles para una amplia variedad de especies animales, vegetales y microbianas, es posible calcular las frecuencias relativas del uso de codones. Las tablas de uso de codones están disponibles, por ejemplo, en la "Base de datos de uso de codones" disponible en Internet en kazusa.or.jp/codon/, y estas tablas se pueden adaptar de varias maneras. Véase Nakamura et al. (2000) Nucl. Acids Res. 28: 292. Utilizando una tabla de uso de codones, un experto en la técnica puede aplicar las frecuencias correspondientes a una especie dada a cualquier secuencia de polipéptidos dada, para diseñar y producir un fragmento de ácido nucleico sintético de una región de codificación codón-optimizada que codifica el polipéptido, pero que utiliza codones óptimos para la especie.

El sesgo del codón se refleja en la composición de base media de las regiones codificantes de proteínas. Por ejemplo, los organismos que tienen genomas con un contenido relativamente bajo de G + C utilizan más codones que tienen A o T en la tercera posición de los codones sinónimos, mientras que los que tienen contenidos más altos de G + C utilizan más codones que tienen G o C en la tercera posición. Además, se cree que la presencia de codones "menores" dentro de un ARNm puede reducir la tasa de traducción absoluta de ese ARNm, especialmente cuando es baja la abundancia relativa del ARNt cargado correspondiente al codón menor. Una extensión de este razonamiento es que la disminución de la velocidad de traducción por codones minoritarios individuales sería al menos aditiva para múltiples codones menores. Por tanto, los ARNm que tienen alto contenido relativo de codones minoritarios tendrían tasas de traducción correspondientemente bajas. Esta tasa podría reflejarse por niveles de la proteína codificada bajos en correspondencia.

El sesgo de codón se puede calcular como la frecuencia a la que se usa un solo codón en relación con los codones para todos los aminoácidos. Alternativamente, el sesgo del codón se puede calcular como la frecuencia a la que se usa un codón único para codificar un aminoácido particular, en relación con todos los otros codones para ese aminoácido (codones sinónimos).

La expresión "porcentaje de identidad" (o "% de identidad") se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos (o secuencias de polinucleótidos), según se determina comparando las secuencias. El porcentaje de identidad puede expresar el grado de relación de secuencia entre las secuencias de polipéptidos (o polinucleótidos), como puede determinarse por la coincidencia entre las cadenas de tales secuencias. En general, identidad se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias polipeptídicas, respectivamente. El porcentaje de identidad de dos secuencias, ya sean secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas, dividido por la longitud de las secuencias más cortas y multiplicado por 100. Véase Russell y Barton (1994) J. Mol. Biol. 244: 332 - 50.

Las técnicas para alinear las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos y determinar la identidad son conocidas en este campo e incluyen, por ejemplo y sin limitación, las proporcionadas en: Computational Molecular Biology (1988) (Lesk, A. M., Ed.) Universidad de Oxford, NY; Biocomputing: Informatics and Genome Projects (1993) (Smith, DW, Ed.) Academic, NY; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I (1994) (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., Eds.) Humana, NJ; Sequence Analysis in Molecular Biology (1987) (von Heinje, G., Ed.) Academic, NY; y Sequence Analysis Primer (1991) (Gribbskov, M. y Devereux, J., Eds.) Stockton, NY. Una técnica para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias puede incluir proporcionar la secuencia de nucleótidos de un ARNm o gen y/o proporcionar o inferir la secuencia de aminoácidos codificada así, y comparar la secuencia o las secuencias con una segunda secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos. También se pueden determinar y comparar de esta manera las secuencias genómicas.

Además, los métodos para alinear las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos y determinar la identidad se incorporan en varios programas de software informáticos disponibles para el público. Se pueden realizar alineaciones de secuencia y cálculos de porcentaje de identidad, por ejemplo, utilizando el programa AlignX™ de la suite Vector NTI® (Invitrogen, Carlsbad, CA) o el programa MegAlign™ de la suite de computación de bioinformática LASERGENE™ (DNASTAR™ Inc., Madison, WI). La alineación múltiple de secuencias se puede realizar utilizando el método Clustal™, que abarca diversas variedades de un algoritmo de alineación, incluyendo Clustal™ V y Clustal™ W (Higgins y Sharp (1989) CABIOS 5: 151 - 3; Higgins et al. (1992) Comput. Apl. Biosci. 8: 189 - 91). Para las alineaciones múltiples en Clustal™ V, los valores predeterminados que pueden usarse incluyen GAP PENALTY = 10 y GAP LENGTH PENALTY = 10. Los parámetros por defecto para la alineación múltiple en Clustal™ W incluyen GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 0.2, Secuencias de retardo de divergencia (%) = 30, peso de transición de ADN = 0.5, Matriz de peso de proteína = Serie Gonnet, Matriz de peso de ADN = IUB). Los parámetros por defecto para las alineaciones por pares y el cálculo del porcentaje de identidad entre las secuencias de proteínas que se pueden usar en un método Clustal™ son KTUPLE = 1, GAP PENALTY = 3, WINDOW = 5 y DIAGONALS SAVED = 5. Para los ácidos nucleicos, estos parámetros por defecto pueden ser KTUPLE = 2, GAP PENALTY = 5, WINDOW = 4 y DIAGONALS SAVED = 4. Después de la alineación de secuencias usando un programa Clustal™, es posible obtener un "porcentaje de identidad" al ver la tabla de "distancias de secuencia" en el mismo programa.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia (cuando se compara con un polipéptido de referencia; por ejemplo, un polipéptido DGT) de, por ejemplo y sin que sea limitante, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90% y al menos aproximadamente el 95%, tiene la misma o similar función que el polipéptido de referencia. Por consiguiente, cualquier porcentaje entero de identidad de, por ejemplo, 55% a 100% puede ser útil para describir ácidos nucleicos particulares en el presente texto, por ejemplo y sin que sea limitante: 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99%. Ciertos fragmentos de ácido nucleico no solo tienen la identidad de secuencia anterior, sino que pueden codificar un polipéptido que tiene, por ejemplo y sin que sea limitante: al menos 50 aminoácidos; al menos 100 aminoácidos; al menos 150 aminoácidos; al menos 200 aminoácidos; y al menos 250 aminoácidos. Las realizaciones particulares incluyen un ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 90% de identidad con la SEC ID NO: 1 (por ejemplo, al menos 89% de identidad; al menos aproximadamente 90% de identidad; al menos aproximadamente 91% de identidad; al menos aproximadamente 92% de identidad; al menos aproximadamente 93% de identidad; al menos aproximadamente 94% de identidad; al menos aproximadamente 95% de identidad; al menos aproximadamente 96% de identidad; al menos aproximadamente 97% de identidad; al menos aproximadamente 98% de identidad; al menos aproximadamente 99% de identidad; y al menos aproximadamente 99,5% de identidad).

La expresión "software de análisis de secuencia" se refiere a un algoritmo de ordenador o programa de software que es útil para el análisis de secuencias de nucleótidos o aminoácidos. El "software de análisis de secuencia" puede estar disponible comercialmente o ser desarrollado de forma independiente. Los ejemplos no limitantes de software de análisis de secuencia incluyen: el conjunto de programas GCG (Wisconsin Package Versión 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); BLASTP™, BLASTN™ y BLASTX™ (Altschul y otros (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 10); DNASTAR™ (DNASTAR™, Inc. Madison, WI); Sequencher™ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI); y el programa FASTA™ que incorpora el algoritmo Smith-Waterman (Pearson (1994) Comput. Methods Genome Res. [Proc. Int. Symp.], Meeting date 1992 (Suhai y Sandor, Eds.), Plenum: Nueva York, NY, pp. 111 - 20). Cuando el software de análisis de secuencias se ha utilizado para analizar una secuencia de nucleótidos o aminoácidos en este documento, los resultados del análisis mostrado se han generado utilizando los valores por defecto del programa al que se hace referencia, a menos que se especifique otra cosa. Como se usa en este documento, la expresión "valores predeterminados" se refiere a un conjunto de valores o parámetros que originalmente se cargan con el software de análisis de secuencias cuando se inicializa por primera vez.

Hibridación: Un ácido nucleico que comprende toda o parte de una secuencia de nucleótidos se puede usar como una sonda que "se hibrida" selectivamente con secuencias de nucleótidos presentes en una población de fragmentos de ADN genómico clonados o fragmentos de ADNc (por ejemplo, bibliotecas genómicas o de ADNc de un organismo elegido) que tiene una cantidad significativa de identidad de secuencia con la secuencia de la sonda. Una sonda de hibridación puede ser un fragmento de ADN genómico; un fragmento de ADN plasmídico; un fragmento de cDNA; un fragmento de ARN; un fragmento de ADN amplificado por PCR; un oligonucleótido; u otro polinucleótido, y una sonda

puede estar marcada con un grupo detectable (por ejemplo, ^{32}P), o cualquier otro marcador detectable. Así, por ejemplo y sin que sea limitante, se puede hacer una sonda para hibridación marcando un oligonucleótido sintético que específicamente se hibrida con un ácido nucleico en el presente documento (por ejemplo, un ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad con la SEC ID NO: 1). Los métodos para la preparación de sondas para hibridación, y para la construcción de bibliotecas de ADNc y genómicas, son conocidos en la técnica. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se puede encontrar en Sambrook et al. (1989), *supra*; y Ausubel et al. (1997) *Short Protocols in Molecular Biology*, tercera edición, Wiley, NY, Nueva York, pp. 2 - 40.

En algunas formas de realización, la hibridación de ácido nucleico (por ejemplo, con ADN amplificado) puede usarse para identificar la presencia de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico o sus fragmentos son capaces de "hibridarse específicamente" con otra molécula de ácido nucleico bajo determinadas circunstancias. En algunos ejemplos, un ácido nucleico se hibrida específicamente en condiciones rigurosas con un ácido nucleico diana. Como se usa en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridarse específicamente entre ellas si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenario antiparalelo bajo condiciones rigurosas (por ejemplo, de rigor alto).

Se dice que un ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si las dos moléculas de ácido nucleico presentan una complementariedad de secuencia completa. Como se usa en este documento, se dice que los ácidos nucleicos exhiben una "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario de un nucleótido de la otra. Las moléculas que presentan una complementariedad completa generalmente se hibridarán entre sí con una estabilidad suficiente para permitirles permanecer apareadas entre sí en condiciones convencionales de "rigor alto". Las condiciones convencionales de rigor alto están descritas por Sambrook et al. (1989), *supra*.

Se dice que dos moléculas presentan "complementariedad mínima" si pueden hibridarse entre sí con estabilidad suficiente para permitirles permanecer emparejadas entre sí bajo al menos condiciones convencionales de "rigor bajo". Las condiciones convencionales de rigor bajo también están descritas por Sambrook et al. (1989), *supra*. Para que una molécula de ácido nucleico sirva de cebador o sonda, solo necesita mostrar la mínima complementariedad de la secuencia para poder formar una estructura estable de doble cadena bajo el disolvente particular y las concentraciones de sal empleadas.

Los factores que afectan al rigor de la hibridación son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo: temperatura; pH; fuerza iónica; y concentración de disolventes orgánicos (p. ej., formamida y dimetilsulfóxido). Como saben los expertos en la técnica, el rigor de la hibridación se incrementa a temperaturas más altas, menor fuerza iónica y menores concentraciones de disolvente. También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como la formamida.

La expresión "condición rigurosa" o "condiciones de rigurosidad" se define con respecto a la hibridación de un ácido nucleico con otro ácido nucleico diana (es decir, a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de interés en particular) por el procedimiento de hibridación específica discutido en Sambrook et al. (1989), *supra* (en 9.52 - 9.55). Véase también Sambrook et al. (1989) en 9.47 - 9.52 y 9.56 - 9.58.

La especificidad en muchas aplicaciones está relacionada con las condiciones de los lavados posteriores a la hibridación, en los que los factores incluyen la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado. Para híbridos ADN-ADN, la temperatura de fusión térmica (T_m) se puede aproximar a partir de la ecuación:

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\%form) - 500/L, \quad (1)$$

donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos guanosa y citosina en el ADN, %form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. Meinkoth y Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138: 267 - 84.

La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH particulares) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda perfectamente emparejada. La T_m se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de desajuste. Así, las condiciones de T_m , hibridación y/o lavado pueden ajustarse para secuencias de la identidad deseada para hibridar. Por ejemplo, si se busca la hibridación de secuencias con una identidad del 90%, la T_m puede disminuirse 10°C (bajo una fuerza iónica y pH particulares). Las condiciones rigurosas se pueden seleccionar, por ejemplo, para que sean aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para una secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y un pH definidos. Sin embargo, las condiciones severamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a $1, 2, 3$ o 4°C por debajo de la T_m ; las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a $6, 7, 8, 9$ o 10°C por debajo de la T_m ; las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a una temperatura entre 11 y 20°C más baja que la T_m .

En algunos ejemplos, las condiciones rigurosas son aquellas en las que la concentración de sal es inferior a

aproximadamente Na^+ 1,5 M (por ejemplo, aproximadamente Na^+ 0,01 a 1,0 M) a pH de 7,0 a 8,3, y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para ácidos nucleicos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos de longitud) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos de longitud). Las condiciones de rigurosidad baja ejemplares incluyen hibridación con una solución tampón de formamida del 30 al 35%, NaCl 1,0 M, dodecil sulfato sódico al 0,1% (SDS) a 37 °C y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC = NaCl 3,0 M/Citrato trisódico 0,3 M) a una temperatura de 50 a 55 °C. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad moderada incluyen la hibridación en formamida al 40 a 45%, NaCl 1,0 M, SDS al 0,1% a 37 °C, y un lavado en SSC de 0,5X a 1X a una temperatura de 55 a 60°C. Las condiciones de rigurosidad alta incluyen la hibridación en aproximadamente 50% de formamida, aproximadamente 1,0 M de sal de Na, aproximadamente 0,1% de SDS a aproximadamente 37°C y un lavado en aproximadamente 0,1X SSC a aproximadamente de 60 a 65 °C.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" incluye un polipéptido singular, polipéptidos plurales y fragmentos de los mismos. Este término se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud o tamaño específicos del producto. En consecuencia, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, proteínas, cadenas de aminoácidos y cualquier otro término utilizado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, están incluidos dentro de la definición de "polipéptido", y los términos anteriores son utilizados indistintamente con "polipéptido" en el presente documento. Un polipéptido puede aislarse de una fuente biológica natural o producirse por tecnología recombinante, pero un polipéptido específico no se traduce necesariamente a partir de un ácido nucleico específico. Un polipéptido puede generarse de cualquier manera apropiada, incluyendo por ejemplo y sin que sea limitante, mediante síntesis química.

Endógeno y heterólogo: como se usa en este documento, el término "nativo" se refiere a la forma de un polinucleótido, gen o polipéptido que se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras, si están presentes. El término "endógeno" se refiere a la forma nativa del polinucleótido, gen o polipéptido en su ubicación natural en el organismo o en el genoma del organismo.

En cambio, el término "heterólogo" se refiere a un polinucleótido, gen o polipéptido que no se encuentra normalmente en su ubicación en el organismo de referencia (huésped). Por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo puede ser un ácido nucleico que normalmente se encuentra en el organismo de referencia en una ubicación genómica diferente. A título de ejemplo adicional, un ácido nucleico heterólogo puede ser un ácido nucleico que normalmente no se encuentra en el organismo de referencia. Un organismo huésped que comprende un polinucleótido, gen o polipéptido heterólogo puede producirse introduciendo el polinucleótido, gen o polipéptido heterólogo en el organismo huésped. En ejemplos particulares, un polinucleótido heterólogo comprende una secuencia codificante nativa, o parte de la misma, que se reintroduce en un organismo fuente en una forma que es diferente del polinucleótido nativo correspondiente. En ejemplos particulares, un gen heterólogo comprende una secuencia de codificación nativa, o parte de la misma, que se reintroduce en un organismo fuente en una forma que es diferente del gen nativo correspondiente. Por ejemplo, un gen heterólogo puede incluir una secuencia de codificación nativa que es una parte de un gen quimérico que incluye regiones reguladoras no nativas que se reintroducen en el huésped nativo. En ejemplos particulares, un polipéptido heterólogo es un polipéptido nativo que se reintroduce en un organismo fuente en una forma que es diferente del polipéptido nativo correspondiente.

Un gen o polipéptido heterólogo puede ser un gen o polipéptido que comprende un polipéptido funcional o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido funcional que se fusiona con otro gen o polipéptido para producir un polipéptido quimérico o de fusión, o un gen que lo codifica. Los genes y proteínas de realizaciones particulares incluyen secuencias de longitud completa ejemplificadas específicamente, y porciones, segmentos, fragmentos (incluyendo fragmentos contiguos y delecciones internas y/o terminales en comparación con las moléculas de longitud completa), variantes, mutantes, quiméricos y fusiones de estas secuencias.

Modificación: como se usa en este documento, el término "modificación" puede referirse a un cambio en un polinucleótido de referencia particular que tiene como resultado una actividad reducida, sustancialmente eliminada o eliminada de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Una modificación también puede referirse a un cambio en un polipéptido de referencia que da como resultado una actividad reducida, sustancialmente eliminada o eliminada del polipéptido de referencia. Alternativamente, el término "modificación" puede referirse a un cambio en un polinucleótido de referencia que tiene como resultado una actividad aumentada de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia, así como un cambio en un polipéptido de referencia que tiene como resultado una actividad incrementada o aumentada del polipéptido de referencia. Los cambios como los anteriores pueden realizarse por cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo y sin que sean limitantes: borrar una parte de la molécula de referencia; mutar la molécula de referencia (p. ej., mediante mutagénesis espontánea, mutagénesis aleatoria, mutagénesis causada por genes mutantes y mutagénesis por transposón); sustituir una porción de la molécula de referencia; insertar un elemento en la molécula de referencia; regular a la baja la expresión de la molécula de referencia; alterar la ubicación celular de la molécula de referencia; alterar el estado de la molécula de referencia (por ejemplo, a través de la metilación de un polinucleótido de referencia, y a través de la fosforilación o ubiquitinación de un polipéptido de referencia); eliminar un cofactor de la molécula de referencia; introducir un ARN/ADN antisentido dirigido a la molécula de referencia; introducir un ARN/ADN interferente que se dirige a la molécula de referencia; modificar químicamente la molécula de referencia; modificar covalentemente la

molécula de referencia; irradiar la molécula de referencia con radiación UV o rayos X; recombinación homóloga que altera la molécula de referencia; recombinación mitótica que altera la molécula de referencia; sustitución del promotor de la molécula de referencia; y/o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

- 5 Se puede encontrar una guía para determinar qué nucleótidos o residuos de aminoácidos se pueden modificar en un ejemplo específico comparando la secuencia del polinucleótido o polipéptido de referencia con la de polinucleótidos o polipéptidos homólogos (p. ej., levaduras o bacterias homólogas), y maximizando el número de modificaciones realizadas en regiones de alta homología (regiones conservadas) o secuencias de consenso.

- 10 Derivado y variante: el término "derivado", como se usa en el presente documento, se refiere a una modificación de una secuencia ejemplar en el presente documento. Dichas modificaciones incluyen la sustitución, inserción y/o delección de una o más bases de una secuencia de codificación en el presente texto que preserva, altera ligeramente o aumenta la función de la secuencia de codificación en una especie de cultivo. Dichos derivados pueden ser determinados fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo y sin que sean limitantes, utilizando técnicas de modelado por ordenador para predecir y optimizar la estructura de secuencia. Así pues, el término "derivado" incluye también ácidos nucleicos heterólogos que comprenden una secuencia que tiene una identidad de secuencia sustancial con una secuencia ejemplar en el presente texto, tal como poder tener la misma funcionalidad, ligeramente alterada o mayor para usar en la expresión de DGT-28 en una planta de cultivo.

- 20 Como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a un polipéptido que se diferencia de un polipéptido ejemplar en este documento por inserciones, delecciones, mutaciones y/o sustituciones de aminoácidos, como pueden introducirse usando, por ejemplo y sin que sea limitante, técnicas de ADN recombinante. Se puede encontrar una guía para determinar qué residuos de aminoácidos se pueden reemplazar, agregar o eliminar dentro de una secuencia de aminoácidos de referencia comparando la secuencia del polipéptido de referencia particular con la de polipéptidos homólogos, y minimizando el número de cambios de secuencia de aminoácidos realizados en regiones de alta homología (regiones conservadas), o reemplazando los aminoácidos con una secuencia de consenso. Un polipéptido variante puede tener aminoácidos sustituidos y sin embargo mantener aún la actividad funcional del polipéptido de referencia. Los genes "variantes" comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica el mismo polipéptido que un gen de referencia o un polipéptido equivalente que tiene una actividad equivalente o similar al polipéptido de referencia.

- 30 En algunas realizaciones, pueden usarse genes variantes para producir proteínas variantes, y pueden usarse huéspedes recombinantes para producir las proteínas variantes. Por ejemplo, pueden construirse variantes de genes y proteínas que comprenden residuos contiguos (aminoácido o nucleótido) de cualquier secuencia ejemplificada en el presente texto. Un gen o proteína variante puede tener, por ejemplo y sin que sea limitante: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 249, 250, 251, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292 y 293 restos contiguos (aminoácido o nucleótido) que corresponden a un segmento (del mismo tamaño) en la secuencia ejemplificada. También pueden usarse como sondas y/o cebadores segmentos de tamaño similar, especialmente los que son para regiones conservadas.

- 50 Los expertos en la técnica entenderán que muchos niveles de identidad de secuencia son útiles para identificar polipéptidos (por ejemplo, a partir de otras especies) que tienen la misma o similar función o actividad que un polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, un polipéptido variante que tiene una identidad de secuencia (cuando se compara con un polipéptido de referencia; por ejemplo, un polipéptido DGT-28), por ejemplo y sin que sea limitante: al menos aproximadamente el 55%; al menos aproximadamente el 60%; al menos aproximadamente 65%; al menos aproximadamente 70%; al menos aproximadamente 75%; al menos aproximadamente el 80%; al menos aproximadamente el 85%; al menos aproximadamente el 90%; y al menos aproximadamente el 95%, tiene la misma o similar función que el polipéptido de referencia.

- 55 Las estrategias para diseñar y construir genes y proteínas variantes que comprenden restos contiguos de una molécula particular se pueden determinar obteniendo y examinando la estructura de una proteína de interés (por ejemplo, coordenadas atómicas en 3D (tridimensionales), a partir de una estructura cristalina y/o un modelo molecular). En algunos ejemplos, puede dirigirse una estrategia a ciertos segmentos de una proteína que son ideales para la modificación, tales como los segmentos expuestos a la superficie, y no a los segmentos internos que están implicados en el plegamiento de proteínas y la integridad estructural 3-D esencial. La patente de Estados Unidos nº 5.605.793, por ejemplo, se refiere a métodos para generar diversidad molecular adicional usando el reensamblaje de ADN después de la fragmentación aleatoria o focalizada. Esto se puede denominar "mezcla aleatoria" de genes ("shuffling"),

que generalmente implica la mezcla de fragmentos (de un tamaño deseado) de dos o más moléculas de ADN diferentes, seguida de rondas repetidas de renaturalización. Este proceso puede mejorar la actividad de una proteína codificada por un gen sujeto. El resultado puede ser una proteína quimérica que tenga mejoramiento de la actividad, alteración de la especificidad del sustrato, aumento de la estabilidad enzimática, alteración de la estereoespecificidad, u otras características.

Una "sustitución" de aminoácidos puede ser el resultado de reemplazar un aminoácido de una secuencia de referencia con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares (es decir, sustitución conservadora de aminoácidos), o puede ser el resultado de reemplazar un aminoácido de una secuencia de referencia con un aminoácido que tenga diferentes propiedades estructurales y/o químicas (es decir, sustitución de aminoácidos no conservadora). Los aminoácidos se pueden colocar en las siguientes clases estructurales y/o químicas: no polar; polar sin carga; básico; y ácido. Por consiguiente, las sustituciones "conservadoras" de aminoácidos se pueden hacer sobre la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, o la naturaleza anfipática de los restos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos polares sin carga (neutros) incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Alternativamente, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos "no conservadoras" seleccionando las diferencias en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad o naturaleza anfipática de cualquiera de estos aminoácidos. "Inserciones" o "deleciones" pueden estar dentro del rango de variación según la tolerancia estructural o funcional de las proteínas recombinantes.

En algunas realizaciones, una proteína variante se "trunca" con respecto a una proteína de referencia, de longitud completa. En algunos ejemplos, una proteína truncada retiene la actividad funcional de la proteína de referencia. Por proteína "truncada" se entiende que una porción de una proteína puede ser escindida, por ejemplo, mientras que la proteína truncada restante retiene y exhibe la actividad deseada después de la escisión. La escisión puede lograrse por cualquiera de diversas proteasas. Además, las proteínas escindidas efectivamente pueden producirse usando técnicas de biología molecular, en donde las bases de ADN que codifican una porción de la proteína son eliminadas de la secuencia codificante, ya sea mediante digestión con endonucleasas de restricción u otras técnicas disponibles para el experto en la técnica. Una proteína truncada puede expresarse en un sistema heterólogo, por ejemplo, *E. coli*, baculovirus, sistemas virales basados en plantas y levaduras. Las proteínas truncadas que confieren tolerancia a los herbicidas pueden confirmarse utilizando el sistema heterólogo que expresa la proteína en un bioensayo de tolerancia a los herbicidas, tal como se describe en el presente documento. Es bien conocido en la técnica que las proteínas truncadas pueden producirse con éxito de forma que retengan la actividad funcional de la proteína de referencia de longitud completa. Por ejemplo, las proteínas Bt se pueden usar en forma truncada (proteína del núcleo). Véanse, por ejemplo, Hofte y Whiteley (1989) Microbiol. Rev. 53 (2): 242 - 55; y Adang et al. (1985) Gene 36: 289 - 300.

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

Los genes y proteínas variantes que retienen la función de la secuencia de referencia a partir de la cual se diseñaron pueden ser determinados por un experto en la técnica, por ejemplo, analizando la actividad de las variantes recombinantes. Si tal ensayo de actividad es conocido y caracterizado, entonces la determinación de variantes funcionales requiere solamente una experimentación rutinaria.

Se pueden hacer cambios específicos en el "sitio activo" de una enzima para afectar su funcionalidad inherente con respecto a la actividad o la estereoespecificidad. Véase Muller et al. (2006) Protein Sci. 15 (6): 1356 - 68. Por ejemplo, la estructura tauD conocida se ha utilizado como un modelo de dioxigenasa para determinar los restos del sitio activo mientras se une a su sustrato inherente, la taurina. Véase Elkins et al. (2002) Biochemistry 41 (16): 5185 - 92. Se puede encontrar información adicional sobre la optimización de secuencias y la designabilidad de los sitios activos de enzimas en Chakrabarti et al. (2005) Proc. Natl Acad. Sci. USA 102 (34): 12035 - 40.

Se pueden cambiar varias propiedades estructurales y características tridimensionales de una proteína sin afectar adversamente a la actividad/funcionalidad de la proteína. Se pueden hacer sustituciones conservadoras de aminoácidos que no afectan adversamente a la actividad y/o la configuración tridimensional de la molécula (sustituciones "toleradas"). También pueden diseñarse proteínas variantes que difieren a nivel de secuencia de la proteína de referencia, pero que conservan la misma estructura tridimensional esencial, distribución de carga de superficie y similares. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 7.058.515; Larson et al. (2002) Protein Sci. 11: 2804 - 13; Cramer et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15: 436 - 8; Stemmer (1994) Proc. Natl Acad Sci. USA 91: 10747 - 51; Stemmer (1994) Nature 370: 389 - 91; Stemmer (1995) Bio/Technology 13: 549 - 53; Cramer et al. (1996) Nat. Med. 2: 100 - 3; y Cramer et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14: 315 - 9.

También se puede realizar el diseño computacional de las UTR 5' o 3' (por ejemplo, horquillas sintéticas) que son adecuadas para su uso en un constructo de expresión (por ejemplo, un constructo de expresión DGT-28), y se puede

usar para diseñar elementos dentro de ácidos nucleicos de algunas realizaciones de la presente invención. Las técnicas de modelado por computadora y UTR y de modelado por computadora para usar en la predicción/ evaluación de derivados UTR en 5' y 3' incluyen, por ejemplo y sin que sean limitantes: MFold™ version 3.1 (disponible de Genetics Corporation Group, Madison, WI; véase Zucker et al. "Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide" en RNA Biochemistry and Biotechnology, 11 - 43, J. Barciszewski & B. F. C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, 1999; Zucker et al. (1999) J. Mol. Biol. 288: 911 - 40; Zucker et al. "RNA Secondary Structure Prediction," en Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, S. Beaucage, D. E. Bergstrom, G. D. Glick, y R. A. Jones eds., John Wiley & Sons, New York, 11.2.1 - 11.2.10, 2000); y COVE™ (RNA structure analysis using covariance models (stochastic context free grammar methods)) v.2.4.2 (Eddy y Durbin (1994) Nucl. Acids Res. 22: 2079 - 88), que se distribuye libremente como código fuente y que puede descargarse accediendo al sitio web, genetics.wustl.edu/eddy/software/; y FOLDALIGN™ (véase Gorodkin et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25 (18): 3724 - 32 y Gorodkin et al. (1997) Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ISMB International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology 5: 120 - 123), también distribuida de forma gratuita y disponible para descargar en el sitio web, foldalign.ku.dk/software/index.html.

Promotor: El término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificadora de ácido nucleico o ARN funcional. En ejemplos, la secuencia de codificación controlada está localizada 3' de una secuencia promotora. Un promotor puede derivarse en su totalidad de un gen nativo, un promotor puede estar formado por diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o un promotor puede comprender incluso segmentos de ADN sintético. Los expertos en la materia entenderán que los promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. Se conocen ejemplos de todos los promotores anteriores y se usan en la técnica para controlar la expresión de ácidos nucleicos heterólogos. Los promotores que dirigen la expresión de un gen en la mayor parte de los tipos de células en la mayoría de los casos se denominan comúnmente "promotores constitutivos". Además, mientras los expertos de la técnica han intentado (en muchos casos sin éxito) delinear los límites exactos de las secuencias reguladoras, se ha llegado a entender que fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener una actividad promotora idéntica. La actividad promotora de un ácido nucleico particular puede ensayarse usando técnicas que son familiares para los expertos en la técnica.

Ligado operativamente: La expresión "ligado operativamente" se refiere a una asociación de secuencias de ácido nucleico en un solo ácido nucleico, en el que la función de una de las secuencias de ácido nucleico está afectada por otra. Por ejemplo, un promotor está ligado operativamente con una secuencia de codificación cuando el promotor es capaz de efectuar la expresión de esa secuencia codificadora (por ejemplo, la secuencia de codificación está bajo el control transcripcional del promotor). Una secuencia codificadora puede estar unida operativamente a una secuencia reguladora en una orientación de sentido o antisentido.

Expresión: El término "expresión", como se usa en el presente documento, puede referirse a la transcripción y acumulación estable de ARN sentido (ARNm) o antisentido derivado de un ADN. La expresión puede también referirse a la traducción de ARNm en un polipéptido. Como se usa en este documento, el término "sobrexpresión" se refiere a la expresión que es mayor que la expresión endógena del mismo gen o de un gen relacionado. Por lo tanto, un gen heterólogo se "sobrexprime" si su expresión es más alta que la de un gen endógeno comparable.

Transformación: Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la transferencia e integración de un ácido nucleico o un fragmento del mismo en un organismo huésped, lo que tiene como resultado una herencia genéticamente estable. Los organismos hospedadores que contienen un ácido nucleico transformante se denominan organismos "transgénicos", "recombinantes" o "transformados". Los métodos de transformación conocidos incluyen, por ejemplo: transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes*; transformación con fosfato cálcico; transformación con polibreno; fusión de protoplastos; electroporación; métodos ultrasónicos (p. ej. sonoporación); transformación con liposomas; microinyección; transformación con ADN desnudo; transformación con vectores plasmídicos; transformación con vectores virales; transformación biolística (bombardeo de micropartículas); transformación mediada por fibras de carburo de silicio (WHISKERS); emisión de aerosol; y transformación mediada por PEG.

Introducido: como se usa en este documento, el término "introducido" (en el contexto de la introducción de un ácido nucleico en una célula) incluye la transformación de una célula, así como el cruce de una planta que comprende el ácido nucleico con una segunda planta, de manera que la segunda planta contiene el ácido nucleico, como se puede realizar utilizando técnicas convencionales de reproducción de plantas. Tales técnicas de reproducción son conocidas en este campo. Para una discusión de las técnicas de cultivo de plantas, véase Poehlman (1995) *Breeding Field Crops*, 4ª edición, AVI Publication Co., Westport CT.

Se pueden usar métodos de retrocruzamiento para introducir un ácido nucleico en una planta. Esta técnica se ha utilizado durante décadas para introducir rasgos en las plantas. Un ejemplo de una descripción de retrocruzamiento (y otras metodologías de cultivo de plantas) se puede encontrar, por ejemplo, en Poelman (1995), *supra*; y Jensen (1988) *Plant Breeding Methodology*, Wiley, Nueva York, NY. En un ejemplo de protocolo de retrocruzamiento, una planta original de interés (el "padre recurrente") se cruza con una segunda planta (el "padre no recurrente") que transporta el ácido nucleico que se ha de introducir. La progenie resultante de este cruce se cruza de nuevo con el

padre recurrente, y el proceso se repite hasta que se obtiene una planta convertida, en donde esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas deseadas del padre recurrente se recuperan en la planta convertida, además del ácido nucleico del padre no recurrente.

Plásmido/vector: Los términos "plásmido" y "vector", como se usan en este documento, se refieren a un elemento cromosómico extra que puede llevar uno o más genes que no forman parte del metabolismo central de la célula. Plásmidos y vectores son típicamente moléculas de ADN de doble cadena circular. Sin embargo, los plásmidos y los vectores pueden ser ácidos nucleicos lineales o circulares, de un ADN o ARN de cadena simple o doble, y pueden derivarse de cualquier fuente en la que varias secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una construcción única que es capaz de introducir en una célula un fragmento promotor y una secuencia de ADN codificante junto con cualquier secuencia no traducida 3' apropiada. En ejemplos, los plásmidos y los vectores pueden comprender secuencias de replicación autónoma, secuencias de integración del genoma y/o secuencias de fagos o nucleótidos.

III. DGT-28 y secuencias codificadoras de DGT-28.

La invención se define en las reivindicaciones. Algunas realizaciones de este documento están relacionadas con un polipéptido aislado que tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad (por ejemplo, 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95 %, al menos el 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99% de identidad) con la SEQ ID NO: 1. Dicho polipéptido se denomina aquí como un polipéptido DGT-28. Algunas realizaciones del presente texto proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que confiere a una planta tolerancia al glifosato, en donde la EPSPS es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO: 1 y cuando está alineado con la SEC ID NO: 1 comprende una alanina en la posición correspondiente a la posición 84 de la SEC ID NO: 1, en donde el polinucleótido es una secuencia sintética que ha sido diseñada para la expresión en una planta seleccionada entre el grupo que consiste en:

un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 3; y

un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con otro ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 3 en condiciones de rigor alto,

en donde el polinucleótido está ligado operativamente a un promotor, donde preferiblemente el promotor está dirigiendo la expresión de un gen. Ejemplos particulares de tal ácido nucleico se denominan en este documento como ácido nucleico "*dgt-28*". Los ácidos nucleicos *dgt-28* pueden ser útiles en cualquiera de una amplia variedad de aplicaciones (por ejemplo, introduciendo resistencia al glifosato) en las que se desea el metabolismo del glifosato modificado en una célula vegetal.

Los ejemplos particulares de ácidos nucleicos *dgt-28* proporcionados con fines ilustrativos en este documento son las SEC ID N°: 2 y 3. En consecuencia, algunas realizaciones proporcionan un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 79%, al menos el 80%, al menos el 81%, al menos el 82%, al menos el 83%, al menos el 84%, al menos el 85%, al menos el 86%, al menos el 87%, al menos el 88%, al menos el 89% , al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% y al menos el 99% % de identidad) con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, en donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad con la SEC ID NO: 1. Los ejemplos particulares de ácidos nucleicos *dgt-28* incluyen ácidos nucleicos que se hibridan específicamente con un ácido nucleico que tiene la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 3 en condiciones rigurosas (por ejemplo, altamente rigurosas).

En algunas realizaciones, se proporcionan ácidos nucleicos de *dgt-28* codón-optimizados. Por ejemplo, para obtener una alta expresión de un gen heterólogo en una planta puede ser deseable diseñar y reconstruir el gen para que se exprese de manera más eficiente en una célula de la planta. Esta estrategia puede ser particularmente deseable en el caso de que se desee que un gen bacteriano se exprese en una célula vegetal.

Por tanto, algunos ejemplos en este documento proporcionan un gen optimizado para plantas que codifica una proteína DGT-28, y métodos para su diseño, para generar una secuencia de ADN que puede expresarse óptimamente en plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas, y en las que las modificaciones de secuencia no impida la traducción o la transcripción. El diseño de un gen *dgt-28* optimizado para la expresión de la misma proteína DGT-28 en plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas se ejemplifica en este documento con una re-ingeniería de la región codificadora de proteínas de este gen para una expresión óptima. Los ejemplos de ácidos nucleicos *dgt-28* optimizados para plantas en este documento incluyen la SEC ID NO: 2 y la SEC ID NO: 3.

En la ingeniería de un gen que codifica una proteína DGT-28 para la expresión en plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas (por ejemplo, algodón, canola, tabaco, maíz, soja, trigo y arroz), el sesgo de codón de la planta o plantas prospectivas puede determinarse, por ejemplo, mediante el uso de bases de datos de secuencias de ADN disponibles públicamente para encontrar información acerca de la distribución de codones de los genomas de las plantas o las regiones codificantes de proteínas de varios genes de plantas.

En el diseño de las regiones codificantes en un ácido nucleico para la expresión en la planta, deben determinarse los codones primarios ("primera elección") preferidos por la planta, y también pueden ser la segunda, tercera, cuarta, etc. elección de los codones preferidos cuando existen múltiples opciones. Luego puede diseñarse una nueva secuencia de ADN que codifique la secuencia de aminoácidos del mismo péptido (por ejemplo, una proteína DGT-28), pero la nueva secuencia de ADN difiere de la secuencia de ADN original por la sustitución de los codones de la planta (primero preferido, segundo preferido, tercero preferido, o cuarto preferido, etc.) para especificar el aminoácido en cada posición dentro de la secuencia de aminoácidos.

La nueva secuencia puede entonces analizarse en relación con sitios de enzimas de restricción que podrían haber sido creados por las modificaciones. Los sitios identificados pueden modificarse más reemplazando los codones por los codones preferidos de primera, segunda, tercera o cuarta elección. Otros sitios en la secuencia que podrían afectar la transcripción o traducción del gen de interés son las estructuras de horquilla, uniones exón:intrón (5' o 3'), señales de adición de poli A y señales de terminación de ARN polimerasa; estos sitios pueden eliminarse mediante la sustitución de codones de plantas. La secuencia puede analizarse y modificarse adicionalmente para reducir la frecuencia de dobletes TA o CG. Además de los dobletes, los bloques de secuencia G o C que tienen más de unos seis residuos que son iguales pueden afectar a la transcripción o la traducción de la secuencia. Por consiguiente, estos bloques pueden modificarse reemplazando los codones de primera o segunda elección, etc., con el siguiente codón de elección preferido.

La SEC ID N°: 2 (*dgt-28* (v5)) se optimizó para la expresión en plantas dicotiledóneas. La SEC ID NO: 3 (*dgt-28* (v6)) se optimizó para la expresión en plantas monocotiledóneas. El uso de codones en estas secuencias sintéticas se seleccionó basándose en el uso de codones preferidos; es decir, los productos de expresión de cada uno están codificados por codones que tienen un sesgo hacia el uso de plantas bien sea monocotiledóneas o dicotiledóneas, y las secuencias perjudiciales y los sitios de restricción superfluos se eliminaron para aumentar la eficiencia de la transcripción/traducción del polipéptido DGT-28 y para facilitar las etapas de manipulación del ADN.

Del mismo modo, la molécula de ácido nucleico de la SEC ID NO: 4 (*dgt-28* (v1)) fue optimizada para mejorar la expresión en *Escherichia coli*. El uso de codones en la SEC ID N°: 4 se seleccionó en función del uso de codones de *E. coli* preferido; la proteína expresada está codificada por codones que tienen un sesgo hacia el uso de *E. coli*. Durante el rediseño, se eliminaron las secuencias perjudiciales y los sitios de restricción superfluos para aumentar la eficacia de la transcripción/traducción de la secuencia de codificación de DGT-28 y para facilitar las etapas de manipulación del ADN. Por lo tanto, la expresión de DGT-28 a partir de un ácido nucleico que comprende la SEC ID NO: 4 en *E. coli* puede dar como resultado una expresión robusta de la proteína, por ejemplo, para la caracterización enzimática de DGT-28.

Una vez que se ha diseñado una secuencia de ADN optimizada (p. ej., una planta optimizada) sobre el papel o *in silico*, las moléculas de ADN reales se pueden sintetizar en el laboratorio para que se correspondan en secuencia con precisión con la secuencia diseñada. Dichas moléculas de ácido nucleico sintéticas pueden clonarse y manipularse de otra manera exactamente como si fueran derivadas de fuentes naturales o nativas.

Un ácido nucleico del presente documento puede clonarse en un vector para la transformación en células procariotas o eucariotas para la replicación y/o la expresión. Los vectores pueden ser vectores procariotas; por ejemplo, plásmidos o vectores lanzadera, vectores de insectos o vectores eucarióticos. Un ácido nucleico en el presente documento también puede clonarse en un vector de expresión, por ejemplo, para la administración a una célula vegetal. En ciertas aplicaciones, puede ser preferible tener vectores que sean funcionales en *E. coli* (por ejemplo, producción de proteínas para producir anticuerpos, análisis de secuencia de ADN, construcción de insertos, obtener cantidades de ácidos nucleicos).

Para expresar una proteína DGT-28 en una célula, un ácido nucleico que codifica la proteína se subclona típicamente en un vector de expresión que contiene un promotor para dirigir la transcripción. Los promotores bacterianos y eucariotas adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989; 3ª ed., 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., supra.). Los sistemas de expresión bacterianos para expresar un ácido nucleico en el presente documento están disponibles, por ejemplo, en *E. coli*, *Bacillus sp.* y *Salmonella* (Palva et al., *Gene* 22: 229 - 235 (1983)). Los kits para tales sistemas de expresión son comercialmente disponibles. Los sistemas de expresión eucarióticos para células de mamíferos, levaduras y células de insectos son bien conocidos por los expertos en la técnica y también están disponibles comercialmente.

El vector de expresión particular usado para transportar la información genética a la célula se selecciona con respecto al uso pretendido de la proteína DGT-28 (por ejemplo, la expresión en plantas, animales, bacterias, hongos y protozoos). Los vectores de expresión bacterianos y animales estándar son conocidos en la técnica y se describen con detalle, por ejemplo, en la publicación de patente de EE.UU. 20050064474A1 y las publicaciones de patente internacional WO 05/084190, WO 05/014791 y WO 03/080809. Los métodos de transfección estándar se pueden usar para producir líneas celulares bacterianas que expresan grandes cantidades de proteínas, que luego se pueden purificar utilizando técnicas estándar.

La selección de un promotor usado para dirigir la expresión de un ácido nucleico en el presente documento depende

de la aplicación en particular. Cierta número de promotores que dirigen la expresión de un gen en una planta pueden emplearse en realizaciones en este documento. Dichos promotores pueden seleccionarse entre promotores constitutivos, regulados químicamente, inducibles, específicos del tejido y preferidos de semillas. Por ejemplo, puede usarse un promotor constitutivo fuerte adecuado para la célula huésped para la expresión y la purificación de proteínas

5 DGT-28. Los ejemplos no limitantes de promotores vegetales incluyen secuencias promotoras derivadas de ubiquitina-10 de *A. thaliana* (ubi-10) (Callis, et al., 1990, J. Biol. Chem., 265: 12486 - 12493); manopina sintasa de *A. tumefaciens* (Δmas) (Petolino et al., patente de Estados Unidos nº 6.730.824); y/o virus del mosaico de la vena de la yuca (CsVMV) (Verdaguer et al., 1996, Plant Molecular Biology 31: 1129 - 1139).

Los promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el núcleo del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell et al. (1985) Nature 313: 810 - 812); promotor de la actina del arroz (McElroy et al. (1990) Plant Cell 2: 163 - 171); promotor de ubiquitina de maíz (patente de Estados Unidos nº 5.510.474; Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 619 - 632 y Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675 - 689); promotor pEMU (Last et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81: 581 - 588); promotor ALS (patente de Estados Unidos nº 5.659.026); promotor de histonas de maíz (Chabouté et al. Plant Molecular Biology, 8: 179 - 191 (1987)); y similares.

La gama de promotores compatibles con plantas disponibles incluye promotores inducibles y específicos del tejido. Un elemento regulador inducible es un elemento que es capaz de activar directa o indirectamente la transcripción de una o más secuencias de ADN o genes en respuesta a un inductor. En ausencia de un inductor, las secuencias de ADN o los genes no serán transcritos. Típicamente, el factor de proteína que se une específicamente a un elemento regulador inducible para activar la transcripción está presente en una forma inactiva, que luego es convertida directa o indirectamente en la forma activa por el inductor. El inductor puede ser un agente químico como una proteína, un metabolito, un regulador del crecimiento, un herbicida o un compuesto fenólico o un estrés fisiológico impuesto directamente por calor, frío, sal o elementos tóxicos o indirectamente a través de la acción de un agente patógeno o productor de enfermedades, como un virus. Típicamente, el factor proteico que se une específicamente a un elemento regulador inducible para activar la transcripción está presente en una forma inactiva que luego es convertida directa o indirectamente en la forma activa por el inductor. Una célula vegetal que contiene un elemento regulador inducible puede exponerse a un inductor aplicando externamente el inductor a la célula o planta, por ejemplo mediante pulverización, riego, calentamiento o métodos similares.

Se puede usar cualquier promotor inducible en realizaciones en este documento. Véase Ward et al. Plant Mol. Biol. 22: 361 - 366 (1993). Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo y sin que sean limitantes: promotores del receptor de ecidona (patente de Estados Unidos nº 6.504.082); promotores del sistema ACE1 que responden al cobre (Mett et al. PNAS 90: 4567 - 4571 (1993)); los genes In2-1 e In2-2 del maíz que responden a los protectores contra herbicidas de la bencenosulfonamida (patente de los Estados Unidos nº 5.364.780; Hershey et al., Mol. Gen. Genetics 227: 229 - 237 (1991) y Gatz y otros, Mol. Gen. Genetics 243: 32 - 38 (1994)); el represor Tet de Tn10 (Gatz et al., Mol. Gen. Genet. 227: 229 - 237 (1991); promotores de un gen de la hormona esteroide, cuya actividad transcripcional es inducida por una hormona glucocorticosteroide, Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10421 (1991) y McNellis et al., (1998) Plant J. 14 (2): 247 - 257; el promotor GST de maíz, que se activa por compuestos electrofílicos hidrófobos que se utilizan como herbicidas preemergentes (véase la patente de EE. UU. nº 5.965.387 y Solicitud de Patente Internacional, Publicación No. WO 93/001294); y el promotor PR-1a del tabaco, que se activa con ácido salicílico (véase Ono S., Kusama M., Ogura R., Hiratsuka K., "Evaluation of the Use of the Tobacco PR-1a Promoter to monitor Defense Gene Expression by the Luciferase Bioluminescence Reporter System", Biosci. Biotechnol. Biochem. 23 de septiembre de 2011; 75 (9): 1796 - 800). Otros promotores de interés regulados por sustancias químicas incluyen promotores inducibles por tetraciclina y represores de tetraciclina (véase, por ejemplo, Gatz et al., (1991) Mol. Gen. Genet. 227: 229 - 237, y las patentes de EE. UU. nº 5.814.618 y 5.789.156).

Otros promotores regulables de interés incluyen un elemento regulador que responde al frío o un elemento regulador del choque térmico, cuya transcripción se puede efectuar en respuesta a la exposición al frío o al calor, respectivamente (Takahashi et al., Plant Physiol. 99: 383 - 390, 1992); el promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa (Gerlach et al., PNAS USA 79: 2981 - 2985 (1982); Walker et al., PNAS 84 (19): 6624 - 6628 (1987)), inducible por condiciones anaeróbicas; el promotor inducible por la luz derivado del gen rbcS del guisante o el gen psaDb del guisante (Yamamoto et al. (1997) Plant J. 12 (2): 255 - 265); un elemento regulador inducible por la luz (Feinbaum et al., Mol. Gen. Genet. 226: 449, 1991; Lam y Chua, Science 248: 471, 1990; Matsuoka et al. (1993) Proc. Natl Acad Sci. USA 90 (20): 9586 - 9590; Orozco et al. (1993) Plant Mol. Biol. 23 (6): 1129 - 1138); un elemento regulador inducible por hormonas vegetales (Yamaguchi-Shinozaki et al., Plant Mol. Biol. 15: 905, 1990; Kares et al., Plant Mol. Biol. 15: 225, 1990), y similares. Un elemento regulador inducible también puede ser el promotor del gen In2-1 o In2-2 del maíz, que responde a los protectores del herbicida bencenosulfonamida (Hershey et al., Mol. Gen. Gene. 227: 229 - 237, 1991; Gatz et al., Mol. Gen. Genet. 243: 32 - 38, 1994), y el represor Tet del transposón Tn10 (Gatz et al., Mol. Gen. Genet. 227: 229 - 237, 1991).

Los promotores inducibles por estrés incluyen promotores inducibles por estrés sal/agua tales como P5CS (Zang et al. (1997) Plant Sciences 129: 81 - 89); promotores inducibles por frío, tales como cor15a (Hajela y otros (1990) Plant Physiol. 93: 1246 - 1252), cor15b (Wilhelm y otros (1993) Plant Mol. Biol. 23: 1073 - 1077), wsc120 (Ouellet y otros (1998) FEBS Lett. 423-324-328), ci7 (Kirch et al. (1997) Plant Mol. Biol. 33: 897 - 909), y ci21A (Schneider et al. (1997) Plant Physiol. 113: 335 - 45); promotores inducibles por la sequía, como Trg-31 (Chaudhary et al. (1996) Plant Mol. Biol. 30: 1247 - 57) y rd29 (Kasuga et al. (1999) Nature Biotechnology 18: 287 - 291); promotores inducibles osmóticos,

tales como Rab17 (Vilardell et al. (1991) Plant Mol. Biol. 17: 985-93) y osmotina (Raghothama et al. (1993) Plant Mol. Biol. 23: 1117 - 28); promotores inducibles por calor, como las proteínas de choque térmico (Barros et al. (1992) Plant Mol. Biol. 19: 665 - 75; Marrs et al. (1993) Dev. Genet. 14: 27 - 41), smHSP (Waters et al. (1996) J. Experimental Botany 47: 325 - 338); y el elemento inducible de choque térmico del promotor de ubiquitina de perejil (documento WO 03/102198). Otros promotores inducibles por estrés incluyen rip2 (patente de EE. UU. n° 5.332.808 y Publicación de EE. UU. n° 2003/0217393) y rd29a (Yamaguchi-Shinozaki et al. (1993) Mol. Gen. Genetics 236: 331 - 340). Ciertos promotores son inducibles por heridas, incluido el promotor pMAS de *Agrobacterium* (Guevara-Garcia et al. (1993) Plant J. 4 (3): 495 - 505) y el promotor ORF13 de *Agrobacterium* (Hansen et al., (1997) Mol. Gen. Genet. 254 (3): 337 - 343).

Los promotores preferidos de tejido pueden utilizarse para dirigir la transcripción y/o expresión mejorada dentro de un tejido vegetal particular. Los ejemplos de estos tipos de promotores incluyen la expresión preferida de la semilla, tal como la proporcionada por el promotor de faseolina (Bustos et al. 1989. The Plant Cell Vol. 1, 839 - 853), y el gen de la globulina-1 del maíz, Belanger, et al. 1991 Genetics 129: 863 - 972. Para las dicotiledóneas, dicots, los promotores preferidos de las semillas incluyen, pero no se limitan a ellos, β -faseolina de haba, napina, β -conglucina, lectina de soja, cruciferina y similares. Para las monocotiledóneas, monocots, los promotores preferidos de las semillas incluyen, entre otros, zeína de maíz de 15 kDa, zeína de 22 kDa, zeína de 27 kDa, γ -zeína, cerosa, *shrunk* 1, *shrunk* 2, globulina 1, etc. Los promotores preferidos de las semillas también incluyen aquellos promotores que dirigen la expresión génica predominantemente a tejidos específicos dentro de la semilla como, por ejemplo, el promotor preferido del endospermo de la γ -zeína, el promotor críptico del tabaco (Fobert et al. 1994. T-DNA tagging of a seed coat-specific cryptic promoter in tobacco. Plant J. 4: 567 - 577), el promotor del gen P del maíz (Chopra et al. 1996. Alleles of the maize P gene with distinct tissue specificities encode Myb-homologous proteins with C-terminal replacements. Plant Cell 7:1149 - 1158, Erratum in Plant Cell. 1997, 1:109), el promotor de globulina-1 del maíz (Belanger and Kriz. 1991. Molecular basis for Allelic Polymorphism of the maize Globulin-1 gene. Genetics 129: 863-972), y promotores que dirigen la expresión a la cáscara de la semilla o vaina del grano de maíz, por ejemplo el promotor de glutamina sintetasa específico del pericarpio (Muhitch et al., 2002. Isolation of a Promoter Sequence From the Glutamine Synthetase1-2 Gene Capable of Conferring Tissue-Specific Gene Expression in Transgenic Maize. Plant Science 163:865-872).

Además del promotor, un vector de expresión contiene típicamente una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión del ácido nucleico en células huésped, procariontas o eucariotas. Una casete de expresión típica, por tanto, contiene un promotor unido operativamente, por ejemplo, a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína, y señales requeridas, por ejemplo, para una poliadenilación eficaz del transcrito, terminación de la transcripción, sitios de unión al ribosoma o terminación de la traducción. Los elementos adicionales de la casete pueden incluir, por ejemplo, potenciadores y señales de corte y empalme heterólogas.

Se pueden incluir otros componentes del vector, también dependiendo del uso que se pretenda dar al gen. Los ejemplos incluyen marcadores seleccionables, secuencias de dirección o reguladoras, secuencias peptídicas de tránsito tales como las secuencias estabilizadoras de la secuencia peptídica de tránsito optimizada (véase la patente de EE. UU. n° 5.510.471) como RB7 MAR (véase Thompson y Myatt, (1997) Plant Mol. Biol., 34: 687 - 692 y WO9727207) o secuencias líder, intrones, etc. Las descripciones generales y los ejemplos de vectores de expresión de plantas y genes informadores se pueden encontrar en Gruber, et al., "Vectors for Plant Transformation" en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick et al. Eds; CRC Press pp. 89 - 119 (1993).

La selección de un vector de expresión apropiado dependerá del hospedador y del método de introducción del vector de expresión en el hospedador. La casete de expresión puede incluir, en el extremo 3' de una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés, una región de terminación transcripcional y traduccional funcional en las plantas. La región de terminación puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés o puede derivarse de otra fuente. Se dispone de regiones de terminación convenientes a partir del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de octopina sintasa y nopalina sintasa (nos) (Depicker et al., Mol. and Appl. Genet. 1: 561 - 573 (1982) y Shaw y otros (1984) Nucleic Acids Research vol. 12, No. 20 pp. 7831 - 7846 (nep)); véase también Guerineau et al. Mol. Gen. Genet. 262: 141 - 144 (1991); Proudfoot, Cell 64: 671 - 674 (1991); Sanfacon et al. Genes Dev. 5: 141 - 149 (1991); Mogen et al. Plant Cell 2: 1261 - 1272 (1990); Munroe et al. Gene 91: 151 - 158 (1990); Ballas et al. Nucleic Acids Res. 17: 7891 - 7903 (1989); Joshi et al. Nucleic Acid Res. 15: 9627 - 9639 (1987).

Una casete de expresión puede contener una secuencia líder 5'. Tales secuencias líder pueden actuar mejorando la traducción. Los líderes de la traducción son conocidos en la técnica e incluyen, a título de ejemplo, los líderes del picornavirus, el líder del EMCV (región no codificadora 5' de encefalomiocarditis), Elroy-Stein et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 6126 - 6130 (1989); líderes de potyvirus, por ejemplo, líder de TEV (Tobacco Etch Virus) Carrington y Freed Journal of Virology, 64: 1590 - 1597 (1990), líder de MDMV (Maize Dwarf Mosaic Virus), Allison et al., Virology 154: 9 - 20 (1986); proteína de unión (BiP) de cadena pesada de la inmunoglobulina humana, Macejak et al. Nature 353: 90 - 94 (1991); líder no traducido del ARNm de la proteína de la cubierta del virus del mosaico de la alfalfa (AMV ARN 4), Jobling et al. Nature 325: 622 - 625 (1987); líder del virus del mosaico del tabaco (TMV), Gallie et al. (1989) Molecular Biology of RNA, pp. 237 - 256; y líder del virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) Lommel et al. Virology 81: 382 - 385 (1991). Véase también Della-Cioppa et al. Plant Physiology 84: 965 - 968 (1987).

El constructo puede contener también secuencias que mejoran la traducción y/o la estabilidad del ARNm, tales como

los intrones. Un ejemplo de uno de estos intrones es el primer intrón del gen II de la variante de la histona H3.III de *Arabidopsis thaliana*. Chaubet et al. Journal of Molecular Biology, 225: 569 - 574 (1992).

En aquellos casos en los que es deseable tener el producto expresado de la secuencia de nucleótidos heteróloga dirigida a un orgánulo particular, en particular el plástido, amiloplasto, o al retículo endoplásmico, o secretada en la superficie de la célula o extracelularmente, la casete de expresión puede comprender además una secuencia de codificación para un péptido de tránsito. Dichos péptidos de tránsito son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a ellos, el péptido de tránsito para la proteína transportadora de acilo, la subunidad pequeña de RUBISCO, EPSP sintasa vegetal y *Helianthus annuus* (véase Lebrun et al., patente de Estados Unidos 5.510.417), péptido de tránsito al cloroplasto Brittle-1 de *Zea mays* (Nelson et al. Plant Physiol 117 (4): 1235 - 1252 (1998); Sullivan et al. Plant Cell 3 (12): 1337 - 48; Sullivan et al., Planta (1995) 196 (3): 477 - 84; Sullivan et al., J. Biol. Chem. (1992) 267 (26): 18999 - 9004) y similares. Además, son conocidos en la técnica los péptidos de tránsito al cloroplasto quimérico, tales como el Péptido de Tránsito Optimizado (véase la patente de Estados Unidos nº 5.510.471). Otros péptidos de tránsito al cloroplasto se han descrito previamente en las patentes de EE.UU. nº 5.717.084; 5.728.925. Un experto en la técnica apreciará fácilmente las muchas opciones disponibles en la expresión de un producto a un orgánulo particular. Por ejemplo, la secuencia de alfa amilasa de la cebada se usa a menudo para dirigir la expresión al retículo endoplásmico. Rogers, J. Biol. Chem. 260: 3731 - 3738 (1985).

Un experto en la materia apreciará que el uso de tecnologías de ADN recombinante puede mejorar el control de la expresión de moléculas de ácido nucleico transfectadas manipulando, por ejemplo, el número de copias de las moléculas de ácido nucleico dentro de la célula huésped, la eficiencia con la que se transcriben esas moléculas de ácido nucleico, la eficiencia con la que se traducen las transcripciones resultantes y la eficiencia de las modificaciones postraduccionales. Además, la secuencia del promotor podría estar diseñada genéticamente para mejorar el nivel de expresión en comparación con el promotor nativo. Las técnicas recombinantes útiles para controlar la expresión de las moléculas de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a ellas, la integración estable de las moléculas de ácido nucleico en uno o más cromosomas de la célula huésped, la adición de secuencias de estabilidad del vector a los plásmidos, sustituciones o modificaciones de las señales de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, operadores, potenciadores), sustituciones o modificaciones de las señales de control de la traducción (p. ej., sitios de unión a los ribosomas, secuencias Shine-Dalgarno o Kozak), modificación de moléculas de ácido nucleico para que correspondan al uso de codones de la célula huésped, y eliminación de secuencias que desestabilizan los transcritos.

Pueden incluirse genes informadores o marcadores en los vectores de transformación para la selección de células o tejidos transformados o partes de plantas, o plantas. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen los que confieren resistencia a antimetabolitos como herbicidas o antibióticos, por ejemplo dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13: 143 - 149, 1994; véase también Herrera Estrella et al., Nature 303: 209 - 213, 1983; Meijer et al., Plant Mol. Biol. 16: 807 - 820, 1991); neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a los aminoglucósidos neomicina, kanamicina y paromicina (Herrera Estrella, EMBO J. 2: 987 - 995, 1983 y Fraley et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 80: 4803 (1983)); higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a la higromicina (Marsh, Gene 32: 481-485, 1984; véase también Waldron et al., Plant Mol. Biol. 5: 103 - 108, 1985; Zhijian et al., Plant Science 108: 219 - 227, 1995); trpB, que permite a las células utilizar indol en vez de triptófano; hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 8047, 1988); manosa-6-fosfato isomerasa que permite a las células utilizar manosa (documento WO 94/20627); ornitina descarboxilasa, que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina (DFMO; McConlogue, 1987, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.); y desaminasa de *Aspergillus terreus*, que confiere resistencia a Blasticidin S (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59: 2336 - 2338, 1995).

Los marcadores seleccionables adicionales incluyen, por ejemplo, una acetolactato sintasa mutante, que confiere resistencia a la imidazolinona o la sulfonilurea (Lee et al., EMBO J. 7: 1241 - 1248, 1988), un psbA mutante, que confiere resistencia a la atrazina (Smeda et al., Plant Physiol. 103: 911 - 917, 1993), o una protoporfirinógeno oxidasa mutante (véase la patente de Estados Unidos nº 5.767.373), u otros marcadores que confieren resistencia a un herbicida como el glufosinato. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables adecuados incluyen, pero no se limitan a ellos, genes que codifican resistencia al cloranfenicol (Herrera Estrella et al., EMBO J. 2: 987 - 992, 1983); estreptomycin (Jones et al., Mol. Gen. Genet. 210: 86 - 91, 1987); espectinomycin (Bretagne-Sagnard et al., Transgenic Res. 5: 131 - 137, 1996); bleomicina (Hille et al., Plant Mol. Biol. 7: 171 - 176, 1990); sulfonamida (Guerineau et al., Plant Mol. Biol. 15: 127 - 136, 1990); bromoxinilo (Stalker et al., Science 242: 419 - 423, 1988); glifosato (Shaw et al., Science 233: 478 - 481, 1986); fosfotricina (DeBlock et al., EMBO J. 6: 2513 - 2518, 1987), y similares.

Una opción para usar un gen selectivo es un ADN codificador de resistencia al glufosinato y en una realización puede ser la fosfotricina acetil transferasa (*pat*), gen *pat* o gen *bar* optimizado del maíz o bajo el control del promotor del virus del mosaico de la vena de la mandioca. Estos genes confieren resistencia al bialafos (ver, Wohlleben et al., (1988) Gene 70: 25 - 37); Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2: 603; 1990; Uchimiya et al., BioTechnology 11: 835, 1993; White et al., Nucl. Acidos Res. 18: 1062, 1990; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79: 625 - 631, 1990; y Anzai et al., Mol. Gen. Gen. 219: 492, 1989). Una versión del gen *pat* es el gen *pat* optimizado del maíz, descrito en la patente de los EE. UU. nº 6.096.947.

Además, pueden emplearse marcadores que faciliten la identificación de una célula vegetal que contiene el polinucleótido que codifica el marcador. Son útiles los marcadores apilables o seleccionables, donde la presencia de la secuencia genera un producto medible y puede generar el producto sin destrucción de la célula vegetal. Los ejemplos incluyen una β -glucuronidasa, o gen *uidA* (GUS), que codifica una enzima para la cual se conocen diversos sustratos cromogénicos (por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.268.463 y 5.599.670); cloranfenicol acetil transferasa (Jefferson et al. The EMBO Journal vol. 6 No. 13 pp. 3901 - 3907); y fosfatasa alcalina. En una realización preferida, el marcador usado es beta caroteno o provitamina A (Ye et al., Science 287: 303 - 305 (2000)). El gen se ha utilizado para mejorar la nutrición del arroz, pero en este caso se emplea como marcador seleccionable, y la presencia del gen vinculado a un gen de interés se detecta por el color dorado que proporciona. A diferencia de la situación en la que el gen se utiliza por su contribución nutricional a la planta, una cantidad menor de la proteína es suficiente para fines de marcado. Otros marcadores seleccionables incluyen los genes de antocianina/ flavonoides en general (véase discusión en Taylor y Briggs, The Plant Cell (1990) 2: 115 - 127) que incluye, por ejemplo, un gen del locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta et al., en Chromosome Structure and Function, Kluwer Academic Publishers, Appels y Gustafson eds., pp. 263 - 282 (1988)); los genes que controlan la biosíntesis de los pigmentos de los flavonoides, como el gen C1 del maíz (Kao et al., Plant Cell (1996) 8: 1171 - 1179; Scheffler et al., Mol. Gen. Genet. (1994) 242: 40 - 48) y C2 del maíz (Wienand et al., Mol. Gen. Genet. (1986) 203: 202 - 207); el gen B (Chandler et al., Plant Cell (1989) 1: 1175 - 1183), el gen p1 (Grotewold et al., Proc. Natl Acad Sci USA (1991) 88: 4587 - 4591; Grotewold et al., Cell (1994) 76: 543 - 553; Sidorenko et al., Plant Mol. Biol. (1999) 39: 11 - 19); los genes del locus bronze (Ralston et al., Genetics (1988) 119: 185 - 197; Nash et al., Plant Cell (1990) 2 (11): 1039 - 1049), entre otros.

Otros ejemplos de marcadores adecuados incluyen el gen de la proteína fluorescente cian (CYP) (Bolte et al. (2004) J. Cell Science 117: 943 - 54 y Kato et al. (2002) Plant Physiol 129: 913 - 42), el gen de la proteína fluorescente amarilla (PHIYFP™ de Evrogen; véase Bolte et al. (2004) J. Cell Science 117: 943 - 54); un gen lux, que codifica una luciferasa, cuya presencia puede detectarse utilizando, por ejemplo, película de rayos X, recuento de centelleo, espectrofotometría fluorescente, cámaras de video de luz baja, cámaras de recuento de fotones o luminometría de pozos múltiples (Teeri et al. (1989) EMBO J. 8: 343); un gen de proteína fluorescente verde (GFP) (Sheen et al., Plant J. (1995) 8 (5): 777 - 84); y DsRed2 donde las células vegetales transformadas con el gen marcador son de color rojo y por tanto se pueden seleccionar visualmente (Dietrich et al. (2002) Biotechniques 2 (2): 286 - 293). Los ejemplos adicionales incluyen un gen de β -lactamasa (Sutcliffe, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA (1978) 75: 3737), que codifica una enzima para la cual se conocen diversos sustratos cromogénicos (p. ej., PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen xylE (Zukowsky et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA (1983) 80: 1101), que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos; un gen de α -amilasa (Ikuta et al., Biotech. (1990) 8: 241); y un gen de tirosinasa (Katz et al., J. Gen. Microbiol. (1983) 129: 2703), que codifica una enzima capaz de oxidar la tirosina a DOPA y dopaquinona, que a su vez se condensa para formar la melanina compuesta fácilmente detectable. Claramente, muchos de estos marcadores están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica.

IV. Células y organismos que comprenden DGT-28.

La invención se define en las reivindicaciones. En algunas formas de realización, se proporciona una célula y/o un organismo (por ejemplo, una célula vegetal o planta) que comprende una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que confiere a una planta tolerancia al glifosato, en donde la EPSPS es idéntico al menos en un 90% a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 y cuando está alineado con la SEC ID NO: 1 comprende una alanina en la posición correspondiente a la posición 84 de la SEC ID NO: 1. En realizaciones particulares, se proporciona una célula y/o un organismo que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que confiere a una planta tolerancia al glifosato, en donde la EPSPS es al menos en un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 y cuando está alineada con la SEC ID NO: 1 comprende una alanina en la posición correspondiente a la posición 84 de la SEC ID NO: 1, en donde el polinucleótido es una secuencia sintética que se ha diseñado para la expresión en una planta seleccionada entre el grupo que consiste en:

un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 3; y

un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con otro ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 3 en condiciones de rigor alto,

en donde el polinucleótido está unido operativamente a un promotor, en donde preferiblemente el promotor está dirigiendo la expresión de un gen; por ejemplo, un ácido nucleico *dgt-28*.

Una célula vegetal, una parte de la planta y/o una planta pueden modificarse genéticamente para comprender un polipéptido heterólogo (por ejemplo, una proteína DGT-28) y/o un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un ácido nucleico *dgt-28*) por cualquiera de varios métodos para introducir una molécula heteróloga conocidos en la técnica. En realizaciones particulares en el presente documento, una molécula heteróloga se introduce en una célula vegetal, una parte de una planta y/o una planta por transformación.

Cualquier especie de planta o célula vegetal puede modificarse genéticamente para comprender un polipéptido y/o

ácido nucleico heterólogo. En algunas realizaciones, la célula vegetal que está genéticamente modificada no es capaz de regenerarse para producir una planta. En algunas realizaciones, las plantas que están así modificadas genéticamente de acuerdo con la presente descripción (por ejemplo, células huésped vegetales) incluyen, pero no se limitan a ellas, una planta superior, una planta dicotiledónea, una planta monocotiledónea, una planta consumible, una planta de cultivo, y una planta utilizada por sus aceites (por ejemplo, una planta de semillas oleaginosas). Tales plantas incluyen, por ejemplo y sin ser limitantes: alfalfa; haba de soja; algodón; colza (canola); linaza; maíz; arroz; brachiaria; trigo; cártamo; sorgo; remolacha azucarera; girasol; tabaco; y pastos (por ejemplo césped). En ejemplos particulares, una planta o célula vegetal modificada genéticamente incluye, por ejemplo y sin limitación: *Brassica napus*; mostaza india (*Brassica juncea*); mostaza etíope (*Brassica carinata*); nabo (*Brassica rapa*); col (*Brassica oleracea*); *Glycine max*; *Linum usitatissimum*; *Zea mays*; *Carthamus tinctorius*; *Helianthus annuus*; *Nicotiana tabacum*; *Arabidopsis thaliana*, nuez de Brasil (*Betholettia excelsa*); haba de ricino (*Ricinus communis*); nuez de coco (*Cocos nucifera*); cilantro (*Coriandrum sativum*); *Gossypium spp.*; maní (*Arachis hypogaea*); jojoba (*Simmondsia chinensis*); palma de aceite (*Elaeis guineensis*); oliva (*Olea europaea*); *Oryza sativa*; calabaza (*Cucurbita maxima*); cebada (*Hordeum vulgare*); caña de azúcar (*Saccharum officinarum*); *Triticum spp.* (incluyendo *Triticum durum* y *Triticum aestivum*); y la lenteja de agua (*Lemnaceae sp.*). En algunas realizaciones, la planta puede tener un fondo genético particular, como para los cultivares de élite, los cultivares de tipo salvaje y las variedades distinguibles comercialmente.

Los ácidos nucleicos introducidos en una célula vegetal pueden usarse para conferir los rasgos deseados en cualquier planta concreta. Se puede diseñar una amplia variedad de plantas y sistemas celulares vegetales para las características fisiológicas y agronómicas deseadas descritas en este documento utilizando un ácido nucleico que codifica un polipéptido DGT y diversos métodos de transformación. Las realizaciones de este documento pueden usar cualquiera de los muchos métodos para la transformación de plantas (y la producción de plantas modificadas genéticamente) que se conocen en la técnica. Se han desarrollado numerosos métodos para la transformación de plantas, incluyendo protocolos de transformación física y biológica para plantas dicotiledóneas, así como plantas monocotiledóneas (véase, por ejemplo, Goto-Fumiyuki et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17: 282 - 6; Miki et al. (1993) Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology (Glick, B. R. y Thompson, J. E., eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp. 67 - 88). Además, los vectores y los métodos de cultivo *in vitro* para la transformación de células y tejidos vegetales y la regeneración de plantas se describen, por ejemplo, en Gruber et al. (1993), *supra*, en pp. 89 - 119.

Las técnicas de transformación de plantas disponibles para la introducción de un ácido nucleico en una célula huésped de la planta incluyen, por ejemplo y sin limitación: la transformación con ADN-T desarmado usando *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes* como agente de transformación; transfección con fosfato de calcio; transformación con polibreno; fusión de protoplastos; electroporación (D'Halluin et al. (1992) Plant Cell 4: 1495 - 505); métodos ultrasónicos (p. ej., sonoporación); transformación de liposomas; microinyección; contacto con ADN desnudo; contacto con vectores plasmídicos; contacto con vectores virales; biolística (por ejemplo, bombardeo con partículas de ADN (véase, por ejemplo, Klein et al. (1987) Nature 327: 70-3) y bombardeo con micropartículas (Sanford et al. (1987) Part. Sci. Technol. 5:27; Sanford (1988) Trends Biotech. 6: 299, Sanford (1990) Physiol. Plant 79: 206; y Klein et al. (1992) Biotechnology 10: 268); transformación mediada por WHISKERS de carburo de silicio (Kaeppler et al. (1990) Plant Cell Rep. 9: 415 - 8); transformación de nanopartículas (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos nº US2009/0104700A1); emisión de aerosol; y captación mediada por polietilenglicol (PEG). En ejemplos específicos, un ácido nucleico heterólogo puede introducirse directamente en el ADN genómico de una célula vegetal.

Un método ampliamente utilizado para introducir un vector de expresión en una planta se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium*. Horsch et al. (1985) Science 227: 1229. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo, patógenas para las plantas, que se sabe que son útiles para transformar genéticamente células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, llevan genes responsables de la transformación genética de la planta. Kado (1991) Crit. Rev. Plant. Sci. 10: 1. Los detalles en relación con los sistemas de vectores de *Agrobacterium* y los métodos para la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* también están disponibles, por ejemplo, en Gruber et al., *supra*, Miki et al., *supra*, Moloney et al. (1989) Plant Cell Reports 8: 238, y las patentes de EE. UU. nº 4.940.838 y 5.464.763.

Si se usa *Agrobacterium* para la transformación, el ADN que se va a insertar se clona típicamente en plásmidos especiales; ya sea en un vector intermedio o en un vector binario. Los vectores intermedios no pueden replicarse ellos mismos en *Agrobacterium*. El vector intermedio se puede transferir a *A. tumefaciens* por medio de un plásmido auxiliar (conjugación). El sistema Japan Superbinary Tobacco es un ejemplo de dicho sistema (revisado por Komari et al. (2006) Methods in Molecular Biology (K. Wang, ed.) No. 343; *Agrobacterium* Protocols, 2ª edición, Vol. 1, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp.15 - 41; y Komori y otros (2007) Plant Physiol. 145: 1155 - 60). Los vectores binarios se pueden replicar tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*. Los vectores binarios comprenden un gen marcador de selección y un enlazador o polienlazador que están enmarcados por las regiones de borde T-ADN derecha e izquierda. Se pueden transformar directamente en *Agrobacterium* (Holsters, 1978). El *Agrobacterium* comprende un plásmido que lleva una región *vir*. El plásmido Ti o Ri también comprende la región *vir* necesaria para la transferencia del ADN-T. La región *vir* es necesaria para la transferencia del T-ADN a la célula vegetal. Puede contener también T-ADN.

Las funciones de virulencia del huésped de *Agrobacterium tumefaciens* dirigirán la inserción de una cadena T que contiene el constructo y el marcador adyacente en el ADN de la célula vegetal cuando la célula es infectada por la bacteria utilizando un vector de ADN T binario (Bevan (1984) Nuc. Acid Res. 12: 8711 - 21) o el procedimiento de co-cultivo (Horsch et al. (1985) Science 227: 1229 - 31). En general, el sistema de transformación *Agrobacterium* se utiliza

para diseñar plantas dicotiledóneas. Bevan et al. (1982) Ann. Rev. Genet 16: 357 - 84; Rogers et al. (1986) Methods Enzymol. 118: 627 - 41. El sistema de transformación *Agrobacterium* también se puede usar para transformar, así como para transferir, ácidos nucleicos a plantas monocotiledóneas y células vegetales. Véase la patente de Estados Unidos nº 5.591.616; Hernalsteen et al. (1984) EMBO J 3: 3039 - 41; Hooykass-Van Slogteren et al. (1984) Nature 311: 763 - 4; Grimsley et al. (1987) Nature 325: 1677 - 9; Boulton et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 31-40; y Gould et al. (1991) Plant Physiol. 95: 426 - 34.

Las manipulaciones genéticas de un huésped recombinante en el presente documento se pueden realizar utilizando técnicas genéticas y selección estándar, y se pueden llevar a cabo en cualquier célula huésped que sea adecuada para la manipulación genética. En algunas realizaciones, una célula huésped recombinante puede ser cualquier organismo o microorganismo huésped adecuado para la modificación genética y/o la expresión génica recombinante. En algunas realizaciones, un huésped recombinante puede ser una planta. Las técnicas estándar de ADN recombinante y de clonación molecular utilizadas aquí son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, y sin ser limitantes: Sambrook et al. (1989), *supra*; Silhavy et al. (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience, Nueva York, NY.

Después de la introducción de un ácido nucleico en una célula vegetal, la célula vegetal puede crecer y, tras emerger tejido diferenciador, como brotes y raíces, se pueden generar plantas maduras. En algunas realizaciones, se puede generar una pluralidad de plantas. Los expertos en la técnica conocen las metodologías para regenerar plantas y pueden encontrarse, por ejemplo, en Plant Cell and Tissue Culture, 1994, Vasil y Thorpe Eds. Kluwer Academic Publishers y en Plant Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Biology 111, 1999 Hall Eds Humana Press). Las plantas modificadas genéticamente descritas en el presente texto pueden cultivarse en un medio de fermentación o crecer en un medio adecuado, como el suelo. En algunas realizaciones, un medio de crecimiento adecuado para plantas superiores puede ser cualquier medio de crecimiento para plantas, que incluye, pero sin ser limitantes, tierra, arena, cualquier otro medio en partículas que soporte el crecimiento de la raíz (p. ej., vermiculita, perlita, etc.) o cultivo hidropónico, así como luz adecuada, agua y suplementos nutricionales que facilitan el crecimiento de la planta superior.

Las células vegetales transformadas que se producen mediante cualquiera de las técnicas de transformación anteriores pueden cultivarse para regenerar una planta completa que posee el genotipo transformado y, por tanto, el fenotipo deseado. Tales técnicas de regeneración se basan en la manipulación de ciertas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo tisular, basándose típicamente en un marcador de biocida y/o herbicida que se ha introducido junto con las secuencias de nucleótidos deseadas. La regeneración de la planta a partir de protoplastos cultivados se describe en Evans, et al., "Protoplasts Isolation and Culture" en Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124 - 176, Macmillan Publishing Company, New York, 1983; and Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21 - 73, CRC Press, Boca Raton, 1985. La regeneración también se puede obtener a partir de callos de plantas, explantes, órganos, pólenes, embriones o partes de los mismos. Tales técnicas de regeneración se describen en general en Klee et al. (1987) Ann. Rev. of Plant Phys. 38: 467 - 486.

En otras realizaciones, las células vegetales que se transforman no son capaces de regenerarse para producir una planta. Dichas células pueden emplearse, por ejemplo, en el desarrollo de una línea celular vegetal que tenga el fenotipo de interés, por ejemplo, la resistencia a herbicidas.

Una célula vegetal, callo, tejido o planta transformada puede identificarse y aislarse seleccionando o cribando el material vegetal diseñado para rasgos codificados por los genes marcadores presentes en el ADN transformante. Por ejemplo, la selección puede realizarse cultivando el material vegetal construido, en medios que contengan una cantidad inhibitoria del antibiótico o herbicida al cual confiere resistencia el constructo transformador del gen. Además, las plantas transformadas y las células vegetales también pueden identificarse mediante la detección de las actividades de cualquier gen marcador visible (por ejemplo, los genes de la β -glucuronidasa, luciferasa o gfp) que pueden estar presentes en los constructos de ácido nucleico recombinante. Dichas metodologías de selección y cribado son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Puede producirse una planta transgénica que contiene una molécula heteróloga de la presente invención a través de la reproducción selectiva, por ejemplo, cruzando sexualmente una primera planta parental que comprende la molécula y una segunda planta parental, produciendo así una pluralidad de plantas de primera progenie. Luego, se puede seleccionar una primera planta de progenie que sea resistente a un marcador seleccionable (por ejemplo, glifosato, la resistencia al cual puede ser conferida a la planta de progenie por la molécula heteróloga). La primera planta de progenie puede entonces ser autosembrada, produciendo así una pluralidad de plantas de segunda progenie. Luego, se puede seleccionar una segunda planta de progenie que sea resistente al marcador seleccionable. Estos pasos pueden incluir además el cruce de la primera planta de progenie o la segunda planta de progenie a la segunda planta parental o una tercera planta parental.

También debe entenderse que dos plantas transgénicas diferentes pueden también aparearse para producir descendientes que contienen dos genes exógenos añadidos y segregados independientemente. La autosiembra de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigóticas para ambos genes agregados y exógenos. También se contempla el retrocruzamiento hacia una planta parental y la fecundación externa con una planta no

transgénica, como es la propagación vegetativa. Son conocidos en la técnica otros métodos de multiplicación comúnmente usados para diferentes características y cultivos. La reproducción por retrocruzamiento se ha utilizado para transferir genes para un rasgo simplemente hereditario y altamente heredable a un cultivar o línea pura homocigótica deseable, que es el progenitor recurrente. Es de esperar que la planta resultante tenga los atributos del padre recurrente (p. ej., el cultivar) y el rasgo deseable transferido del padre donante. Después del cruce inicial, los individuos que poseen el fenotipo del padre donante se seleccionan y se cruzan repetidamente (retrocruzado) con el padre recurrente. Es de esperar que el padre resultante tenga los atributos del padre recurrente (p. ej., el cultivar) y el rasgo deseable transferido del padre donante.

También se puede introducir un ácido nucleico en un área predeterminada del genoma de la planta mediante recombinación homóloga. Los métodos para integrar establemente una secuencia de polinucleótidos dentro de un sitio cromosómico específico de una célula vegetal mediante recombinación homóloga se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la integración específica del sitio como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos nº 2009/0111188 A1 implica el uso de recombinasas o integrasas para mediar en la introducción de una secuencia de polinucleótido donante en una diana cromosómica. Además, la Solicitud de Patente Internacional nº WO 2008/021207 describe la recombinación homóloga mediada por el dedo de zinc para integrar de manera estable una o más secuencias de polinucleótidos donantes en localizaciones específicas del genoma. El uso de recombinasas tales como FLP/FRT como se describe en la patente de EE. UU. nº 6.720.475, o CRE/LOX como se describe en la patente de EE. UU. nº 5.658.772, puede utilizarse para integrar establemente una secuencia de polinucleótidos en un sitio cromosómico específico. Finalmente, el uso de meganucleasas para dirigir los polinucleótidos del donante a una ubicación cromosómica específica se describió en Puchta et al., PNAS USA 93 (1996) pp. 5055 - 5060).

Otros métodos diversos para la integración específica del sitio dentro de células vegetales son generalmente conocidos y aplicables (Kumar et al., Trends in Plant Sci. 6 (4) (2001) pp. 155 - 159). Además, los sistemas de recombinación específicos del sitio que se han identificado en varios organismos procariotas y eucariotas inferiores se pueden aplicar para su uso en plantas. Los ejemplos de tales sistemas incluyen, pero sin limitarse a ellos, el sistema de recombinasa R/RS del plásmido pSR1 de la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki y otros (1985) J. Mol. Biol. 182: 191 - 203) y el sistema Gin/gix del fago Mu (Maeser y Kahlmann (1991) Mol. Gen. Genet. 230: 170 -176).

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que confiere a una planta tolerancia al glifosato, en donde la EPSPS es al menos idéntica en un 90% a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 y cuando está alineada con la SEC ID NO: 1 comprende una alanina en la posición correspondiente a la posición 84 de la SEC ID NO: 1, en donde el polinucleótido es una secuencia sintética que ha sido diseñada para la expresión en una planta, como se describió anteriormente, puede combinarse opcionalmente con otro ácido nucleico en la célula y/u organismo hospedador. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada, como se describe anteriormente, puede combinarse o "apilarse" con otro que proporcione resistencia adicional o tolerancia al glifosato u otro herbicida, y/u otro que proporcione resistencia a insectos o a enfermedades seleccionadas y/o mejoras nutricionales, y/o características agronómicas mejoradas, y/u otro que proporcione proteínas u otros productos útiles para piensos, alimentos, productos industriales, farmacéuticos u otros. El "apilamiento" de dos o más secuencias de ácidos nucleicos de interés dentro del genoma de una planta se puede lograr, por ejemplo, a través de la transformación de una planta con uno o más constructos que contienen los ácidos nucleicos, la re-transformación de una planta transgénica, o la adición de nuevos rasgos a través de la integración dirigida por medio de la recombinación homóloga.

Los ácidos nucleicos que pueden "apilarse" con la molécula de ácido nucleico aislada, como se describe anteriormente, incluyen, por ejemplo y sin ser limitantes:

Genes o secuencia de codificación (p. ej. IRNA) que confieren resistencia a plagas o enfermedades.

(A) Genes de resistencia a enfermedades de las plantas. Las defensas de las plantas se activan frecuentemente por la interacción entre el producto de un gen de resistencia a la enfermedad (R) en la planta y el producto de un gen de avirulencia correspondiente en el patógeno. Una diversidad de plantas pueden transformarse con un gen de resistencia clonado para construir plantas que son resistentes a cepas patógenas específicas. Los ejemplos de tales genes incluyen el gen Cf-9 del tomate para la resistencia a *Cladosporium fulvum* (Jones et al., 1994 Science 266: 789), el gen *Pto* del tomate, que codifica una proteína quinasa, para la resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. tomate (Martin et al., 1993 Science 262: 1432), y el gen de *Arabidopsis* RSSP2 para la resistencia a *Pseudomonas syringae* (Mindrinos et al., 1994 Cell 78: 1089).

(B) Una proteína de *Bacillus thuringiensis*, un derivado de la misma o un polipéptido sintético modelado en la misma, tal como una secuencia de nucleótidos de un gen *Bt* δ -endotoxina (Geiser et al., 1986 Gene 48: 109), y un gen de insecticida vegetativo (VIP) (véase, por ejemplo, Estruch et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 5389 - 94). Además, las moléculas de ADN que codifican los genes de endotoxina pueden adquirirse en la American Type Culture Collection (Rockville, Md.), bajo los números de registro de entrada ATCC 40098, 67136, 31995 y 31998.

(C) Una lectina, tal como las secuencias de nucleótidos de varios genes de la lectina de unión con manosa de *Clivia miniata* (Van Damme y otros, 1994 Plant Molec. Biol. 24: 825).

(D) Una proteína de unión a la vitamina, como la avidina y los homólogos de avidina que son útiles como larvicidas contra plagas de insectos. Véase la patente de EE.UU. N° 5.659.026.

(E) Un inhibidor de enzimas, por ejemplo, un inhibidor de proteasa o un inhibidor de amilasa. Los ejemplos de los genes incluyen un inhibidor de la cisteína-proteinasa del arroz (1987, J. J. Biol. Chem. 262: 16793), un inhibidor I de la proteinasa del tabaco (Huub y otros, 1993 Plant Molec. Biol. 21: 985), y un inhibidor de la α -amilasa (Sumitani et al., 1993 Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1243).

(F) Una hormona o una feromona específicas para insectos, tal como un ecdisteroide y una hormona juvenil, una variante de la misma, un mimético basado en la misma, o un antagonista o agonista de la misma, como la expresión de baculovirus de la hormona juvenil clonada esterasa, un inactivador de la hormona juvenil (Hammock et al., 1990 Nature 344: 458).

(G) Un péptido o neuropéptido específico del insecto que, al expresarse, altera la fisiología de la plaga afectada (J. Biol. Chem. 269: 9). Los ejemplos de dichos genes incluyen un receptor de hormona diurética de insecto (Regan, 1994), una alostatina identificada en *Diploptera punctata* (Pratt, 1989) y neurotoxinas parálíticas específicas del insecto (patente de Estados Unidos n° 5.266.361).

(H) Un veneno específico del insecto producido en la naturaleza por una serpiente, una avispa, etc., tal como un péptido insectotóxico del escorpión (Pang, 1992 Gene 116: 165).

(I) Una enzima responsable de una hiperacumulación de monoterpeneo, un sesquiterpeneo, un esteroide, ácido hidroxámico, un derivado fenilpropanoide u otra molécula no proteica con actividad insecticida.

(J) Una enzima implicada en la modificación, incluida la modificación postraduccional, de una molécula biológicamente activa; por ejemplo, enzima glucolítica, una enzima proteolítica, una enzima lipolítica, una nucleasa, una ciclasa, una transaminasa, una esterasa, una hidrolasa, una fosfatasa, una quinasa, una fosforilasa, una polimerasa, una elastasa, una quinasa y una glucasa, sea natural o sintética. Los ejemplos de dichos genes incluyen un gen callas (solicitud publicada PCT WO93/02197), secuencias codificantes de quitinasa (que pueden obtenerse, por ejemplo, de la ATCC con los números de registro 3999637 y 67152), quitinasa del anquilostoma del tabaco (Kramer et al., 1993 Insect Molec. Biol. 23: 691), y el gen de la poliubiquitina ubi4-2 del perejil (Kawalleck et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21: 673).

(K) Una molécula que estimula la transducción de la señal. Los ejemplos de tales moléculas incluyen secuencias de nucleótidos para clones de ADNc de calmodulina de frijol mungo (Botella et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24: 757) y una secuencia de nucleótidos de un clon de ADNc de calmodulina de maíz (Griess et al., 1994 Plant Physiol. 104: 1467).

(L) Un péptido de momento hidrófobo. Véase la patente de EE.UU. n° 5.659.026 y 5.607.914; esta última enseña péptidos antimicrobianos sintéticos que confieren resistencia a la enfermedad.

(M) Una permeasa de la membrana, un formador de canales o un bloqueador de canales, tal como el análogo de péptido lítico cecropina- β (Jaynes et al., 1993 Plant Sci. 89:43) que hace que las plantas de tabaco transgénicas sean resistentes a *Pseudomonas solanacearum*.

(N) Una proteína viral invasiva o una toxina compleja derivada de ella. Por ejemplo, la acumulación de proteínas virales de cobertura en las células vegetales transformadas confiere resistencia al desarrollo de la infección viral y/o de la enfermedad efectuado por el virus del que se deriva el gen de la proteína de la cubierta, así como por virus relacionados. La resistencia mediada por la proteína de cobertura ha sido conferida en plantas transformadas contra el virus del mosaico de la alfalfa, el virus del mosaico del pepino, el virus del estriado del tabaco, el virus K de la patata, el virus Y de la patata, el virus etch del tabaco, el virus del cascabeleo del tabaco y el virus del mosaico del tabaco. Véase, por ejemplo, Beachy et al. (1990) Ann. Rev. Phytopathol. 28: 451.

(O) Un anticuerpo específico de insecto o una inmunotoxina derivada del mismo. Por lo tanto, un anticuerpo dirigido a una función metabólica crítica en el intestino del insecto inactivaría una enzima afectada, matando al insecto. Por ejemplo, Taylor et al. (1994) Abstract n° 497, Seventh Int'l Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions, muestra la inactivación enzimática en tabaco transgénico a través de la producción de fragmentos de anticuerpo de cadena única.

(P) Un anticuerpo específico contra el virus. Véase, por ejemplo, Tavladoraki et al. (1993) Nature 266 : 469, que demuestra que las plantas transgénicas que expresan genes de anticuerpos recombinantes están protegidas del ataque de virus.

(Q) Una proteína que detiene el desarrollo productivo en la naturaleza por un patógeno o un parásito. Así pues, las endo α -1,4-D poligalacturonasas fúngicas facilitan la colonización fúngica y la liberación de las plantas solubilizando la homo- α -1,4-D-galacturonasa de la pared celular de las plantas (Lamb et al., 1992) Bio/Technology 10: 1436. La clonación y caracterización de un gen que codifica una proteína que inhibe la

endopoligalacturonasa del frijol se describe en Toubart et al. (1992 Plant J. 2: 367).

(R) Una proteína que detiene el desarrollo producida en la naturaleza por una planta, como el gen de inactivación de los ribosomas de la cebada, que proporciona una mayor resistencia a la enfermedad fúngica (Longemann et al., 1992). Bio/Tecnology 10: 3305.

5 (S) Interferencia de ARN, en la que se utiliza una molécula de ARN para inhibir la expresión de un gen diana. Una molécula de ARN en un ejemplo es parcial o totalmente bicatenaria, lo cual desencadena una respuesta de silenciamiento, con el resultado de la escisión del ARNbc en pequeños ARN de interferencia, que luego se incorporan en un complejo de direccionamiento que destruye los ARNm homólogos. Véanse, por ejemplo, Fire et al., patente de Estados Unidos 6.506.559; Graham et al. 6.573.099.

10 Genes que confieren resistencia a un herbicida.

(A) Genes que codifican resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristema, tal como un herbicida de imidazalinona, sulfonanilida o sulfonilurea. Los genes ejemplares en esta categoría codifican una enzima ALS mutante (Lee et al., 1988 EMBO J. 7: 1241), que también se conoce como enzima AHAS (Miki et al., 1990 Theor. Appl. Genet. 80: 449).

15 (B) Uno o más genes adicionales que codifican la resistencia o la tolerancia al glifosato, impartidos por los genes mutantes de la EPSP sintasa y *aroA*, o por inactivación metabólica por genes como el GAT (glifosato acetiltransferasa) o GOX (glifosato oxidasa) y otros compuestos fosfona como glufosinato (genes *pat* y *bar*; DSM-2), y ácidos ariloxifenoxipropiónicos y ciclohexanodionas (genes que codifican inhibidores de la ACCasa). Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.940.835, que describe la secuencia de nucleótidos de una forma de EPSP que puede conferir resistencia al glifosato. Se puede obtener una molécula de ADN
20 que codifica un gen *aroA* mutante bajo el número de registro ATCC 39256, y la secuencia de nucleótidos del gen mutante se describe en la patente de EE. UU. n° 4.769.061. La solicitud de patente europea n° 0 333 033 y la patente de EE.UU. n° 4.975.374 describen secuencias de nucleótidos de genes de la glutamina sintetasa que confieren resistencia a herbicidas tales como L-fosfotricina. La secuencia de nucleótidos de un gen de fosfotricinacetiltransferasa se proporciona en la solicitud europea n° 0 242 246. De Greef et al. (1989) Bio/Technology 7:61 describe la producción de plantas transgénicas que expresan genes *bar* quiméricos que codifican la actividad de la fosfotricina acetil transferasa. Ejemplos de genes que confieren resistencia a los ácidos ariloxifenoxipropiónicos y a las ciclohexanodionas, tales como setoxidim y haloxifop, son los genes Accl-S1, Accl-S2 y Accl-S3 descritos por Marshall et al. (1992) Theor. Apl. Genet. 83: 435.

30 (C) Genes que codifican resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe la fotosíntesis, como una triazina (genes *psbA* y *gs+*) y un benzonitrilo (gen de la nitrilasa). Przibilla et al. (1991) Plant Cell 3: 169 describe el uso de plásmidos que codifican genes *psbA* mutantes para transformar *Chlamydomonas*. Las secuencias de nucleótidos para los genes de nitrilasa se describen en la patente de EE.UU. n° 4.810.648, y las moléculas de ADN que contienen estos genes están disponibles con los números de acceso de ATCC 53435, 67441 y 67442. La clonación y expresión de ADN que codifica una glutatión S-transferasa está descrita por Hayes et al. (1992) Biochem. J. 285: 173.

(D) Genes que codifican resistencia o la tolerancia a un herbicida que se une a hidroxifenilpiruvato dioxigenasas (HPPD), enzimas que catalizan la reacción en la cual el para-hidroxifenilpiruvato (HPP) se transforma en homogentisato. Esto incluye herbicidas tales como los isoxazoles (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, patente de Estados Unidos n° 5.424.276), en particular isoxaflutol, que es un herbicida selectivo para el maíz, diketonitrilos (EP496630, EP496631), en particular 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃-fenil)propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3-Cl₂fenil)propano-1,3-diona, tricetonas (EP625505, EP625508, patente de Estados Unidos n° 5.506.195), en particular sulcotriona, y pirazolinatos. Un gen que produce una sobreabundancia de HPPD en plantas puede proporcionar tolerancia o resistencia a dichos herbicidas, incluyendo, por ejemplo, los genes descritos en las patentes de EE. UU. n° 6.268.549 y 6.245.968 y la Solicitud de Patente de EE. UU., Publicación n° 20030066102.

50 (E) Genes que codifican resistencia o tolerancia a los herbicidas de fenoxi auxina, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y que también pueden conferir resistencia o tolerancia a los herbicidas ariloxifenoxipropionato (AOPP). Los ejemplos de tales genes incluyen el gen de la enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (*aad-1*), descrito en la patente de Estados Unidos n° 7.838.733.

(F) Genes que codifican resistencia o tolerancia a herbicidas fenoxi auxina, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y que también pueden conferir resistencia o tolerancia a herbicidas de piridiloxi auxina, como fluroxipir o triclopir. Los ejemplos de dichos genes incluyen el gen de la enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (*aad-12*), descrito en el documento WO 2007/053482 A2.

55 (G) Genes que codifican resistencia o tolerancia a dicamba (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos número 20030135879).

(H) Genes que proporcionan resistencia o tolerancia a los herbicidas que inhiben la protoporfirinógeno oxidasa (PPO) (véase la patente de EE. UU. nº 5.767.373).

(I) Genes que proporcionan resistencia o tolerancia a los herbicidas de triazina (como la atrazina) y derivados de urea (como el diuron), herbicidas que se unen a las proteínas del núcleo de los centros de reacción del fotosistema II (PS II) (véase Brussian et al., (1989) EMBO J. 1989, 8 (4): 1237 - 1245).

Genes que confieren o contribuyen a un rasgo de valor añadido.

(A) Metabolismo de los ácidos grasos modificado, por ejemplo, transformando maíz o *Brassica* con un gen antisentido o esteroil-ACP desaturasa para aumentar el contenido de ácido esteárico de la planta (Knultzon et al., 1992) Proc. Nat. Acad Sci. USA 89: 2624.

(B) Disminución del contenido de fitato.

(1) La introducción de un gen que codifica fitasa, como el gen de la fitasa de *Aspergillus niger* (Van Hartingsveldt et al., 1993 Gene 127: 87), mejora la descomposición del fitato y agrega más fosfato libre a la planta transformada.

(2) Se podría introducir un gen que reduzca el contenido de fitato. En el maíz, esto podría lograrse, por ejemplo, mediante la clonación y luego reintroduciendo el ADN asociado con el alelo único que es responsable de los mutantes del maíz caracterizados por bajos niveles de ácido fítico (Raboy et al., 1990 Maydica 35: 383).

(C) Modificación de la composición de carbohidratos efectuada, por ejemplo, transformando plantas con un gen que codifica una enzima que altera el patrón de ramificación del almidón. Los ejemplos de dichas enzimas incluyen el gen de la fructosiltransferasa de *Streptococcus mucus* (Shiroza et al., 1988) J. Bacteriol. 170: 810, gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (Steinmetz et al., 1985 Mol. Gen. Genet. 200: 220), α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Pen et al., 1992 Bio/Technology 10: 292), genes de invertasa del tomate (Elliot et al., 1993), gen de amilasa de la cebada (Sogaard et al., 1993 J. Biol. Chem. 268: 22480), y enzima de ramificación de almidón de endospermo II del maíz (Fisher et al., 1993 Plant Physiol. 102: 10450).

Se pueden emplear varios ensayos en relación con la molécula de ácido nucleico de ciertas realizaciones de la descripción. Las técnicas que siguen son útiles en diversas situaciones, y en una realización son útiles para detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico y/o el polipéptido codificado en una célula vegetal. Por ejemplo, la presencia de la molécula se puede determinar de varias maneras, incluyendo el uso de un cebador o sonda de la secuencia, un ensayo ELISA para detectar la proteína codificada, una transferencia Western para detectar la proteína o una transferencia Northern o Southern para detectar ARN o ADN. Se pueden emplear ensayos enzimáticos para detectar la enzima DGT-28. Además, puede generarse un anticuerpo que puede detectar la presencia de la proteína DGT-28 usando procedimientos reconocidos en la técnica. También se pueden usar técnicas adicionales, como la hibridación *in situ*, la tinción enzimática y la inmunotinción, para detectar la presencia o la expresión de la construcción recombinante en órganos y tejidos vegetales específicos. Un transgén puede expresarse selectivamente en algunos tejidos de la planta o en algunas etapas de desarrollo, o el transgén puede expresarse en sustancialmente todos los tejidos de la planta, sustancialmente a lo largo de todo su ciclo de vida. Sin embargo, también es aplicable cualquier modo de expresión combinatoria.

El análisis de Southern es un método de detección usado comúnmente, en el que el ADN se corta con endonucleasas de restricción y se fracciona en un gel de agarosa para separar el ADN por peso molecular y luego se transfiere a las membranas de nailon. Luego se hibrida con el fragmento de la sonda que se marcó radiactivamente con ^{32}P (u otros marcadores de sonda) y se lava en una solución de SDS.

Del mismo modo, el análisis de Northern despliega un protocolo similar, en el que el ARN se corta con endonucleasas de restricción y se fracciona en un gel de agarosa para separar el ARN por peso molecular y luego se transfiere a las membranas de nailon. Después se hibrida con el fragmento de sonda que fue marcada radiactivamente con ^{32}P (u otros marcadores de sonda) y se lava en una solución de SDS. El análisis del ARN (p. ej., ARNm) aislado de los tejidos de interés puede indicar niveles de expresión relativos. Normalmente, si el ARNm está presente o si la cantidad de ARNm ha aumentado, se puede suponer que se está expresando el transgén correspondiente. El análisis Northern, u otros protocolos analíticos de ARNm, se puede usar para determinar los niveles de expresión de un transgén o gen nativo introducido.

En el análisis de Western, en vez de aislar el ADN/ARN, la proteína de interés se extrae y se coloca en un gel de acrilamida. La proteína se transfiere luego a una membrana y se pone en contacto con una sustancia marcadora. Véase, por ejemplo, Hood et al., "Commercial Production of Avidin from Transgenic Maize: Characterization of Transformants, Production, Processing, Extraction and Purification" Molecular Breeding 3: 291 - 306 (1997); Towbin et al. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications" Proc Natl Acad Sci USA 76 (9): 4350 - 4354; Renart et al. "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyl-methyl-paper and detection with an antiserum: a method for studying antibody specificity and antigen structure" Proc Natl Acad Sci USA 76 (7): 3116 - 3120.

Los ácidos nucleicos del presente texto, o segmentos de los mismos, pueden usarse para diseñar cebadores para amplificación por PCR. Al realizar la amplificación por PCR, se puede tolerar un cierto grado de desajuste entre el cebador y la plantilla. Se pueden producir mutaciones, inserciones y deleciones en un cebador dado por métodos conocidos por un experto en la técnica.

- 5 Otro ejemplo del método de detección es la técnica de pirosecuenciación que describe Winge (Innov. Pharma. Tech. 00: 18 - 24, 2000). En este método, se diseña un oligonucleótido que se solapa con el ADN genómico adyacente e inserta la unión del ADN. El oligonucleótido se hibrida con un producto de PCR monocatenario de la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y otro en la secuencia genómica flanqueante) y se incuba en presencia de una ADN polimerasa, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5'-fosfosulfato y luciferina. Los DNTPs se añaden individualmente y la incorporación da como resultado una señal luminosa que se mide. Una señal luminosa indica la presencia de la secuencia de inserto/flanqueo de transgenes debido a una amplificación, hibridación y extensión simple o de múltiples bases con éxito.

- 15 Se han descrito balizas moleculares para su uso en la detección de secuencias. Brevemente, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET que solapa la unión genómica flanqueante e inserto ADN. La estructura única de la sonda FRET hace que contenga una estructura secundaria que mantiene en estrecha proximidad los restos fluorescentes y de apagado. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTPs. Después de la exitosa amplificación por PCR, la hibridación de la sonda o las sondas de FRET con la secuencia diana da como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de los restos fluorescentes y de apagado. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia del inserto genómico/transgénico flanqueante debido a la amplificación e hibridación con éxito.

- 25 El ensayo de sonda de hidrólisis, conocido también como TAQMAN® (Life Technologies, Foster City, Calif.), es un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. Brevemente, una sonda oligonucleotídica FRET está diseñada con un oligo dentro del transgén y uno en la secuencia genómica de flanqueo para la detección específica de un evento. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridación de la sonda FRET tiene por resultado la escisión y la liberación del resto fluorescente que se aleja del resto de apagado en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia del inserto flanqueante/transgénico debido a la amplificación e hibridación con éxito.

- 30 El ELISA o el inmunoensayo ligado a enzimas se conoce desde 1971. En general, los antígenos solubilizados en un tampón se aplican como recubrimiento sobre una superficie de plástico. Cuando se agrega suero, los anticuerpos pueden adherirse al antígeno en la fase sólida. La presencia o ausencia de estos anticuerpos puede demostrarse cuando se conjugan con una enzima. La adición del sustrato apropiado detectará la cantidad de conjugado unido que se puede cuantificar. Un ensayo ELISA común es un ensayo que utiliza anticuerpos policlonales anti-(proteína) biotinilados y un conjugado de fosfatasa alcalina. Por ejemplo, un ELISA utilizado para la determinación cuantitativa de los niveles de enzima lacasa puede ser un ensayo tipo sándwich de anticuerpos, que utiliza anticuerpos policlonales de conejo obtenidos comercialmente. El anticuerpo se conjuga con fosfatasas alcalinas para su detección. En otro ejemplo, un ensayo ELISA para detectar tripsina o tripsinógeno utiliza anticuerpos policlonales anti-tripsina o anti-tripsinógeno biotinilados y un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

- 40 Ciertas realizaciones se refieren a procesos para realizar cruces usando una planta de una realización de esta descripción como al menos un padre. Por ejemplo, realizaciones particulares se refieren a una planta híbrida F₁ que tiene como uno o ambos progenitores cualquiera de las plantas ejemplificadas en el presente documento. Otras realizaciones se refieren a semillas producidas por tales híbridos F₁. Otras realizaciones más se relacionan con un método para producir una semilla híbrida F₁ cruzando una planta ejemplificada con una planta diferente (p. ej., progenie consanguínea) y cosechando la semilla híbrida resultante. Otras realizaciones se relacionan con una planta ejemplificada que es un progenitor femenino o un progenitor masculino. Las características de las plantas resultantes pueden mejorarse mediante una cuidadosa consideración de las plantas parentales.

V. Tolerancia al glifosato mediada por DGT- 28.

- 50 La invención se define en las reivindicaciones. Los polipéptidos que tienen al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1 pueden tener actividad enzimática de EPSPS. Así pues, los polipéptidos que tienen al menos un 90% de identidad con la SEC ID NO: 1, los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad con la SEC ID NO: 1 (por ejemplo, las SEC ID NO: 2-4) y un ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico que tiene la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 3 en condiciones de alto rigor, pueden usarse en algunas realizaciones para conferir tolerancia al glifosato a una célula u organismo (por ejemplo, una planta o célula vegetal). Proporcionar una planta o una célula vegetal que sea resistente a las formulaciones de herbicidas de glifosato puede ser útil en diversas aplicaciones, en las que las células vegetales que tienen tal resistencia pueden tolerar la exposición a una cantidad suficiente de glifosato que se usa para controlar al menos algunas malezas en un área bajo cultivo.

El glifosato, una composición que comprende N-(fosfonometil) glicina, es un componente ampliamente utilizado en herbicidas. El glifosato se formula típicamente como una sal en un concentrado líquido acuoso, un concentrado sólido,

una emulsión o una microemulsión. El glifosato se puede aplicar sobre la parte superior de las plantas desde la emergencia a lo largo de las distintas fases del desarrollo de la planta.

Las variedades de plantas tolerantes al glifosato utilizadas en combinación con formulaciones herbicidas de glifosato se han convertido en el programa estándar para la gestión de malezas en la producción de cultivos en los Estados Unidos y en todo el mundo. La principal ventaja para los cultivadores al usar un rasgo de tolerancia al glifosato es que permite la aplicación simple y cómoda de glifosato; un amplio espectro, herbicida de post-emergencia, para el control de plantas y hierbas no deseadas (es decir, "malezas") con una excelente seguridad de los cultivos y menor dependencia de las aplicaciones de herbicidas pre-plantas. Otras ventajas incluyen un mejor ajuste en sistemas de no-labranza y de labranza reducida. Los cultivos tolerantes al glifosato han ampliado las opciones para la gestión de malezas y han hecho mucho más fácil, menos costosa y más flexible la práctica del control de las malezas. Los productores han referido que realizan menos viajes a través de los campos para aplicar herbicidas, así como que realizan menos viajes de cultivo, lo que ahorra combustible y reduce la erosión del suelo. Los cultivos tolerantes al glifosato, por tanto, reducen los riesgos ambientales que plantean los herbicidas, al tiempo que aumentan la eficacia del necesario control químico de las malezas.

Se puede aplicar una composición de glifosato a las plantas a una tasa de aplicación suficiente para obtener los resultados biológicos deseados, por ejemplo la represión del crecimiento de las malezas sin afectar significativamente a las plantas de cultivo tolerantes al glifosato. Estas tasas de aplicación generalmente se expresan como la cantidad de glifosato por unidad de área tratada, por ejemplo, gramos por hectárea (g/ha). Lo que constituye un "efecto significativo" varía de acuerdo con los estándares y la práctica de quienes investigan, desarrollan, comercializan y utilizan composiciones, y la selección de tasas de aplicación que son significativamente efectivas para una composición está dentro de los conocimientos de los expertos en la materia.

En ciertos ejemplos, la cantidad de la composición de glifosato aplicada por unidad de área para dar un 85% de control de una especie de maleza medida por reducción del crecimiento o mortalidad, se usa para definir una tasa de aplicación. La selección de un número de tasas de aplicación de herbicida de glifosato suficientes para controlar las malezas en un área de cultivo está dentro de la experiencia de un profesional agrícola ordinario. Los expertos en la materia reconocerán igualmente que las condiciones individuales de la planta, el clima y las condiciones de crecimiento, así como los ingredientes activos específicos y su relación en peso en la composición, pueden influir en el grado de eficacia herbicida en una aplicación particular.

En general, se puede aplicar una composición acuosa de glifosato a los tejidos foliares de las plantas para matar o controlar el crecimiento de una gran variedad de plantas no deseadas, incluidas las especies de hierba anual y perenne y de malezas de hoja ancha, aplicándose a los tejidos foliares de las plantas composiciones acuosas de glifosato. La cantidad relativa de glifosato presente en una composición herbicida contemplada (por ejemplo, un concentrado sólido en partículas, un concentrado líquido, una composición lista para usar y una composición de mezcla en tanque) puede variar dependiendo de muchos factores entre los que se incluyen, por ejemplo, las especies de malezas a controlar y el método de aplicación. En términos generales, sin embargo, la concentración de glifosato y, opcionalmente, de un agente tensioactivo y/o algún otro coadyuvante o aditivo (como se describe en otra parte de este documento) en la composición herbicida, son suficientes para controlar las malezas dentro de un área de cultivo.

Una composición de pulverización herbicida se puede aplicar como una solución o una dispersión acuosa, bien sea que la composición se fabrique lista para su aplicación, o bien como resultado de la dilución adicional de un concentrado de glifosato líquido o la adición de agua a un concentrado de glifosato sólido en partículas. Sin embargo, el término "acuoso", como se usa en el presente documento, incluye composiciones que comprenden una pequeña cantidad de disolvente no acuoso, siempre que el disolvente predominante presente sea agua. Las composiciones de aerosol no herbicidas se pueden aplicar al follaje de las plantas a tratar a través de cualquiera de los métodos apropiados que son bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo las técnicas de aplicación aérea y de aplicación terrestre (por ejemplo una barra pulverizadora, un pulverizador manual y un aplicador de impregnación).

En algunos ejemplos, se formula una composición de concentrado líquido para incluir glifosato en una concentración de al menos aproximadamente 50 gramos, al menos aproximadamente 75 gramos, o al menos aproximadamente 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690 o 700 gramos (equivalente de ácido o a.e.: acid equivalent)) por litro, o más. El margen de concentración de glifosato puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 50 a aproximadamente 680 gramos (a.e.) por litro (gpl), de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 gpl, de aproximadamente 250 a aproximadamente 600 gpl y de aproximadamente 360 a aproximadamente 540 gpl.

Cuando se expresa como porcentaje en peso basado en el peso total del concentrado de glifosato, un concentrado líquido puede comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 10% en peso de glifosato (a.e.), al menos aproximadamente el 15% en peso, y al menos aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, o 68% en peso, o más. El margen de concentración de glifosato puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 10% en peso a aproximadamente 70% en peso a.e.), de aproximadamente 20% en peso a aproximadamente 68% en peso, o de aproximadamente 25% en peso a aproximadamente 45% en peso.

Si el glifosato se aplica como una composición lista para usar, la concentración de glifosato puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 3% en peso a.e., y de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 2% en peso.

Las composiciones para pulverización pueden formularse para la aplicación de, por ejemplo, al menos aproximadamente 1 galón de composición de pulverización por acre, al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 galones por acre, y más. El volumen de rociado de la composición para pulverización puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 1 galón a aproximadamente 100 galones por acre, de aproximadamente 2 galones a aproximadamente 40 galones por acre, y de aproximadamente 2 galones a aproximadamente 5 galones por acre para una aplicación aérea, y de aproximadamente 5 galones a aproximadamente 20 galones por acre para una aplicación terrestre.

En general, puede emplearse una formulación de concentrado líquido que tiene una fase acuosa en la que el glifosato está presente predominantemente en forma de sal, y una fase no acuosa que contiene opcionalmente un segundo ingrediente herbicida activo que es relativamente insoluble en agua. Dichas formulaciones pueden incluir, por ejemplo, emulsiones (incluidas macroemulsiones y microemulsiones, agua en aceite, aceite en agua y agua en aceite en agua), suspensiones y suspoemulsiones. La fase no acuosa puede comprender en ciertos casos un componente microencapsulado (por ejemplo, un herbicida microencapsulado). En formulaciones que tienen una fase no acuosa, la concentración de glifosato a.e. en la composición como un todo puede, sin embargo, estar dentro de los márgenes ejemplares particulares citados aquí para formulaciones concentradas acuosas.

Las formas de sal adecuadas de glifosato que se pueden usar de acuerdo con cualquiera de las formulaciones incluyen, por ejemplo, sales de metales alcalinos, por ejemplo sales de sodio y potasio, sales de amonio, sales de diamonio tales como dimetilamonio, sales de alquilamina, por ejemplo sales de dimetilamina e isopropilamina, sales de alcanolamina, por ejemplo sales de etanolamina, sales de alquilsulfonio, por ejemplo sales de trimetilsulfonio, sales de sulfoxonio, y mezclas o combinaciones de las mismas. Los ejemplos de formulaciones comerciales de glifosato incluyen, sin restricción: GLYPHOMAX™, GLYPHOMAX™ XRT, GLYPHOMAX™ PLUS, DURANGO™, ROUNDUP™ ULTRA, ROUNDUP™ ULTRAMAK, ROUNDUP™ CT, ROUNDUP™ EXTRA, ROUNDUP™ BIOACTIVE, ROUNDUP™ BIOFORCE™, POLARIS™, SPARK™, ACCORD™ SP, ACCORD™ XRT y ACCORD™ CONCENTRATE, todos los cuales contienen glifosato como su sal de isopropilamonio (IPA); ROUNDUP™ DRY y RIVAL™, que contienen glifosato como su sal de amonio; ROUNDUP™ GEOFORCE, una formulación de glifosato de sodio; TOUCHDOWN™, una formulación de sal de glifosato trimesio, TOUCHDOWN™ IQ, una formulación de glifosato de diamonio, TOUCHDOWN™ TOTAL IQ, una formulación de glifosato de potasio y ROUNDUP™ WEATHERMAX, una formulación de glifosato de potasio. Las formulaciones de glifosato pueden incluir agentes de protección, agentes tensioactivos y/o adyuvantes.

Si se desea, el usuario puede mezclar uno o más coadyuvantes con una composición de glifosato y el agua de dilución cuando se prepara una formulación para su aplicación. Dichos coadyuvantes pueden incluir agente tensioactivo adicional y/o una sal inorgánica (por ejemplo, sulfato de amonio) con el objetivo de mejorar aún más la eficacia herbicida.

Si se desea, el usuario puede también emplear protectores apropiados en una formulación de glifosato para una mayor protección de las plantas y/o para añadir resistencia cruzada a más herbicidas. Los protectores son agentes químicos que reducen la fitotoxicidad de los herbicidas a las plantas de cultivo por un mecanismo fisiológico o molecular, sin comprometer la eficacia de la represión de las malezas. Los protectores generalmente actúan aumentando el sistema inmunológico de una planta activando/expresando la cP450. Los protectores ejemplares incluyen, por ejemplo, y sin limitación: benoxacor, cloquintocet, ciometrinil, diclormid, diciclonon, dietolato, fenclorazol, fenclorim, flurazol, fluxofenim, furilazol, isoxadifen, mefenpir, mefenato, anhídrido ftálico y oxabetrinil.

Pueden usarse protectores para la protección de cultivos de gramíneas de semillas grandes, por ejemplo, y sin ser limitante, maíz, sorgo en grano y arroz húmedo, contra los herbicidas incorporados en pre-siembras o aplicados en pre-emergencia de las familias de tiocarbamato y cloroacetanilida. Los protectores también se han desarrollado para proteger los cultivos de cereales de invierno como el trigo contra las aplicaciones en post-emergencia de los herbicidas de ariloxifenoxipropionato y sulfonilurea. El uso de protectores para la protección del maíz y el arroz contra la sulfonilurea, imidazolinona, ciclohexanediona, isoxazol y tricetona también está bien establecido.

Los activadores de plantas (una nueva clase de compuestos que protegen a las plantas activando sus mecanismos de defensa) también se pueden usar en las realizaciones en la presente invención. Los activadores de plantas ejemplares incluyen acibenzolar y probenazol.

Las realizaciones de la presente invención se definen adicionalmente en los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos se dan solo a título de ilustración. Partiendo de la discusión anterior y de estos ejemplos, un experto en la técnica puede comprobar las características esenciales de esta invención, y puede realizar diversos cambios y modificaciones de las realizaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. Por lo tanto, diversas modificaciones de las realizaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en este documento, serán evidentes para los expertos en la técnica partiendo de la descripción anterior. Se entiende también que dichas modificaciones caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Lo que sigue se proporciona a

modo de ilustración y no pretende limitar el alcance de la invención.

Ejemplos.

Ejemplo 1: Materiales y Métodos.

Las realizaciones de la presente descripción se exponen con más detalle en los ejemplos que siguen, que se ofrecen a título de ilustración y en modo alguno pretenden limitar la invención.

Una única mutación de aminoácido (G96A) en la enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa de *Escherichia coli* (EPSP sintasa) puede tener como resultado una insensibilidad al glifosato (Padgett et al., (1991); Eschenburg et al., (2002); Priestman et al., (2005); Haghani et al., (2008)). Aunque esta mutación confiere tolerancia al glifosato, también se sabe que afecta negativamente a la unión de la EPSP sintasa con su sustrato natural, fosfoenolpiruvato (PEP). El cambio resultante en la eficiencia de unión al sustrato puede hacer que una enzima mutada sea inadecuada para proporcionar tolerancia *in planta* al glifosato.

La base de datos NCBI Genbank se barrió *in silico* en relación con la proteína EPSP sintasa y secuencias de polinucleótidos que contienen naturalmente una alanina en una posición análoga dentro de la enzima EPSP sintasa, a la de la mutación G96A que se introdujo en la versión de *E. coli* de la enzima (Padgett et al., (1991); Eschenburg et al., (2002); Priestman et al., (2005); Haghani et al., (2008)).

Una enzima en la que se identificó que contenía una alanina natural en esta posición fue DGT-28 (GENBANK ACC NO: ZP_06917240.1) de *Streptomyces sviveus* ATCC29083. Además, la extracción de datos *in silico* reveló otras tres enzimas de *Streptomyces* únicas con mayor homología con DGT-28; DGT-31 (GENBANK ACC NO: YP_004922608.1); DGT-32 (GENBANK ACC NO: ZP_04696613); y DGT-33 (GENBANK ACC NO: NC_010572). Cada una de estas enzimas contiene una alanina natural en una posición análoga dentro de la enzima EPSP sintasa como la de la mutación G96A que se introdujo en la versión de *E. coli* de la enzima. FIG. 1.

Dado que las proteínas de la EPSP sintasa de diferentes organismos tienen diferentes longitudes, la numeración de la mutación para la versión de *E. coli* de la enzima EPSP sintasa no se corresponde necesariamente con la numeración de la mutación para las enzimas de la EPSP sintasa de los otros organismos. Estas enzimas de la EPSP sintasa identificadas no se caracterizaron previamente con respecto a la tolerancia al glifosato o a la afinidad del sustrato PEP. Además, estas enzimas de la EPSP sintasa representan una nueva clase de enzimas de la EPSP sintasa y no contienen ningún motivo de secuencia que se haya utilizado para caracterizar la Clase I anteriormente descrita (secuencias derivadas de plantas descritas con más detalle en la patente de EE. UU. No. RE39247), Clase II (secuencias derivadas de bacterias descritas con más detalle en la Patente de EE.UU. N° RE39247), y Clase III (secuencias derivadas de bacterias descritas adicionalmente en la Solicitud de Patente Internacional WO 2006/110586) de enzimas EPSP sintasa.

Las nuevas enzimas DGT-28, DGT-31, DGT-32 y DGT-33 se caracterizaron por la tolerancia al glifosato y la afinidad del sustrato de PEP en comparación con las enzimas EPSP sintasa de la Clase I. Las siguientes enzimas de Clase I: DGT-1 de *Glycine max*, DGT-3 de *Brassica napus* (GENBANK ACC NO: P17688) y DGT-7 de *Triticum aestivum* (GENBANK ACC NO: EU977181) fueron para comparación. Se sintetizaron y evaluaron las enzimas EPSP sintasas de Clase I y sus variantes mutantes. Una mutación introducida en las enzimas de la EPSP sintasa de la planta consistió en la mutación de glicina a alanina hecha dentro de la enzima de la EPSP sintasa en una localización similar a la de la mutación G96A de la versión de *E. coli* de la enzima. Además, se introdujeron mutaciones de treonina a isoleucina y de prolina a serina dentro de estas enzimas EPSP sintasa de Clase I en posiciones análogas a las del aminoácido 97 (T a I) y el aminoácido 101 (P a S) en la EPSP sintasa de *E. coli* como se describe en Funke et al., (2009).

La FIG. 1 representa una alineación de secuencia parcial de DGT-28, DGT-31, DGT-32 y DGT-33 con otras enzimas de la EPSP sintasa. Las cuatro enzimas DGT comparten una alanina conservada en la posición 96 de aminoácido de la enzima *aroA* EPSP sintasa. La localización de este aminoácido se indica con un asterisco, y el resto del aminoácido está subrayado.

La FIG. 2 muestra una alineación de las enzimas DGT-1, DGT-3 y DGT-7. La localización del resto de aminoácido que se mutó de glicina a alanina se indica con el primer asterisco. La localización del resto de aminoácido que mutó de treonina a isoleucina se indica mediante el segundo asterisco. La localización del tercer resto de aminoácido que mutó de prolina a serina se indica con el tercer asterisco. Estas mutaciones se introdujeron en diferentes versiones de DGT-1, DGT-3 y DGT-7. Las distintas versiones (v1, v2, v3 ... vN) de los genes que contienen las mutaciones se describen con más detalle a continuación.

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

Optimización de la planta. El sesgo de codón para dicotiledóneas y monocotiledóneas (maíz) se calculó como la frecuencia con la que se usa un solo codón en relación con los codones para todos los aminoácidos. **Tabla 1.** Alternativamente, el sesgo del codón se puede calcular como la frecuencia con la que se usa un solo codón para codificar un aminoácido particular, en relación con todos los demás codones para ese aminoácido (codones sinónimos). Al diseñar las regiones de codificación para la expresión en la planta, se determinaron los codones

primarios ("primera elección") preferidos por la planta, así como la segunda, tercera, cuarta, etc. selecciones de codones preferidos cuando existían múltiples opciones.

El análisis de la secuencia codificadora de DGT-28 de *S. svicensis* reveló la presencia de varios motivos de secuencia que se creía que eran perjudiciales para la expresión óptima de la planta, así como una composición de codón no óptima para la expresión en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.

5

Tabla 1. Representación de codón sinónimo de las regiones codificadoras de los genes de plantas monocotiledóneas (maíz %) y dicotiledóneas (dicot %) se muestran en las columnas D, E, I y J. Los valores para un conjunto de representación del codón equilibrado-sesgado para un diseño del gen sintético optimizado para la planta, están en las columnas C y H.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
Aminoácido	Codón	Media ponderada	Maíz %	Dicot %	Aminoácido	Codón	Media ponderada	Maíz %	Dicot %	
ALA (A)	GCA	25,5	18	25	LEU (L)	CTA	DNU	8	8	
	GCC	35,6	34	27		CTC	34,3	26	19	
	GCG	DNU	24	6		CTG	DNU	29	9	
	GCT	39,0	24	42		CTT	34,3	17	28	
ARG R	AGA	27,4	15	30		TTA	DNU	5	10	
	AGG	31,5	26	25		TTG	31,4	15	26	
	CGA	DNU	9	8	LYS (K)	AAA	30,6	22	39	
	CGC	21,7	24	11		AAG	69,4	78	61	
	CGG	DNU	15	4	MET (M)	ATG	100	100	100	
	CGT	19,4	11	21	PHE (F)	TTC	63,2	71	55	
ASN (N)	AAC	61,4	68	55	100	TTT	36,8	29	45	
	AAT	38,6	32	45		PRO (P)	CCA	41,4	26	42
ASP (D)	GAC	52,6	63	42	CCC		25,3	24	17	
	GAT	47,4	37	58	100		CCG	DNU	28	9
CYS (C)	TGC	61,8	68	56	100		CCT	33,3	22	32
	TGT	38,2	32	44		SER (S)	AGC	26,0	23	18
END	TAA		20	48	100	AGT	DNU	9	14	
	TAG		21	19		TCA	22,4	16	19	
	TGA		59	33		TCC	26,3	23	18	
GLN (Q)	CAA	48,4	38	59		TCG	DNU	14	6	
	CAG	51,6	62	41		TCT	25,4	15	25	
GLU (E)	GAA	38,8	29	49		THR (T)	ACA	28,0	21	27
	GAG	61,2	71	51	ACC		39,5	37	30	
GLY (G)	GGA	28,5	19	38	100		ACG	DNU	22	8
	GGC	29,0	42	16			ACT	32,5	20	35
	GGG	16,0	20	12	TRP (W)	TGG	100	100	100	
	GGT	26,6	20	33	TYR (Y)	TAC	65,0	73	57	
	HIS (H)	CAC	54,1	62	46	100	TAT	35,0	27	43
CAT		45,9	38	54	VAL (V)	GTA	DNU	8	12	
ILE (I)	ATA	15,9	14	18		100	GTC	28,7	32	20
	ATC	47,9	58	37			GTG	38,0	39	29
	ATT	36,4	28	45			GTT	33,3	21	39
*DNU = no se usa										

10

Para diseñar los genes optimizados para la planta que codifican una proteína DGT-28, se diseñaron secuencias de ADN para codificar las secuencias de aminoácidos, utilizando un código genético redundante establecido a partir de la tabla de sesgo de codones compilada a partir de las secuencias codificadoras de proteínas para las plantas hospedadoras en particular. En la **Tabla 1**, las Columnas D y I presentan las distribuciones (en % del uso para todos los codones para ese aminoácido) de codones sinónimos para cada aminoácido, como se encuentra en las regiones codificadoras de plantas monocotiledóneas (maíz). Las columnas E y J presentan las distribuciones (en % del uso para todos los codones para ese aminoácido) de codones sinónimos para cada aminoácido, como se encuentra en las regiones codificadoras de las plantas dicotiledóneas. Algunos codones sinónimos para algunos aminoácidos se encuentran tan solo raramente en genes de plantas (por ejemplo, CGG). Generalmente, se consideró que un codón se usaba raras veces si está representado en aproximadamente el 10% o menos del tiempo para codificar el aminoácido relevante en genes de un tipo de planta cualquiera (indicado por DNU en las Columnas C y H de la **Tabla 1**). Para equilibrar la distribución de las opciones de codón restantes para un aminoácido, se calculó una representación del promedio ponderado para cada codón, utilizando la fórmula:

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

donde C1 es el codón en cuestión, y % C2, % C3, etc. representan los promedios de los valores en % para las dicotiledóneas de codones sinónimos remanentes (los valores de % medio para los codones relevantes se toman de las Columnas C y H) de la **Tabla 1**.

El valor del % del promedio ponderado para cada codón se da en las columnas C y H de la **Tabla 1**.

Usando el procedimiento anterior, se diseñó una nueva secuencia de ADN que codifica esencialmente la secuencia de aminoácidos de la proteína DGT-28 para una expresión óptima en plantas dicotiledóneas, utilizando una distribución de codones equilibrada de los codones utilizados frecuentemente encontrados en los genes de plantas dicotiledóneas. Se diseñó una segunda secuencia de ADN que codifica esencialmente la secuencia de aminoácidos de la proteína DGT-28 para una expresión óptima en plantas monocotiledóneas, utilizando una distribución de codones equilibrada de codones utilizados frecuentemente encontrados en los genes de plantas monocotiledóneas. Las dos nuevas secuencias de ADN diferían de las secuencias de ADN originales que codifican *dgt-28* por la sustitución de codones de la planta (primero preferido, segundo preferido, tercero preferido o cuarto preferido) para especificar el aminoácido apropiado en cada posición dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína.

El diseño de las secuencias de ADN optimizadas para la planta se inició mediante la traducción inversa de las secuencias de proteínas de la secuencia de proteína DGT-28 (número de registro de Genbank: ZP_06917240.1). La SEC ID NO: 1 fue traducida inversamente utilizando una tabla de sesgos de codones de dicotiledóneas, construida a partir de la **Tabla 1**; Columnas E y J. Se completó una segunda traducción inversa de la SEC ID NO: 1 utilizando una tabla de sesgos de codones de monocotiledóneas construida a partir de la **Tabla 1**; Columnas D e I.

Las secuencias de traducción inversa inicial se modificaron después compensando los cambios del codón (reteniendo al mismo tiempo la representación del codón del promedio ponderado general) para eliminar o agregar sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, eliminar estructuras secundarias intracatenarias altamente estables y eliminar otras secuencias que podrían ser perjudiciales para manipulaciones de clonación o expresión del gen manipulado en plantas. La secuencia de ADN se analizó de nuevo para determinar los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción que podrían haber sido creados por las modificaciones. Los sitios identificados se modificaron más reemplazando los codones relevantes con los codones preferidos de primera, segunda, tercera o cuarta opción. Otros sitios en las secuencias que podrían afectar a la transcripción o a la traducción del gen de interés incluyen las uniones exón:intrón (5' o 3'), señales de adición de poliA y señales de terminación de ARN polimerasa. Las secuencias modificadas se analizaron y modificaron aún más para reducir la frecuencia de los dobletes TA o CG, y para aumentar la frecuencia de los dobletes TG o CT. Además de estos dobletes, los bloques de secuencia que tienen más de aproximadamente seis restos consecutivos de [G + C] o [A + T] pueden afectar a la transcripción o la traducción de la secuencia. Por tanto, estos bloques de secuencias también se modificaron reemplazando los codones de primera o segunda opción, etc., con otros codones de elección preferidos. Los codones utilizados raras veces no se incluyeron en un grado sustancial en el diseño del gen, siendo utilizados solamente cuando fue necesario para acomodar un criterio de diseño diferente al de la composición del codón, *per se* (por ejemplo, la adición o el borrado de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción).

La secuencia de polinucleótidos *dgt-28 v5* optimizada para plantas dicotiledóneas de nuevo diseño está listada en la SEC ID NO: 2. La secuencia de polinucleótidos *dgt-28 v6* optimizada para plantas monocotiledóneas de nuevo diseño está listada en la SEC ID NO: 3; esta secuencia se modificó ligeramente incluyendo una alanina en la segunda posición del aminoácido para introducir un sitio de enzima de restricción. Las secuencias de ADN resultantes tienen un mayor grado de diversidad de codones, una composición de bases deseable, contiene sitios de reconocimiento de enzimas de restricción puestos estratégicamente y carece de secuencias que podrían interferir con la transcripción del gen o la traducción del ARNm producto.

La síntesis de fragmentos de ADN que comprenden SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 que contienen secuencias

adicionales, tales como paradas de 6 marcos (los codones de parada ubicados en los seis marcos de lectura que se añaden al extremo 3' de la secuencia de codificación), y un sitio de restricción 5' para la clonación se realizó por proveedores comerciales (DNA2.0, Menlo Park, CA). La molécula de ácido nucleico sintético se clonó entonces en vectores de expresión y se transformó en plantas o bacterias como se describe en los ejemplos que siguen.

- 5 Se usaron estrategias de optimización de codones similares para diseñar *dgt-1*, *dgt-3 v2* (G173A), *dgt-3 v3* (G173A; P178S), *dgt-3 v4* (T174I; P178S), *dgt-7 v4* (T168I; P172S), *dgt-32 v3*, *dgt-33 v3* y *dgt-33 v3*. La versión de codón optimizado de estos genes se enumeran como SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 144, respectivamente.

- 10 Optimización bacteriana. Se diseñó una nueva secuencia de ADN que codifica la proteína DGT-28 de la SEC ID NO: 1 que está optimizada para la expresión en células de *Escherichia coli*. El diseño de la secuencia de ADN optimizada para *E. coli* se inició mediante la traducción inversa de la secuencia de proteína de la SEC ID NO: 1, utilizando un protocolo de optimización de codones registrado de GeneArt (Regensburg, Alemania). La secuencia inicial se modificó mediante la compensación de los cambios de codón (al tiempo que se retuvo la representación del promedio ponderado global) para eliminar o añadir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, y eliminar estructuras secundarias intracatenarias altamente estables y otras secuencias que podrían ser perjudiciales para las clonaciones o la expresión del gen modificado por ingeniería genética. Un ejemplo de tal secuencia perjudicial a evitar dentro de una región codificadora es una secuencia de unión a ARN ribosomal 16S ("secuencia Shine-Dalgarno") tal como AGGAGG, que podría codificar, por ejemplo, dos aminoácidos arginina consecutivos, pero que también podría servir como señal de iniciación de la traducción intragénica (y por lo tanto indeseable). La secuencia de ADN *dgt-28* sesgada por *E. coli* (*dgt-28 v1*) que codifica la proteína de SEQ ID NO: 1 se da como SEQ ID NO: 4.

- 20 Para facilitar la clonación y asegurar el inicio eficiente de la traducción, se puso una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción *NdeI* 5' terminal aguas arriba del codón de inicio de la traducción ATG. También para facilitar la clonación, y para asegurar una terminación de la traducción adecuada, se incluyeron bases que codifican dos codones de parada de la traducción de TAA y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *XhoI* en el extremo 3' de la región de codificación. La síntesis de un fragmento de ADN que comprende la SEC ID NO: 4 fue realizada por el proveedor comercial GeneArt™.

- 30 Se usaron estrategias similares de optimización de codones de *E. coli* para diseñar *dgt-1 v5*, *dgt-1 v6* (G112A), *dgt-1 v7* (G112A; P117S), *dgt-1 v8* (T113I; P117S), *dgt-3 v6* (G105A), *dgt-3 v7* (G105A; P112S), *dgt-3 v8* (T106I; P112S), *dgt-7 v5*, *dgt-7 v6* (G113A), *dgt-7 v7* (G113A; P117S), *dgt-7 v8* (T114I; P117S), *dgt-32 v5* y *dgt-33 v5*. Las versiones de secuencia *dgt-1*, *dgt-3* y *dgt-7* se modificaron mediante la eliminación de la secuencia de direccionamiento del cloroplasto. La versión de codones optimizados de *E. coli* de estos genes se enumeran como SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23 y SEC ID NO: 24, respectivamente.

Ejemplo 3: Vectores para la expresión bacteriana de genes de la tolerancia al glifosato.

- 35 Construcción del vector de expresión pET, *dgt-28* para la expresión en *E. coli*. Para pruebas *in vitro*, la secuencia de genes optimizada de *E. coli* *dgt-28 v1* (SEC ID NO: 4) fue sintetizada y clonada por GeneArt™ para la síntesis y la clonación. La secuencia del gen *dgt-28 v1* sintetizada se clonó en el vector de expresión pET28 a través de los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* añadidos. La construcción resultante introdujo una etiqueta 6X His N-terminal y se marcó como pDAB100445. FIG. 14.

- 40 Mutagénesis dirigida al sitio de *dgt-28 v1*. La mutagénesis dirigida al sitio se llevó a cabo en *dgt-28 v1* para establecer el papel de la alanina en la posición 84 para proporcionar tolerancia al glifosato. Esta alanina natural se mutó a glicina para determinar si el cambio reduciría la tolerancia de la enzima al glifosato o afinidad por PEP. Se seleccionó este resto de aminoácido, ya que corresponde con la mutación G96A que se introdujo en la EPSP sintasa de *E. coli* como se describió anteriormente.

- 45 Se utilizó el *kit* Quick Change II™ de Stratagene™ (Santa Clara, CA) para realizar la mutagénesis. Las reacciones de PCR se establecieron de acuerdo con el protocolo QuickChange™ utilizando pDAB100445 (*dgt-28 v1*) como ADN de plantilla. El constructo que contiene la secuencia del gen *dgt-28 v2* mutado se designó pDAB102946 (FIG. 15) y se confirmó mediante secuenciación del ADN. Los siguientes cebadores fueron diseñados para hacer el cambio de aminoácido:

DGT28	MutF	(SEQ	ID	NO:25;	5'
gATgTTTATTgCCgTgATggTggAACCACCgCACgTTTTTC)					
DGT28	MutR	(SEQ	ID	NO:26;	5'
gAAAACgTgCggTggTTCCACCATCACggCAATAAACATC)					

50

Se llevó a cabo una segunda ronda de mutagénesis en *dgt-28 v2* en un intento de disminuir más su tolerancia al glifosato. Una segunda mutación, T172A, fue introducida en el *dgt-28 v2* ya mutagenizado. La mutación recíproca de alanina a treonina de EPSP sintasa en esta posición fue descrita previamente en Haghani et al., (2008), en donde resultó insensibilidad al glifosato. El resultado final fue la producción de un doble mutante A84G, T172A que fue

designado como *dgt-28 v3*. Las reacciones de PCR se establecieron de acuerdo con el protocolo QuickChange™ utilizando pDAB 102946 (*dgt-28 v2*) como ADN plantilla. El constructo que contiene la secuencia del gen *dgt-28 v3* mutado se designó pDAB 100469 (FIG. 16). Los cebadores que siguen fueron utilizados para producir la mutación T172A:

DGT28	Mut2F	(SEQ	ID	NO:27;	5'
gggTCCgCTggCACgTCAGggTCTgCgTATTCg)					
DGT28	Mut2R	(SEQ	ID	NO:28;	5'
CgAATACgCAGACCCTgACgTgCCAgCggACCCAgCAgC)					

5

Construcciones adicionales, vector de expresión pET para la expresión de *E. coli*.

Para pruebas *in vitro*, las secuencias génicas *dgt-1 v5*, *dgt-1 v6*, *dgt-1 v7*, *dgt-1 v8*, *dgt-3 v6*, *dgt-3 v7*, *dgt-3 v8*, *dgt-7 v5*, *dgt-7 v6*, *dgt-7 v7*, *dgt-7 v8*, *dgt-32 v5* y *dgt-33 v5* fueron sintetizadas y clonadas (GeneArt™). Los genes sintetizados se clonaron en el vector de expresión pET28. Los constructos resultantes se marcaron como pDAB102028 (FIG. 17) que contenía *dgt-1 v5*, pDAB 102029 (FIG. 18) que contenía *dgt-1 v6*, pDAB102032 (FIG. 19) que contenía *dgt-1 v7*, que contenía pDAB102034 (FIG. 20) *dgt-1 v8*, pDAB100429 (FIG. 21) que contenía *dgt-3 v6*, pDAB100442 (FIG. 22) que contenía *dgt-3 v7*, pDAB100430 (FIG. 23) que contenía *dgt-3 v8*, pDAB102036 (FIG. 24) que contenía *dgt-7 v5*, pDAB102038 (FIG. 25) que contenía *dgt-7 v6*, pDAB102040 (FIG. 26) que contenía *dgt-7 v7*, y pDAB 102042 (FIG. 27) que contenía *dgt-7 v8*.

10

15

Clonación de DGT-32, y DGT-33. Para pruebas *in vitro*, los genes de plantas optimizadas, *dgt-32 v3* y *dgt-33 v3*, se amplificaron a partir de los vectores binarios pDAB107532 (FIG. 11) y pDAB107534 (FIG. 12), respectivamente. Se utilizaron los siguientes conjuntos de cebadores:

pMALDGT32F (SEQ ID NO: 29; CATATGACCGTTATTGAAATTCGGG) y pMALDGT32R (SEQ ID NO: 30; GATATCCTATTATTAACGACCTTCCAG) para *dgt-32*, y pMALDGT33F (SEQ ID NO: 31; CATATGGGTGCAGTTACCGTTATTGA), pMALDGT33R (SEQ ID NO: 32; GATATCCTATTATTATGCCTGCGGAC) para *dgt-33*.

20

Las secuencias amplificadas se subclonaron luego en pMAL-c5X de modo que cada gen era una fusión en marco con la secuencia de codificación de *malE*. Los constructos de expresión finales fueron pDAB107713 (FIG. 29) que contenía *dgt-32 v3*, y pDAB107714 (FIG. 30) que contenía *dgt-33 v3*.

Ejemplo 4: Ensayo cinético enzimático bioquímico *in vitro*.

25

Sobreexpresión y purificación de enzimas DGT recombinantes. Las proteínas DGT recombinantes fueron sobreexpresadas en células Rosetta2™ (DE3) (Novagen™, Madison, WI) de los constructos descritos anteriormente. Se usó una única colonia para inocular 50 mL de cultivos iniciadores de LB que contenían cloranfenicol (25 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL) que se cultivaron durante la noche a 37 °C. Los cultivos durante la noche se usaron para inocular 1 L de LB que contenía cloranfenicol (25 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL). Los cultivos se desarrollaron a 37 °C hasta una OD₆₀₀ = 0,6 y se pusieron en un baño de agua con hielo durante 10 minutos. La expresión de las proteínas diana se logró mediante la adición de IPTG a una concentración final de 500 µM.

30

Se dejó avanzar la inducción durante la noche a 20 °C, seguido de recolección mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 20 minutos. Los sedimentos celulares se almacenaron a -80 °C hasta que se requirieron para la purificación. Todas las etapas de purificación se llevaron a cabo a 4 °C. Los sedimentos celulares de los cultivos de 1 L se resuspendieron en 20-30 mL de tampón A (HEPES 50 mM, pH 7,5, KCl 150 mM, DTT 2 mM, EDTA 1 mM, imidazol 20 mM y glicerol al 5%). Luego se añadieron el cóctel inhibidor de la proteasa COMPLETE™ (1 comprimido/50 mL, Roche, Indianapolis, IN) y lisozima (1 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y la suspensión se agitó durante 20 minutos. La lisis celular se realizó usando un Branson™ Sonifier™ 250 (3 ráfagas x 60 segundos) seguido de la eliminación de los residuos celulares mediante centrifugación a 16.000 rpm durante 45 minutos.

35

Las enzimas DGT se purificaron a homogeneidad en una etapa mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) utilizando una columna de HisTrap FF en bruto de 5 mL. La columna se equilibró en tampón A y la muestra se cargó en el mismo tampón. La columna se lavó después con 10 volúmenes de columna de tampón A seguido de elución en un tampón B al 0-100% (HEPES 50 mM, pH 7,5, KCl 200 mM, DTT 2 mM, EDTA 1 mM, imidazol 500 mM y glicerol al 5%) de gradiente lineal sobre 25 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían proteína diana, según se determinó mediante análisis SDS-PAGE, se concentraron a 2,5 mL utilizando un dispositivo de ultracentrifugación Millipore equipado con un corte de 10 kDa de peso molecular (MWCO). Las enzimas DGT purificadas se intercambiaron en el tampón utilizando columnas PD-10 (GE Healthcare) en HEPES 50 mM, pH 7,5, KCl 150 mM, DTT 2 mM y glicerol al 5% y luego se concentraron ~ 1 mL. Las muestras se diluyeron típicamente a 1:50 y el espectro UV visible se registró de 240 a 700 nm en un espectrofotómetro Cary50™ Bio UV-visible. Luego se utilizó un coeficiente de extinción teórico para calcular la concentración de proteína basándose en la absorbancia a 280 nm (ExpASy, Ginebra, Suiza).

45

50

Expresión y purificación de fusiones DGT-32 y DGT-33 recombinantes. Las enzimas DGT-32 y DGT-33 se construyeron para contener una etiqueta de fusión de maltosa ubicada en el extremo amino de la enzima. Se aislaron

y confirmaron células de *Escherichia coli* transformadas con pDAB107712 (Fig. 28), pDAB107713 y pDAB107714. Se usó una única colonia de cada cepa bacteriana para inocular 50 mL de medio LB que contenía 100 µg/µL de carbenicilina y 25 µg/µL de cloranfenicol. El cultivo iniciador se hizo crecer durante la noche a 37 °C y posteriormente se usó para inocular 600 mL de medio LB suplementado con glucosa al 0,2%, 100 µg/µL de carbenicilina y 25 µg/µL de cloranfenicol. Los cultivos se hicieron crecer a 37 °C hasta una OD₆₀₀ = 0,4, momento en el que se añadió IPTG a una concentración final de 50 µM de IPTG. Los cultivos se indujeron durante 15 horas a 18 °C. Al día siguiente, los cultivos se recogieron por centrifugación a 8.000 rpm durante 20 minutos para sedimentar las células. La pasta celular se almacenó a -80 °C hasta que se requirió para la purificación.

Los sedimentos congelados se resuspendieron en 20-30 mL de tampón A (HEPES 50 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 5% y DTT 1 mM) y 1 tableta de inhibidor de proteasa (Roche Complete). Una vez que el sedimento estuvo completamente resolubilizado, se añadió 1 mg/mL de lisozima y la muestra se mezcló a 4 °C durante 15-20 minutos. Después de la incubación con la lisozima, la muestra se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 mL y se puso en hielo. La muestra se trató luego con ultrasonidos a intervalos de 1 minuto, seguido de 4 minutos de enfriamiento. Esta etapa se repitió dos veces más para un total de tres ciclos de sonicación. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 16.500 rpm durante 45 minutos y el sobrenadante se cargó en un bucle de inyección de 50 mL. El lisado crudo se aplicó a una columna de amilosa, se lavó con 7 volúmenes de columna con tampón A, y se eluyó en tampón B al 100% (tampón A y maltosa 10 mM). La proteína diana se agrupó y se concentró hasta 2,5 mL utilizando un Centricon MWCO de 30 kDa. La proteína purificada se intercambió con tampón a HEPES 50 mM, pH 7,5, KCl 100 mM y glicerol al 5% utilizando una columna de filtración en gel PD-10. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el ensayo de Bradford utilizando BSA como estándar. La proteína pura se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Caracterización cinética *in vitro* de enzimas DGT vegetales y bacterianas. Las actividades enzimáticas de DGT de tipo silvestre (WT) y mutantes se midieron por la producción de fosfato inorgánico (P_i) en un procedimiento modificado descrito por Lanzetta et al. (1979) Anal. Biochem 100: 95-7. Los ensayos se realizaron en formato de placa de 96 pocillos en un total de 50 mL en un lector de placas Spectra-Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los ensayos típicos contenían HEPES 50 mM, pH 7,5, KCl 150 mM, DTT 2 mM y S3P 1 mM. Las concentraciones de PEP y glifosato se variaron según se indica. El glifosato se obtuvo de Sigma como el ácido libre y se resuspendió en ddH₂O. El glifosato se solubilizó mediante la adición de KOH hasta que la mezcla estuvo a un pH neutro. Los ensayos se iniciaron mediante la adición de la enzima DGT a concentraciones que variaron entre 0,01 - 1 µM. Las reacciones se terminaron mediante la adición de 235 µL de una mezcla 3:1 de verde de malaquita: solución de molibdato amónico. Después del desarrollo completo del color (~ 1 minuto), se registró el cambio de absorbancia a 660 nm y se calculó la cantidad de P_i formado a partir de una curva estándar. Se usaron reacciones de control que carecen de enzima para corregir la absorbancia de fondo. Las altas concentraciones de PEP (> 2 mM) y glifosato (> 30 mM) contribuyen con una cantidad significativa de absorbancia de fondo usando este método de detección. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, lo que permitió la determinación de K_m y V_{max} (Ecuación 3), mientras que la IC₅₀ se determinó a partir de la Ecuación 4, donde *y* es la actividad relativa y *s* es el coeficiente de Hill. Los datos se analizaron utilizando el software GraFit™ versión 5 (Erithacus Software Limited, Horley, Reino Unido).

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s} \quad (4)$$

El valor de IC₅₀ para un inhibidor competitivo cambiará dependiendo de la concentración de sustrato, y por consiguiente los valores de IC₅₀ de la **Tabla 2** se obtuvieron en PEP 1 mM y en PEP 60 µM (una estimación de las concentraciones de PEP intracelular en plantas). Solo deben compararse los valores de IC₅₀ medidos a la misma concentración de PEP (las determinaciones de K_m para DGT-32 y DGT-33 se realizaron a 100 µM de PEP). Además, los valores de IC₅₀ de enzimas altamente tolerantes no pudieron determinarse con precisión por el método de Lanzetta y, por tanto, se estimaron en función de la actividad relativa.

Cinética de las DGTs de planta. Primero se probaron dos enzimas con secuencias nativas no mutadas, DGT-1 v5 y DGT-7 v5, para establecer parámetros de referencia para la sensibilidad al glifosato. Las dos proteínas mostraron valores bajos de K_m para PEP (~ 70 mM) y fueron sensibles al glifosato con valores de IC₅₀ de ~ 20 mM (**Tabla 2**) a PEP 1 mM. Como se observa para DGT-1 v6, DGT-3 v6, y DGT-7 v6, una única mutación de punto de G a A mejoró significativamente la tolerancia al glifosato (valores de IC₅₀ de 8-21 mM), pero también aumentó la K_m para PEP a ~ 8 veces. La doble mutación (GAPS), para todas las DGT derivadas de plantas (DGT-1 v7, DGT-3 v7 y DGT-7 v7), también mejoró la tolerancia al glifosato, pero una vez más tuvo como resultado una elevación considerable en K_m de PEP. **Tabla 2**. Los mutantes TIPS (DGT-1 v8, DGT-3 v8 y DGT-7 v8) fueron tolerantes a concentraciones modestas de glifosato (3-6 mM) pero, a diferencia de los mutantes GA y GAPS, los niveles de K_m se mantuvieron próximos a los de las proteínas de tipo silvestre entre 60-200 µM. La FIG. 31 demuestra los cambios en la tolerancia al glifosato para DGT-1 (A) y DGT-7 (B) tras la introducción de las mutaciones especificadas. La concentración de PEP se mantuvo a

1 mM para los experimentos que dieron como resultado los datos mostrados en la FIG. 31, lo que probablemente condujo a la elevada IC_{50} (> 80 mM) para DGT-7 v8. Se llevaron a cabo otros procedimientos para determinar si los niveles más bajos de PEP alteraban la tolerancia al glifosato relativa. Los niveles fisiológicamente relevantes de PEP varían de 5 a 60 μ M. Con PEP 60 μ M, el valor de IC_{50} disminuyó significativamente (3,6 mM), sugiriendo que la determinación inicial estuvo influenciada por el exceso de PEP, como era de esperar de la cinética de Michaelis-Menten, y se anotó en la **Tabla 2**.

La FIG. 31 muestra los valores de IC_{50} obtenidos después de la introducción de varias mutaciones dentro de DGT-1 (A) y DGT-7 (B) utilizando PEP 1 mM. Tanto para A como para B, los triángulos cerrados de las curvas IC_{50} representan tipo salvaje, los círculos cerrados representan mutantes GA, los cuadrados abiertos representan mutantes GAPS y los cuadrados cerrados representan mutantes TIPS.

Tabla 2. Parámetros cinéticos en estado estacionario para enzimas DGT. Los valores de IC_{50} mayores que 50 son estimaciones debido a las limitaciones del método empleado. El valor de IC_{50} para el glifosato se determinó a PEP 100 μ M.

IC ₅₀ (mM glifosato)							
		Proteína	Versión de secuencia	IC ₅₀ a PEP 1 mM	IC ₅₀ a PEP 60 μM	K _m PEP (μM)	K _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Enzimas vegetales	Soja	DGT-1 v5	Nativa	0,0	0,0	73,0	7,41 E+04
		DGT-1 v6	GA	21,1	17,3	608,2	1,34 E+04
		DGT-1 v7	GA PS	> 80,0	> 80,0	1.291,2	6,67 E+03
		DGT-1 v8	TIPS	13,3	5,9	151,4	1,23 E+04
	Canola	DGT-1 v6	GA	15,8	8,7	1.073,4	1,39 E+04
		DGT-1 v7	GA PS	> 50,0	42,0	2.728,3	2,28 E+03
		DGT-1 v8	TIPS	13,3	4,8	196,8	3,29 E+04
	Trigo	DGT-1 v5	Nativa	0,0	0,0	75,6	2,15 E+05
		DGT-1 v6	GA	8,1	15,1	538,2	1,61 E+04
		DGT-1 v7	GA PS	19,7	15,4	1.103,2	1,46 E+04
		DGT-1 v8	TIPS	> 80,0	3,6	60,5	1,36 E+04
Enzimas bacterianas	DGT-28 v1	Nativa	> 80,0	> 80,0	91,6	1,32 E+05	
	DGT-28 v2	AG	> 50,0	2,2	161,5	6,86 E+04	
	DGT-28 v3	AGTA	> 50,0	5,2	27,3	6,01 E+02	
	DGT-32	Nativa	–	> 50,0 *	139,8	1,30 E+03	
	DGT-33	Nativa	–	> 50,0 *	114,2	2,40 E+03	

Cinética de las DGTs bacterianas. De las enzimas bacterianas, DGT-28 v1 posee los parámetros cinéticos globales más favorables (valores elevados de IC_{50} y k_{cat}/K_m). La enzima fue tolerante al glifosato en concentraciones > 80 mM y mostró una eficiencia catalítica de $1,32 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$. La mutación A $\rightarrow$ G en DGT-28 v2 redujo la IC_{50} a 2,17 mM (a PEP 60 μ M) y provocó una ligera elevación en la K_m para PEP (161 μ M). Esta enzima mutante conserva la alta eficacia catalítica observada en DGT-28 v1. Incluso con una IC_{50} reducida, esta enzima mutada es adecuada para proporcionar tolerancia al glifosato *in planta* en ciertas aplicaciones. Los datos sugieren que en esta nueva clase de EPSP sintasa, la alanina no es el único determinante de la tolerancia al glifosato. Para explorar otros posibles determinantes, se construyó una variante adicional, DGT-28 v3 (mutante doble A84G T172A). Esta enzima mostró una tolerancia reducida al glifosato con un valor de IC_{50} de 5,15 mM (a PEP 60 μ M). La disminución en la IC_{50} para DGT-28 v3 estuvo acompañada por una disminución de 200 veces en la eficacia catalítica, lo que sugiere que la segunda mutación condujo a efectos inesperados (**Tabla 2**). Los homólogos de mayor identidad DGT-28 v1 (~75% de identidad de aminoácidos), DGT-32 y DGT-33 tenían valores de K_m bajos para PEP (~114 - 139 mM), y sin embargo las eficacias catalíticas fueron 100 veces más bajas que las de DGT-28 v1. Esta caída en la eficacia catalítica se deriva probablemente de la fusión de la proteína de unión a la maltosa (MBP). Las enzimas son también insensibles al glifosato que presenta valores de IC_{50} mayores que 50 mM. Como resultado de estos ensayos *in vitro* que indicaron que las diversas enzimas DGT proporcionaban tolerancia al glifosato, las enzimas DGT se probaron en planta.

Ejemplo 5: Clonación de vectores de transformación de plantas.

Construcción de vectores binarios vegetales. Se usaron métodos de clonación estándar en la construcción de vectores

de entrada que contienen una secuencia de polinucleótidos peptídicos de tránsito al cloroplasto unida a *dgt-28* como una fusión en marco. Los vectores de entrada que contenían un péptido de tránsito (TraP) fusionado con *dgt-28* se ensamblaron utilizando la tecnología Advantage IN-FUSION™ (Clontech, Mountain View, CA). Como resultado de la fusión, el primer aminoácido, la metionina, se eliminó de *dgt-28*. Péptidos de tránsito TraP4 v2 (SEC ID NO: 33), TraP5 v2 (SEC ID NO: 34), TraP8 v2 (SEC ID NO: 35), TraP9 v2 (SEC ID NO: 36), TraP12 v2 (SEC ID NO: 37), y TraP13 v2 (SEC ID NO: 38) fueron sintetizados cada uno por DNA2.0 (Menlo Park, CA) y fusionados al fragmento del extremo 5' de *dgt-28*, hasta un sitio único, e incluyéndolo, de reconocimiento de endonucleasas de restricción Accl.

Los plásmidos binarios que contenían las diversas casetes de expresión de TraP y *dgt-28* fueron dirigidos por el promotor de ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana* (AtUbi10 v2; Callis, et al., (1990) J. Biol. Chem., 265: 12486 - 12493) y flanqueado por la región no traducida 3' del marco de lectura abierto veintitrés de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3' UTR v1; patente de Estados Unidos nº 5.428.147).

Las casetes de expresión TraP y *dgt-28* ensambladas se diseñaron utilizando la tecnología GATEWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformaron en plantas a través de la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de New England Biolabs (NEB; Ipswich, MA) y se utilizó ADN Ligase T4 (Invitrogen) para la ligación del ADN. Las reacciones de la puerta de enlace (*Gateway*) se realizaron utilizando la mezcla de enzimas GATEWAY® LR CLONASE® (Invitrogen) para ensamblar un vector de entrada en un único vector de destino que contenía el casete marcador seleccionable promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca (CsVMV v2; Verdaguer et al., (1996) Plant Mol Biol., 31: 1129 - 1139) - *DSM-2* (solicitud de patente de EE. UU. nº 2007/086813) - *Agrobacterium tumefaciens* marco de lectura abierta una región no traducida 3' (AtuORF1 3' UTR v6; Huang et al., (1990) J. Bacteriol. 172: 1814 - 1822). Las preparaciones de plásmidos se realizaron utilizando el *kit* de plásmidos NUCLEOSPIN® (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA) o el *kit* de Plasmid Midi (Qiagen) siguiendo las instrucciones de los proveedores. Los fragmentos de ADN se aislaron utilizando el *kit* de extracción de gel QIAquick™ (Qiagen) después de la electroforesis en gel de agarosa en Tris-acetato.

Las colonias de todos los plásmidos ensamblados se cribaron inicialmente mediante digestión de restricción de ADN miniprep. El ADN plasmídico de los clones seleccionados fue secuenciado por un proveedor de secuenciación comercial (Eurofins™ MWG Operon, Huntsville, AL). Los datos de secuencia se ensamblaron y analizaron utilizando el software SEQUENCHER™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

Los constructos binarios que siguen expresan las diversas secuencias del gen de fusión TraP: *dgt-28*: pDAB107527 (FIG. 3) contiene TraP4 v2:*dgt-28* v5 (SEQ ID NO: 79); pDAB105530 (FIG. 4) contiene TraP5 v2:*dgt-28* v5 (SEC ID NO: 80); pDAB105531 (FIG. 5) contiene TraP8 v2: *dgt-28* v5 (SEC ID NO: 81); PDAB105532 (FIG. 6) contiene TraP9 v2: *dgt-28* v5 (SEC ID NO: 82); pDAB105533 (FIG. 7) contiene TraP12 v2: *dgt-28* v5 (SEC ID NO: 83); y pDAB105534 (FIG. 8) contiene TraP13 v2: *dgt-28* v5 (SEC ID NO: 84). La secuencia *dgt-28* v5 de pDAB105534 se modificó donde el primer codón (GCA) se cambió a (GCT).

Construcción de vectores binarios vegetales adicionales. Se utilizaron estrategias de clonación similares a las descritas anteriormente para construir plásmidos binarios que contienen *dgt-31*, *dgt-32*, *dgt-33*, *dgt-1*, *dgt-3* y *dgt-7*.

Los genes derivados microbiológicamente *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33* se fusionaron con péptidos de tránsito al cloroplasto diferentes a los descritos con anterioridad. Se utilizaron los siguientes péptidos de tránsito al cloroplasto: TraP14 v2 (SEC ID NO: 39), TraP23 v2 (SEC ID NO: 40), TraP24 v2 (SEC ID NO: 41). pDAB107532 (FIG. 11) contiene *dgt-32* v3 fusionado a TraP14 v2 (SEC ID NO: 42), pDAB107534 (FIG. 12) contiene *dgt-33* v3 fusionado a TraP24 v2 (SEC ID NO: 43), y pDAB107533 (FIG. 54) contiene *dgt-33* v1 fusionado a TraP23 v2 (SEC ID NO: 143). Las casetes de expresión *dgt* fueron controladas por el promotor de ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana* (promotor AtUbi10 v2) y flanqueadas por la región no traducida 3' veintitrés del marco de lectura abierto de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3' UTR v1). Una casete marcadora seleccionable *DSM-2* que contiene el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca (CsVMV v2) - *DSM-2* - región no traducida 3' del marco de lectura abierto uno de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3' UTR v6) estaba también presente en el vector binario.

Se construyen binarios adicionales en los que *dgt-31* v3, *dgt-32* v3 y *dgt-33* v3 se fusionan con las secuencias de péptidos de tránsito al cloroplasto descritas anteriormente. Por ejemplo, la secuencia TraP8 v2 se fusiona con *dgt-31* v3, *dgt-32* v3 y *dgt-33* v3, y se clona en vectores binarios como se describió anteriormente.

Se construyeron vectores binarios que contenían los genes de Clase I (*dgt-1*, *dgt-3* y *dgt-7*). Los siguientes vectores binarios se construyeron y se transformaron en plantas: pDAB4104 (FIG. 9), que contiene la secuencia *dgt-1* v4 como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. nº 2011/0124503, que está flanqueada por las secuencias Osmotin de *Nicotiana tabacum* como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2009/0064376; pDAB102715 (FIG. 10); pDAB102716 (FIG. 45); pDAB102717 (FIG. 46); y pDAB 102785 (FIG. 13). Los diversos péptidos de tránsito al cloroplasto TraP que se fusionaron con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33* no se agregaron a los genes de Clase I, ya que estas secuencias derivadas de plantas poseen péptidos de tránsito al cloroplasto de plantas nativas. Estos vectores se describen con más detalle en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Descripción de los vectores binarios que contienen un gen de EPS sintasa de Clase I (es decir, *dgt-1*, *dgt-3* o *dgt-7*).

Nombre	Descripción	Mutación EPSPS
pDAB4104	RB7 MAR v2 :: CsVMV promotor v2 / NtOsm 5'UTR v2 / <i>dgt-1</i> v4 /NtOsm 3' UTR v2 / AtuORF24 3' UTR v2 :: promotor AtUbi10 v4 /pat v3 / AtuORF1 3' UTR v3 vector binario	TIPS
pDAB102715	Promotor AtUbi10 v2/ <i>dgt-3</i> v2/AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV promotor v2/ pat v9 / AtuORF1 3'UTR v6 vector binario	GA
pDAB102716	Promotor AtUbi10 v2/ <i>dgt-3</i> v3 / AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV/promotor v2/ pat v9 / AtuORF1 3'UTR v6 vector binario	GA PS
pDAB102717	Promotor AtUbi10 v2/ <i>dgt-3</i> v4 /AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV promotor v2/ pat v9 / AtuORF1 3'UTR v6 vector binario	TI PS
pDAB102785	Promotor AtUbi10 v2 / <i>dgt-7</i> v4 / AtuORF23 3'UTR :: CsVMV promotor v2/ DSM-2 v2 /AtuORF1 3'UTR v6 vector binario	TI PS

Ejemplo 6: Transformación en *Arabidopsis* y Selección.

- 5 Transformación de *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* fue transformada utilizando el método de inmersión floral de Clough and Bent (1998). Se usó una colonia seleccionada de *Agrobacterium* que contenía uno de los plásmidos binarios descritos anteriormente para inocular uno o más precultivos de 100 mL de caldo YEP que contiene espectinomicina (100 mg/L) y kanamicina (50 mg/L). El cultivo se incubó durante la noche a 28 °C con agitación constante a 225 rpm. Las células se sedimentaron a aproximadamente 5000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y el sobrenadante resultante fue desechado. El sedimento celular se resuspendió suavemente en 400 mL de medio de remojo que contenía 5% (p/v) de sacarosa, 10 µg/L de 6-bencilaminopurina y 0,04% de Silwet™ L-77. Las plantas de aproximadamente 1 mes de edad se sumergieron en el medio durante 5-10 minutos con agitación suave. Las plantas se tumbaron sobre sus lados y se cubrieron con bolsas de plástico transparentes u opacas durante 2-3 horas, y luego se colocaron en posición vertical. Las plantas se cultivaron a 22 °C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Aproximadamente 4 semanas después de la inmersión, se cosecharon las semillas.

Selección de plantas transformadas. La semilla T1 recién cosechada (que contiene las casetes de expresión *dgt* y *DSM-2*) se dejó secar durante 7 días a temperatura ambiente. La semilla T1 se sembró en bandejas de germinación de 26,5 x 51 cm, recibiendo cada una de ellas una parte alícuota de 200 mg de semilla T1 estratificada (~ 10.000 semillas) que se habían suspendido previamente en 40 mL de solución de agarosa al 0,1%, y se almacenaron a 4 °C durante 2 días para completar los requisitos de latencia y asegurar la germinación sincronizada de las semillas.

Se cubrió Sunshine Mix LP5 con vermiculita fina y se sub-irrigó con una solución de Hoagland hasta humedecerla, y luego se deja drenar por gravedad. Cada alícuota de 40 mL de semilla estratificada se sembró uniformemente sobre la vermiculita con una pipeta, y se cubrió con domos de humedad durante 4-5 días. Los domos se retiraron 1 día antes de la selección transformante inicial utilizando un aerosol de post-emergencia con glufosinato (seleccionando el gen *DSM-2* co-transformado).

Siete días después de la plantación (DAP) y nuevamente 11 DAP, las plantas T1 (fase de cotiledón y 2-4 lf, respectivamente) se pulverizaron con una solución al 0,2% de herbicida Liberty (200 g ai/L de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) a un volumen de pulverización de 10 mL/bandeja (703 L/ha) utilizando una boquilla de pulverización de aire comprimido DeVilbiss para suministrar una tasa efectiva de 280 g ai/ha de glufosinato por aplicación. Las supervivientes (plantas en crecimiento activo) se identificaron 4-7 días después de la pulverización final y se trasplantaron individualmente en macetas de 3 pulgadas (75 mm) preparadas con medios de cultivo (Metro Mix 360). Las plantas trasplantadas se criaron en el invernadero (22 ± 5 °C, 50 ± 30% de HR, 14 h luz:10 h oscuridad, mínimo 500 µE/m²s⁻¹ luz natural + suplementaria). El análisis de confirmación molecular se completó en las plantas T1 supervivientes para confirmar que el gen de tolerancia al glifosato se había integrado de manera estable en el genoma de las plantas.

Confirmación Molecular. Se confirmó la presencia de los transgenes *dgt-28* y *DSM-2* dentro del genoma de las plantas de *Arabidopsis* que se transformaron con pDAB107527, pDAB105530, pDAB105531, pDAB105532, pDAB105533 o pDAB105534. La presencia de estas secuencias de polinucleótidos se confirmó mediante ensayos de sonda de hidrólisis, PCR en casete de expresión génica (también descrita como unidad de transcripción de la planta PCR – PTU PCR), análisis de transferencia Southern y análisis de PCR de Transcripción Inversa Cuantitativa.

Las plantas de *Arabidopsis* T1 se cribaron inicialmente mediante un ensayo de sonda de hidrólisis, análogo a TAQMAN™, para confirmar la presencia de los transgenes *DSM-2* y *dgt-28*. Los eventos se seleccionaron mediante PCR de casete de expresión génica para determinar si la casete de expresión *dgt* se integró totalmente en los genomas

de la planta sin redistribución. Los datos generados a partir de estos estudios se utilizaron para determinar el número de copias del transgén e identificar eventos de *Arabidopsis* seleccionados para la autofertilización y el avance a la generación T2. Las plantas de *Arabidopsis* T2 avanzadas también se seleccionaron mediante ensayos de sonda de hidrólisis para confirmar la presencia y estimar el número de copias de los genes *DSM-2* y *dgt* dentro del cromosoma de la planta. Finalmente, se utilizó un ensayo de transferencia Southern para confirmar el número de copias estimado en un subconjunto de las plantas de *Arabidopsis* T1.

Se usaron ensayos similares para confirmar la presencia del transgén *dgt-1* de las plantas transformadas con pDAB4101, la presencia del transgén *dgt-32* de las plantas transformadas con pDAB107532, la presencia del transgén *dgt-33* de las plantas transformadas con pDAB107534, la presencia del transgén *dgt-3* de las plantas transformadas con pDAB102715, la presencia del transgén *dgt-3* de las plantas transformadas con pDAB102716, la presencia del transgén *dgt-3* de las plantas transformadas con pDAB102717 y la presencia del transgén *dgt-7* transgén de plantas transformadas con pDAB 102785.

Ensayo de sonda de hidrólisis. El número de copias se determinó en las plantas de *Arabidopsis* T1 y T2 utilizando el ensayo de sonda de hidrólisis que se describe a continuación. Se identificaron y avanzaron plantas con un número variable de transgenes para estudios posteriores de tolerancia al glifosato.

Las muestras de tejido se recogieron en placas de 96 pocillos y se liofilizaron durante 2 días. La maceración de tejidos se realizó con un pulverizador de tejidos KLECO™ y perlas de tungsteno (Environ Metal INC., Sweet Home, Oregon). Después de la maceración del tejido, el ADN genómico se aisló en un formato de alta producción utilizando el *kit* Biosprint™ 96 Plant (Qiagen™, Germantown, MD) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. El ADN genómico se cuantificó mediante el QUANT-IT™ PICO GREEN DNA ASSAY KIT (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADN genómico cuantificado se ajustó a aproximadamente 2 ng/mL para el ensayo de la sonda de hidrólisis utilizando un manipulador automático de líquidos BIOROBOT3000™ (Qiagen, Germantown, MD). La determinación del número de copias transgénicas mediante el ensayo de sonda de hidrólisis se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando el sistema LIGHTCYCLER®480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Los ensayos se diseñaron para *DSM-2*, *dgt-28* y el gen de referencia interno, *TAFII15* (Genbank ID: NC 003075; Duarte et al., (201) BMC Evol. Biol., 10:61).

Para la amplificación, se preparó la mezcla LIGHTCYCLER®480 Probes Master (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) a una concentración final IX en una reacción multiplex de 10 µL de volumen que contiene 0,1 µM de cada cebador para *DSM-2* y *dgt-28*, 0,4 µM de cada cebador para *TAFII15* y 0,2 µM de cada sonda. **Tabla 4.** Se realizó una reacción de amplificación en dos etapas con una extensión a 60 °C durante 40 segundos con adquisición de fluorescencia. Todas las muestras se analizaron y los valores de umbral de ciclo (Ct) promediados se utilizaron para el análisis de cada muestra. El análisis de los datos de PCR en tiempo real se realizó utilizando el software LightCycler™ versión 1.5 utilizando el módulo de cantidad relativa y se basa en el método $\Delta\Delta C_t$. Para esto, se incluyeron una muestra de ADN genómico de un calibrador de copia única y una verificación de 2 copias conocidas en cada análisis. Los resultados del número de copias del cribado de la sonda de hidrólisis se determinaron para las plantas de *Arabidopsis* transgénicas T1 y T2.

Tabla 4. Información de cebadores y sondas para el ensayo de sonda de hidrólisis de *DSM-2*, *dgt-28* y gen de referencia interno (*TAFII15*).

Nombre del cebador	Secuencia
DSM2A (SEC ID N°: 44)	5' AGCCACATCCCAGTAACGA 3'
DSM2S (SEC ID NO: 45)	5' CCTCCCTCTTTTTGACGCC 3'
Sonda DSM2 Cy5 (SEC ID NO: 46)	5' CAGCCCAATGAGGCATCAGC 3'
DGT28F (SEC ID NO: 47)	5' CTTCAAGGAGATTTGGGATTTGT 3'
DGT28R (SEC ID NO: 48)	5' GAGGGTCGGCATCGTAT 3'
Sonda UPL154	Cat n° 04694406001 (Roche, Indianapolis, IN)
Sonda TAFFY-HEX (ID SEC NO: 49)	5' AGAGAAGTTTCGACGGATTTTCGGGC 3'
TAFII15-F (SEC ID N°: 50)	5' GAGGATTAGGGTTTCAACGGAG 3'
TAFII15-R (SEC ID N°: 51)	5' GAGAATTGAGCTGAGACGAGG 3'

Confirmación de integración de *dgt-28* a través del análisis de Transferencia Southern. Se usó el análisis de transferencia Southern para establecer el patrón de integración del fragmento de ADN de la cadena T insertado e

identificar los eventos que contenían el *dgt-28*. Se generaron datos para demostrar la integración y la integridad de los insertos transgénicos dentro del genoma de *Arabidopsis*. Los datos de transferencia Southern se utilizan para identificar la integración simple de una copia intacta del ADN de la cadena T. Se realizó un análisis detallado de transferencia Southern usando una sonda amplificada por PCR específica para la casete de expresión del gen *dgt-28*. La hibridación de la sonda con el ADN genómico que se había digerido con las enzimas de restricción específicas identificó fragmentos del ADN genómico de pesos moleculares específicos, cuyos patrones se usaron para identificar eventos transgénicos T1 de inserción simple y longitud completa para el avance a la siguiente generación.

Las muestras de tejido se reconocieron en tubos cónicos de 2 mL (Eppendorf™) y se liofilizaron durante 2 días. La maceración de tejidos se realizó con un pulverizador de tejidos KLECKO™ y perlas de tungsteno. Después de la maceración del tejido, se aisló el ADN genómico en un procedimiento de aislamiento CTAB. El ADN genómico se purificó adicionalmente utilizando el *kit* de puntas genómicas Qiagen™. El ADN genómico se cuantificó mediante el *kit* de ensayo de ADN Pico Green de Quant-IT™ (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADN genómico cuantificado se ajustó a 4 µg para una concentración consistente.

Para cada muestra, se digirieron minuciosamente 4 µg de ADN genómico con la enzima de restricción *SwaI* (New England Biolabs, Beverly, MA) y se incubaron a 25 °C durante la noche, luego se añadió *NsiI* a la reacción y se incubó a 37 °C durante 6 horas. El ADN digerido se concentró mediante precipitación con Quick Precipitation Solution™ (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. El ADN genómico se resuspendió después en 25 mL de agua a 65 °C durante 1 hora. Las muestras resuspendidas se cargaron en un gel de agarosa al 0,8% preparado en IX TAE y se sometieron a electroforesis durante la noche a 1,1 V/cm en tampón IX TAE. El gel se sometió secuencialmente a desnaturalización (NaOH 0,2 M/NaCl 0,6 M) durante 30 minutos, y a neutralización (Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5)/NaCl 1,5 M) durante 30 minutos.

La transferencia de fragmentos de ADN a membranas de nailon se realizó mediante la absorción pasiva de 20 X solución de SSC durante la noche a través del gel sobre la membrana de transferencia tratada IMMOBILON™ NY + (Millipore, Billerica, MA) utilizando una mecha de papel para cromatografía y toallas de papel. Después de la transferencia, la membrana se lavó brevemente con 2 X SSC, se reticuló con STRATALINKER™ 1800 (Stratagene, LaJolla, CA) y se coció bajo vacío a 80 °C durante 3 horas.

Las transferencias se incubaron con una solución de prehibridación (Perfect Hyb plus, Sigma, St. Louis, MO) durante 1 hora a 65 °C en botellas de vidrio rodantes, con una incubadora de hibridación modelo 400 (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA). Las sondas se prepararon a partir de un fragmento de PCR que contiene la secuencia codificadora completa. El amplicón de PCR se purificó utilizando el *kit* de extracción de gel QIAEX™ II y se marcó con α³²P-dCTP a través del *kit* de etiquetado Random RT Prime IT™ (Stratagene, La Jolla, CA). Las transferencias se hibridaron durante la noche a 65 °C con la sonda desnaturalizada añadida directamente al tampón de hibridación a aproximadamente 2 millones de cuentas por transferencia por mL. Después de la hibridación, las transferencias se realizaron secuencialmente a 65 °C con 0,1 X SSC/0,1% SDS durante 40 minutos. Finalmente, las transferencias se expusieron a las pantallas de imágenes de fósforo de almacenamiento y se obtuvieron las imágenes utilizando un sistema de imágenes Molecular Dynamics Storm 860™.

Los análisis de transferencia Southern completados en este estudio se usaron para determinar el número de copias y confirmar que los eventos seleccionados contenían el transgén *dgt-28* dentro del genoma de *Arabidopsis*.

Confirmación de la casete de expresión génica *dgt-28* mediante análisis por PCR. La presencia de la casete de expresión del gen *dgt-28* contenido en los eventos de la planta T1 se detectó mediante una reacción de PCR de punto final. Se usaron cebadores (Tabla 5) específicos para el promotor AtUbi10 v2 y las regiones 3' UTR v1 AtuORF23 de la casete de expresión del gen *dgt-28* para la detección.

Tabla 5. Cebadores oligonucleotídicos usados para la confirmación de la casete de expresión del gen *dgt-28*.

Nombre del cebador	Secuencia
Oligo directo (SEC ID NO: 52)	5' CTGCAGGTCAACGGATCAGGATAT 3'
Oligo Inverso (SEC ID N°: 53)	5' TGGGCTGAATTGAAGACATGCTCC 3'

Las reacciones de PCR requirieron un protocolo estándar de ciclos de PCR de tres etapas para amplificar la casete de expresión génica. Todas las reacciones de PCR se completan utilizando las siguientes condiciones de PCR: 94 °C durante tres minutos seguido de 35 ciclos de a 94 °C durante treinta segundos, 60 °C durante treinta segundos y 72 °C durante tres minutos. Las reacciones se completaron utilizando el *kit* de PCR EX-TAQ™ (TaKaRa Biotechnology Inc. Otsu, Shiga, Japón) según las instrucciones del fabricante. Después del ciclo final, la reacción se incubó a 72 °C durante 10 minutos. Se usó electroforesis en gel de agarosa TAE para determinar el tamaño del amplicón de PCR. Los amplicones de PCR del tamaño esperado indicaron la presencia de una casete de expresión génica de longitud completa en el genoma de los eventos transgénicos de *Arabidopsis*.

Confirmación de la Transcripción Relativa de *dgt-28* a través del análisis de PCR de Transcripción Inversa Cuantitativa.

Se recogieron muestras de tejido de plantas transgénicas *dgt-28* en placas de 96 pocillos y se congelaron a 80 °C. La maceración de los tejidos se realizó con un pulverizador de tejidos KLECO™ y perlas de tungsteno (Environ Metal INC., Sweet Home, Oregón). Después de la maceración del tejido, se aisló el ARN total en un formato de alta producción utilizando el *kit* Qiagen™ Rneasy 96 (Qiagen™, Germantown, MD) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante, que incluye el tratamiento opcional con DnaseI en la columna. Esta etapa fue seguida a continuación por un tratamiento adicional con DnaseI (Ambion™, Austin, TX) del ARN total eluido. La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando el ARN total como plantilla con el *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcription™ (Applied Biosystems, Austin, TX) siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante con la adición del oligonucleótido, TVN. La cuantificación de la expresión se completó con un ensayo de sonda de hidrólisis y se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando el sistema LIGHTCYCLER®480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Los ensayos se diseñaron para *dgt-28* y el gen de referencia interno "proteína desconocida" (número de registro de acceso Genbank: AT4G24610) utilizando el software de diseño de sonda LIGHTCYCLER® 2.0. Para amplificación, se preparó mezcla LIGHTCYCLER®480 Probes Master mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) a una concentración final de IX en una reacción singleplex de 10 µL de volumen que contenía 0,4 µM de cada cebador y 0,2 µM de cada sonda. **Tabla 6.**

Tabla 6. Cebadores de PCR utilizados para el análisis cuantitativo de PCR de transcripción inversa de *dgt-28*.

Nombre del cebador	Secuencia
AT26410LP (SEC ID NO: 54)	5' CGTCCACAAAGCTGAATGTG 3'
AT26410RP (SEC ID NO: 55)	5' CGAAGTCATGGAAGCCACTT 3'
UPL146	Cat n° 04694325001 (Roche, Indianapolis, IN)
DGT28F (SEC ID NO: 56)	5' CTTCAAGGAGATTTGGGATTTGT 3'
DGT28R (SEC ID NO: 57)	5' GAGGGTCGGCATCGTAT 3'
Sonda UPL154	Cat n° 04694406001 (Roche, Indianapolis, IN)

Se realizó una reacción de amplificación en dos etapas con una extensión a 60 °C durante 40 segundos con adquisición de fluorescencia. Todas las muestras se analizaron por triplicado y los valores promedio del umbral de ciclo (Ct) se usaron para el análisis de cada muestra. Se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa menos para cada muestra para asegurar que no hubiera contaminación de ADNg. El análisis de los datos de PCR en tiempo real se realizó basándose en el método $\Delta\Delta Ct$. Este ensayo se usó para determinar la expresión relativa de *dgt-28* en eventos de *Arabidopsis* transgénico que se determinó que eran hemicígotos y homocígotos. Los niveles relativos de transcripción del ARNm de *dgt-28* oscilaron entre 2,5 y 207,5 veces más que el control interno. Estos datos indican que las plantas transgénicas *dgt-28* contenían una casete de expresión funcional del gen *dgt-28*, y las plantas eran capaces de transcribir el transgén *dgt-28*.

Análisis de transferencia Western. Se detectó DGT-28 en muestras de hojas obtenidas de plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas. Los extractos de plantas transgénicas *dgt-28* y los estándares de proteína DGT-28 se incubaron con tampón de muestra NUPAGE® LDS (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía DTT a 90 °C durante 10 minutos y se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida prefabricado. Las proteínas se transfirieron a continuación a la membrana de nitrocelulosa utilizando el protocolo del fabricante. Después de bloquear con la mezcla de bloqueo WESTERNBREEZE® (Invitrogen), la proteína DGT-28 fue detectada por un antisuero anti-DGT-28 seguido de fosfatasa anti-conejo de cabra. La proteína detectada se visualizó mediante el sustrato de quimioluminiscencia BCIP/NBT Western Analysis Reagent (KPL, Gaithersburg, MD). La producción de una proteína DGT-28 intacta a través de la transferencia Western indicó que las plantas transgénicas *dgt-28* que se ensayaron expresaban la proteína DGT-28.

Ejemplo 7: Tolerancia al glifosato.

Las plantas de *Arabidopsis* T1 transgénicas que contienen el transgén *dgt-28* se pulverizaron con diferentes tasas de glifosato. En este estudio se aplicaron tasas elevadas para determinar los niveles relativos de resistencia (105, 420, 1.680 o 3.360 g ae/ha). Una tasa típica de uso de glifosato IX que controlará la *Arabidopsis* no transformada es de 420 g ae/ha. Las formulaciones de glifosato con la adición de sulfato amónico se aplicaron a las plantas T1 con un desherbador químico calibrado a 187 L/ha. Las plantas de *Arabidopsis* T1 que se usaron en este estudio fueron de un número de copias variable para el transgén *dgt-28*. Las plantas *Arabidopsis* T1 *dgt-28* de bajo número de copias se autopolinizaron y se usaron para producir plantas T2. La **Tabla 7** muestra la comparación de plantas transgénicas *dgt-28*, sacada a un gen de resistencia al herbicida glifosato, *dgt-1*, y controles de tipo silvestre. La **Tabla 8** muestra la comparación de *dgt-32* y *dgt-33* sacada a un gen de resistencia al herbicida glifosato, *dgt-1* y controles de tipo silvestre. La **Tabla 9** muestra la comparación de las nuevas enzimas EPSP sintasa bacterianas, con las enzimas EPSP sintasa de Clase I y los controles a una tasa de glifosato de 1.680 g ae/ha.

Resultados de la selección de glifosato de plantas de *Arabidopsis dgt-28* transformadas. Los transformantes T1 de *Arabidopsis* se seleccionaron primero del fondo de semillas no transformadas utilizando un esquema de selección de glufosinato. Se analizaron tres pisos o 30.000 semillas para cada constructo T1. Las plantas T1 seleccionadas

anteriormente se caracterizaron molecularmente y las plantas representativas con número de copias variable se trasplantaron posteriormente en macetas individuales y se pulverizaron con varias tasas de glifosato comercial como se describió anteriormente. La respuesta de estas plantas se presenta en términos de % de lesión visual 2 semanas después del tratamiento (WAT). Los datos se presentan en una tabla que muestra plantas individuales que presentan poca o ninguna lesión (< 20%), una lesión moderada (20-40%) o una lesión grave (> 40%). Se presenta una media aritmética y una desviación estándar para cada constructo utilizado para la transformación de *Arabidopsis*. El intervalo en la respuesta individual se indica también en la última columna para cada tasa y transformación. La *Arabidopsis* no transformada de tipo silvestre (c.v. Columbia) sirvió como control sensible al glifosato.

El nivel de respuesta de la planta varió. Esta variación puede atribuirse al hecho de que cada planta representa un evento de transformación independiente y, por tanto, el número de copias del gen de interés varía de una planta a otra. Se observó que algunas plantas que contenían el transgén no eran tolerantes al glifosato; no se completó un análisis exhaustivo para determinar si estas plantas expresaron el transgén. Es probable que la presencia de números elevados de copias del transgén dentro de las plantas de *Arabidopsis* T1 tenga como resultado el silenciamiento del transgén u otros efectos epigenéticos que produzcan sensibilidad al glifosato, a pesar de la presencia del transgén *dgt-28*.

Se presenta en la **Tabla 9** un promedio global de lesiones en la población para tasas de glifosato a 1.680 g ae/ha para demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con *dgt-3*, *dgt-7*, *dgt-28*, *dgt-32* y *dgt-33* frente a los controles *dgt-1* y de tipo silvestre.

La tolerancia proporcionada por las nuevas EPSP sintetas bacterianas varió dependiendo de la enzima específica. DGT-28, DGT-32 y DGT-33 proporcionaron inesperadamente una tolerancia significativa al glifosato. Los genes *dgt* impartieron resistencia a los herbicidas a plantas *Arabidopsis* T1 individuales en todos los péptidos de tránsito analizados. Como tales, el uso de péptidos de tránsito al cloroplasto adicionales (es decir, TraP8 - *dgt-32* o TraP8 - *dgt-33*) proporcionaría protección al glifosato con niveles de lesión similares a los reportados dentro de un tratamiento dado.

Tabla 7. Respuesta de *Arabidopsis* T1 transformada con *dgt-28* a un intervalo de tasas de glifosato aplicadas tras la emergencia, en comparación con una población homocigótica resistente a *dgt-1* (T4) y un control no transformado. % de lesiones visuales 14 días después de la aplicación.

pDAB107527: TraP4 v2 - <i>dgt-28</i> v5				% Lesiones		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	4	0	0	3,8	7,5	0 - 15
420 g ae/ha glifosato	2	1	1	28,8	28,1	0 - 65
1680 g ae/ha glifosato	0	2	2	55,0	26,8	35 - 85
3360 g ae/ha glifosato	0	2	2	43,8	18,0	30 - 70
pDAB105530: TraP5 v2 - <i>dgt-28</i> v5				% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	6	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	2	2	2	39,3	37,4	8 - 100
420 g ae/ha glifosato	1	4	1	33,0	26,6	8 - 85
1680 g ae/ha glifosato	0	4	2	47,5	27,5	25 - 85
3360 g ae/ha glifosato	0	0	6	76,7	13,7	50 - 85
pDAB105531: TraP8 v2- <i>dgt-28</i> v5				% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0

ES 2 716 481 T3

105 g ae/ha glifosato	3	1	0		10,8	10,4	0 - 25
420 g ae/ha glifosato	3	0	1		22,8	18,6	8 - 50
1680 g ae/ha glifosato	4	0	0		5,3	3,8	0 - 8
3360 g ae/ha glifosato	0	4	0		29,3	6,8	22 - 35
pDAB105532: TraP9 v2-dgt-28 v5							
	% Lesiones				% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%		Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	3	0	1		17,5	28,7	0 - 60
420 g ae/ha glifosato	1	1	2		39,5	25,1	18 - 70
1680 g ae/ha glifosato	3	0	1		26,3	36,1	5 - 80
3360 g ae/ha glifosato	3	0	1		25,8	32,9	8 - 75
pDAB105533: TraP12 v2-dgt-28 v5							
	% Lesiones				% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%		Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	5	0	0		0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	4	1	0		10,0	10,0	0 - 25
420 g ae/ha glifosato	1	1	3		53,6	34,6	8 - 85
1680 g ae/ha glifosato	4	1	0		11,0	8,2	0 - 20
3360 g ae/ha glifosato	0	2	3		55,0	25,5	25 - 80
pDAB105534: TraP13 v2-dgt-28 v5							
	% Lesiones				% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%		Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	5	0	0		0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	4	0	1		14,0	20,6	0 - 50
420 g ae/ha glifosato	3	1	1		17,6	19,5	0 - 50
1680 g ae/ha glifosato	3	0	2		39,0	47,1	5 - 100
3360 g ae/ha glifosato	2	2	1		31,2	22,3	18-70
pDAB4104: dgt-1 (control transformado)							
	% Lesiones				% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%		Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	5	0	0		0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	0	0	4		80,0	0,0	80,0
420 g ae/ha glifosato	0	0	4		80,0	0,0	80,0
1680 g ae/ha glifosato	0	0	4		80,0	0,0	80,0
3360 g ae/ha glifosato	0	0	4		81,3	2,5	80 - 85

WT (control no transformado)	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	5	0	0	0,0	0,0	100
105 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
420 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
1680 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
3360 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

Tabla 8. *dgt-32* y *dgt-33* transformaron la respuesta de T₁ *Arabidopsis* a un intervalo de tasas de glifosato aplicadas después de la emergencia, en comparación con una población homocigótica resistente a *dgt-1* (T₄) y un control no transformado. % lesión visual 14 días después de la aplicación.

pDAB107532: TraP14 v2 - <i>dgt-32</i> v3						
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glifosato	2	0	2	30,0	29,4	0 - 60
1680 g ae/ha glifosato	3	0	1	17,5	21,8	5 - 50
3360 g ae/ha glifosato	0	3	1	35,5	30,0	20 - 80
pDAB107534: TraP24 v2 - <i>dgt-33</i> v3						
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	2	2	0	21,3	14,9	5 - 40
420 g ae/ha glifosato	1	1	2	46,3	30,9	5 - 70
1680 g ae/ha glifosato	1	0	3	62,5	38,8	5 - 90
3360 g ae/ha glifosato	1	0	3	62,0	36,0	8 - 80
pDAB4104: <i>dgt-1</i> (control transformado)						
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	0	2	3	42,5	15,0	20 - 50
420 g ae/ha glifosato	0	1	2	38,8	11,1	25 - 50
1680 g ae/ha glifosato	0	0	4	79,0	19,4	50 - 90
3360 g ae/ha glifosato	0	0	4	50,0	0,0	50
WT (control no transformado)						
Promedios	< 20%	20-	> 40%	Promed.	Desv.	Intervalo

		40%				estándar	(%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	0	0	4		85,0	0,0	85
420 g ae/ha glifosato	0	0	4		100,0	0,0	100
1680 g ae/ha glifosato	0	0	4		100,0	0,0	100
3360 g ae/ha glifosato	0	0	4		100,0	0,0	100

Tabla 9. Respuesta de *Arabidopsis* T₁ transformada con *dgt-28*, *dgt-32*, *dgt-33*, *dgt-3* y *dgt-7* a post-emergencia aplicada con glifosato a 1.680 g ae/ha, en comparación con una población resistente al *dgt-1* (T₄) homocigótico, y un control no transformado. % lesión visual 14 días después de la aplicación.

			% Lesiones			% Lesiones		
			< 20%	20- 40%	> 40%	Promed.	Desv. Estándar	Intervalo (%)
Enzimas bacterianas	pDAB107527	TraP4 v2 – <i>dgt-28</i> v5	0	2	2	55,0	26,8	35 - 85
	pDAB105530	TraP5 v2 – <i>dgt-28</i> v5	0	4	2	47,5	27,5	25 - 85
	pDAB105531	TraP8 v2 – <i>dgt-28</i> v5	4	0	0	5,3	3,8	0 - 8
	pDAB105532	TraP9 v2 – <i>dgt-28</i> v5	3	0	1	26,3	36,1	5 - 80
	pDAB105533	Trap12 v2 – <i>dgt-28</i> v5	4	1	0	11,0	8,2	0 - 20
	pDAB105534	TraP13 v2 – <i>dgt-28</i> v5	3	0	2	39,0	47,1	5 - 100
	pDAB107532	TraP14 v2 – <i>dgt-32</i> v3	3	0	1	17,5	21,8	5 - 50
	pDAB107534	TraP24 v2 – <i>dgt-33</i> v3	1	0	3	62,5	38,8	5 - 90
Enzimas de Clase I	pDAB102715	<i>dgt-3</i> v2	4	0	3	42	48	0 - 100
	pDAB102716	<i>dgt-3</i> v3	2	1	0	14	23	0 - 40
	pDAB102717	<i>dgt-3</i> v4	3	2	1	28	35	10 - 100
	pDAB102785	<i>dgt-7</i> v4	0	1	1	45	21	30 - 60
	pDAB4104	<i>dgt-1</i> (control transformado)	0	0	4	80,0	0,0	80
	–	WT (control no transformado)	0	0	4	100,0	0,0	100

5

El *dgt-28* como marcador seleccionable. El uso *dgt-28* como un marcador seleccionable para el agente de selección de glifosato se ensaya con las plantas transformadas *Arabidopsis* descritas anteriormente. Aproximadamente 50 semillas de *Arabidopsis* de la generación T₄ (homocigóticas para *dgt-28*) se añaden a aproximadamente 5.000 semillas de tipo silvestre (sensibles al glifosato). Las semillas germinan y las plántulas se pulverizan con una dosis selectiva de glifosato. Se comparan varios tratamientos de glifosato; cada bandeja de plantas recibe uno o bien dos tiempos de aplicación de glifosato en uno de los siguientes esquemas de tratamiento: 7 DAP (días después de la

10

plantación), 11 DAP o 7 seguido de 11 DAP. Dado que todas las plantas también contienen un gen de resistencia al glufosinato en el mismo vector de transformación, las plantas que contienen *dgt-28* seleccionadas con glifosato se pueden comparar directamente con plantas que contienen *DSM-2* o *pat* seleccionadas con glufosinato.

Los tratamientos con glifosato se aplican con una boquilla de pulverización DeVilbiss™ como se describió anteriormente. Las plantas transgénicas que contienen *dgt-28* se identifican como 17 DAP "resistente" o "sensible". Los tratamientos de 26,25-1680 g ae/ha de glifosato aplicados 7 y 11 días después de la plantación (DAP), muestran una selección efectiva para las plantas *Arabidopsis* transgénicas que contienen *dgt-28*. Se cuentan las plantas sensibles y resistentes y se encuentra que el número de plantas tolerantes al glifosato se correlaciona con el número original de semillas transgénicas que contienen el transgén *dgt-28* que se plantan. Estos resultados indican que *dgt-28* se puede usar efectivamente como un marcador seleccionable alternativo para una población de *Arabidopsis* transformada.

Heredabilidad. Los eventos confirmados de *Arabidopsis* T₁ transgénicos se autopolinizaron para producir semilla T₂. En estas semillas hicieron pruebas de descendencia aplicando herbicida Ignite™ que contiene glufosinato (200 g ae/ha) a 100 hermanas T₂ aleatorias. Cada planta T₂ individual se trasplantó a macetas cuadradas de 7,5 cm antes de la aplicación del pulverizador (pulverizador de oruga) a una velocidad de aplicación de 187 L/ha). Las familias T₁ (plantas T₂) se segregaron en el 3 Resistente anticipado: 1 Modelo sensible para un locus único de herencia dominante con herencia mendeliana según lo determinado por el análisis de Chi cuadrado ($P > 0,05$). El porcentaje de familias T₁ que se segregaron con la herencia mendeliana esperada se ilustra en la **Tabla 10** y demuestra que el rasgo *dgt-28* se pasa a través de la herencia mendeliana a la generación T₂. Las semillas se recolectaron de 5 a 15 individuos T₂ (semilla T₃). Se hicieron pruebas de descendencia de veinticinco hermanos T₃ de cada una de 3-4 familias T₂ seleccionadas aleatoriamente como se describió anteriormente. Los datos no mostraron segregación y, por lo tanto, demostraron que *dgt-28* y *dgt-3* están integrados establemente en el cromosoma y se heredan de manera mendeliana por lo menos a tres generaciones.

Tabla 10. Porcentaje de familias T₁ (plantas T₂) segregadas como herencia mendeliana única para una prueba de descendencia de 100 plantas.

Gen de interés	Familias T ₁ ensayadas que se segregan en el locus 1 (%)
<i>dgt-3 v2</i>	64%
<i>dgt-3 v3</i>	60%
<i>dgt-3 v4</i>	80%
<i>dgt-7 v4</i>	63%
TraP5 v2 – <i>dgt-28 v5</i>	100%
TraP8 v2 – <i>dgt-28 v5</i>	100%
TraP9 v2 – <i>dgt-28 v5</i>	100%
TraP12 v2 – <i>dgt-28 v5</i>	50%
TraP13 v2 – <i>dgt-28 v5</i>	75%
<i>yfp</i> Plantas transgénicas de control	100%

Datos de *Arabidopsis* T₂. Las plantas de segunda generación (T₂) de eventos de *Arabidopsis* T₁ seleccionadas que tenían bajos números de copias del transgén *dgt-28* se caracterizaron además por la tolerancia al glifosato. El glifosato se aplicó como se describió anteriormente. La respuesta de las plantas se presenta en términos de % de lesión visual 2 semanas después del tratamiento (WAT). Los datos se presentan como un histograma de individuos que muestran poca o ninguna lesión (< 20%), una lesión moderada (20-40%) o una lesión grave (> 40%). Se presenta una media aritmética y una desviación estándar para cada constructo utilizado para la transformación de *Arabidopsis*. El intervalo en la respuesta individual también se indica en la última columna para cada tasa y transformación. La *Arabidopsis* no transformada de tipo silvestre (cv. Columbia) sirvió como control sensible al glifosato. En la generación T₂, las plantas hemicigóticas y homocigóticas estaban disponibles para las pruebas de cada evento y, por tanto, se incluyeron para cada tasa de glifosato analizada. Las plantas hemicigóticas contienen dos alelos diferentes en un locus en comparación con las plantas homocigóticas que contienen los mismos dos alelos en un locus. Se espera una variabilidad de la respuesta al glifosato en la generación T₂ como resultado de la diferencia en la dosis génica para hemicigotos en comparación con las plantas homocigóticas. La variabilidad de respuesta al glifosato se refleja en la desviación estándar y el intervalo de respuesta.

En la generación T₂, los eventos *dgt-28*, tanto de copia única como multicopia, se caracterizaron por la tolerancia al glifosato. Dentro de un evento, las plantas de una sola copia mostraron niveles similares de tolerancia al glifosato. Los datos característicos para un evento T₂ de una sola copia se presentan en la **Tabla 11**. Los eventos que contienen

dgt-28 unido con TraP5 v2 no proporcionaron una tolerancia alta al glifosato en comparación con los constructos de *dgt-28* que contenían otros péptidos de tránsito TraP. Sin embargo, los constructos de *dgt-28* TraP5 sí que proporcionaron un bajo nivel de tolerancia al glifosato en comparación con el control Columbia no transformado. Hubo casos en los que se demostró que los eventos que contenían dos o más copias de *dgt-28* eran más susceptibles a tasas elevadas de glifosato (datos no mostrados). Este aumento en la sensibilidad al glifosato es similar a los datos descritos anteriormente para las plantas T₁ que también contenían números elevados de copias del transgén *dgt-28*. Es probable que la presencia de altos números de copias del transgén dentro de las plantas de *Arabidopsis* tenga por resultado un silenciamiento del transgén u otros efectos epigenéticos que resulten en sensibilidad al glifosato, a pesar de la presencia del transgén *dgt-28*.

Estos eventos contenían *dgt-28* unido con TraP5 v2 (pDAB105530), TraP12 v2 (pDAB105533) y TraP13 v2 (pDAB105534).

Además de *dgt-28*, los eventos T₂ *Arabidopsis* transformados con *dgt-3* se presentan en la **Tabla 12**. Como se describe para los eventos *dgt-28* en la **Tabla 11**, la tabla de datos contiene un evento representativo que es característico de la respuesta al glifosato para cada constructo. Para la caracterización de *dgt-3*, se compararon constructos que contenían una sola PTU (unidad de transformación de plantas) con el gen *dgt-3* impulsado por el promotor AtUbi10 (pDAB102716, FIG. 45 y pDAB102715, FIG. 10) con constructos con el mismo gen que contiene 2 PTU del gen (pDAB102719, FIG. 32; pDAB102718, FIG. 33). Los constructos que contenían 2 PTU utilizaron el promotor AtUbi10 para dirigir una copia del gen y el promotor CsVMV para impulsar la otra copia. El uso de la doble PTU se incorporó para comparar las plantas transgénicas *dgt-3* con las plantas transgénicas *dgt-28* que contenían dos copias del transgén. Los datos demostraron que los eventos T₂ *dgt-3* de copia única con solo una PTU única fueron más susceptibles al glifosato que los eventos *dgt-28* de copia única probados, pero fueron más tolerantes que el control no transformado. Las familias T₁ que contienen 2 PTUs del gen *dgt-3* proporcionaron un mayor nivel de tolerancia visual al glifosato en comparación con los constructos de 1 PTU. En ambos casos se compararon las familias T₁ con los controles *dgt-1* y de tipo silvestre. Los datos T₂ demuestran que *dgt-28* proporciona una tolerancia alta como eventos de copia única.

Tabla 11. Respuesta de eventos de *Arabidopsis* T₂ individuales seleccionados que contienen *dgt-28*, a glifosato aplicado post-emergencia en tasas variables, en comparación con una población homocigótica resistente a *dgt-1* (T4) y un control no transformado. % lesión visual 14 días después de la aplicación.

pDAB105530: TraP5 v2 - <i>dgt-28</i> v5	% Lesiones			% Lesiones		
1 copia	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glifosato	0	0	4	75,0	17,8	50 - 90
840 g ae/ha glifosato	0	0	4	80,0	20,0	50 - 90
1680 g ae/ha glifosato	0	0	4	75,0	10,8	60 - 85
3360 g ae/ha glifosato	0	0	4	76,3	4,8	70 - 80
pDAB105531: TraP8 v2 – <i>dgt-28</i> v5	% Lesiones			% Lesiones		
1 copia	<20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,5	1,0	0 - 2
840 g ae/ha glifosato	4	0	0	1,3	2,5	0 - 5
1680 g ae/ha glifosato	4	0	0	7,5	5,0	5 - 15
3360 g ae/ha glifosato	4	0	0	7,5	6,5	0 - 15
pDAB105532: TraP9 v2 – <i>dgt-28</i> v5	% Lesiones			% Lesiones		
1 copia	<20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0

ES 2 716 481 T3

420 g ae/ha glifosato	4	0	0		2,0	4,0	0 - 8
840 g ae/ha glifosato	4	0	0		9,0	2,0	8 - 12
1680 g ae/ha glifosato	4	0	0		7,3	4,6	2 - 12
3360 g ae/ha glifosato	4	0	0		11,0	1,2	10 - 12
pDAB105533: TraP12 v2 – <i>dgt-28</i> v5							
	% Lesiones				% Lesiones		
1 copia	<20%	20-40%	> 40%		Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0	0
420 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0	0
840 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0	0
1680 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0	0
3360 g ae/ha glifosato	3	1	0		13,3	7,9	8 - 25
pDAB105534: TraP13 v2 – <i>dgt-28</i> v5							
	% Lesiones				% Lesiones		
1 copia	<20%	20-40%	> 40%		Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0	0
420 g ae/ha glifosato	3	1	0		5,0	10,0	0 - 20
840 g ae/ha glifosato	3	1	0		5,0	10,0	0 - 20
1680 g ae/ha glifosato	2	2	0		10,0	11,5	0 - 20
3360 g ae/ha glifosato	2	2	0		15,0	12,2	5 - 30
WT (control no transformado)							
	% Lesiones				% Lesiones		
	<20%	20-40%	> 40%		Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0	0
420 g ae/ha glifosato	0	0	4		100,0	0,0	100
840 g ae/ha glifosato	0	0	4		100,0	0,0	100
1680 g ae/ha glifosato	0	0	4		100,0	0,0	100
3360 g ae/ha glifosato	0	0	4		100,0	0,0	100
pDAB4104: <i>dgt-1</i> (control transformado)							
	% Lesiones				% Lesiones		
1 copia	<20%	20-40%	> 40%		Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0	0,0
420 g ae/ha glifosato	0	4	0		37,5	2,9	35 - 40
840 g ae/ha glifosato	0	0	4		45,0	0,0	45
1680 g ae/ha glifosato	0	0	4		47,5	2,9	45 - 50
3360 g ae/ha glifosato	0	0	4		50,0	0,0	50

Tabla 12. Respuesta de eventos de *Arabidopsis* T2 seleccionados transformados con *dgt-3* a glifosato aplicado post-emergencia a varias tasas. % lesión visual 14 días después de la aplicación.

pDAB102716: <i>dgt-3 v3</i> (1 PTU)	% Lesiones			% Lesiones		
1 copia seg	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha glifosato	1	1	2	39	25	15 - 65
840 g ae/ha glifosato	0	2	2	50	23	30 - 70
1680 g ae/ha glifosato	0	1	3	69	19	40 - 80
3360 g ae/ha glifosato	0	0	4	79	6	70 - 85
pDAB102719: <i>dgt - 3v3</i> (2 PTU)	% Lesiones			% Lesiones		
1 copia seg	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha glifosato	0	4	0	20	0	20
840 g ae/ha glifosato	0	3	1	38	5	35 - 45
1680 g ae/ha glifosato	3	1	0	15	7	10 - 25
3360 g ae/ha glifosato	2	2	0	21	8	15 - 30
pDAB102715: <i>dgt - 3 v2</i> (1 PTU)	% Lesiones			% Lesiones		
1 copia seg	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha glifosato	2	2	0	26	16	10 - 40
840 g ae/ha glifosato	0	2	2	55	17	40 - 70
1680 g ae/ha glifosato	0	2	2	56	22	35 - 75
3360 g ae/ha glifosato	0	0	4	65	17	50 - 80
pDAB102718: <i>dgt - 3 v2</i> (2 PTU)	% Lesiones			% Lesiones		
1 copia seg	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha glifosato	4	0	0	5	7	0 - 15
840 g ae/ha glifosato	2	2	0	23	10	15 - 35
1680 g ae/ha glifosato	3	0	1	20	20	5 - 50
3360 g ae/ha glifosato	1	1	2	36	22	15 - 60

Datos de *Arabidopsis* T3. Las plantas de tercera generación (T3) de los eventos seleccionados de *Arabidopsis* T2 que contenían bajo número de copias del transgén *dgt-28* se caracterizaron además por la tolerancia al glifosato. Se seleccionaron veinticinco plantas por línea con glufosinato como se describió anteriormente, y las líneas de cada constructo ensayado no se segregaron para el gen marcador seleccionable. El glifosato se aplicó como se describió anteriormente. La respuesta de las plantas se presenta en términos del % de lesión visual 2 semanas después del tratamiento (WAT). Los datos se presentan como un histograma de individuos que presentan poca o ninguna lesión (< 20%), lesión moderada (20-40%) o lesión grave (> 40%). Se presentan una media aritmética y desviación estándar para cada constructo utilizado para la transformación de *Arabidopsis*. El intervalo de respuesta individual también se indica en la última columna para cada tasa y transformación. *Arabidopsis* de tipo silvestre, no transformada (cv. Columbia) sirvió como control sensible al glifosato.

Tabla 13. Respuesta de eventos T₃ *Arabidopsis* que contienen *dgt-28* a glifosato aplicado en post-emergencia a tasas variables, comparada con una población homocigótica resistente a *dgt-1* (T₄) y un control no transformado. % de lesiones visuales 14 días después de la aplicación.

	% Intervalo de Lesiones (No. de replicados)			Análisis del % lesiones		
	% Intervalo de Lesiones (No. de replicados)			Análisis del % de lesiones		
	% Intervalo de Lesiones (No. de replicados)			Análisis del % de lesiones		
	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
	% Intervalo de Lesiones (No. de replicados)			Análisis del % de lesiones		
	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
	% Intervalo de Lesiones (No. de replicados)			Análisis del % de lesiones		
	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)

	% Intervalo de Lesiones (No. de replicados)			Análisis del % de lesiones		
	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)

	% Intervalo de Lesiones (No. de replicados)			Análisis del % de lesiones		
	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)

	% Intervalo de Lesiones (No. de replicados)			Análisis del % de lesiones		
	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)

	% Intervalo de Lesiones (No. de replicados)			Análisis del % de lesiones		
	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)

	% Intervalo de Lesiones (No. de replicados)			Análisis del % de lesiones		
	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)

Selección de plantas transformadas. Las semillas T₁ recién cosechadas (genes *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33 v1*) se dejaron secar a temperatura ambiente y se enviaron a Indianápolis para su análisis. La semilla T₁ se sembró en bandejas de germinación de 26,5 x 51 cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), recibiendo cada una de ellas partes alícuotas de

200 mg de semilla T₁ estratificada (~ 10.000 semillas) que se habían suspendido previamente en 40 mL de solución de agarosa al 0,1% y se almacenó a 4 °C durante 2 días para completar los requisitos de latencia y asegurar la germinación sincronizada de las semillas.

5 Se cubrió Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) con vermiculita fina y se sub-irrigó con solución de Hoagland hasta que se humedeció, y luego se dejó drenar por gravedad. Cada alícuota de 40mL de semilla estratificada se sembró uniformemente sobre la vermiculita con una pipeta y se cubrió con domos de humedad (KORD™ Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4 - 5 días. Los domos se eliminaron una vez germinadas las plantas antes de la selección de transformante inicial utilizando un spray de post-emergencia con glufosinato (seleccionando el gen *dsm-2* co-transformado).

10 Seis días después de la plantación (DAP), y de nuevo a los 10 DAP, se pulverizaron plantas T₁ (cotiledón y fase 2-4-If, respectivamente) con una solución al 0,1% de herbicida IGNITE™ (280 g ai/L de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) a un volumen de pulverización de 10 mL/bandeja (703 L/ha) utilizando una boquilla de pulverización de aire comprimido DeVilbiss™ para proporcionar una tasa efectiva de 200 g ae/ha de glufosinato por aplicación. Los sobrevivientes (plantas en crecimiento activo) se identificaron 4 - 7 días después de la pulverización final. Las plantas supervivientes se trasplantaron individualmente en macetas de 7,5 cm preparadas con medios de cultivo (Metro Mix 360™). Las plantas se criaron en el invernadero al menos 1 día antes del muestreo de tejido para los análisis del número de copias.

20 Se tomaron muestras de plantas T₁ y se completó el análisis del número de copias para los genes *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33 v1*. Las plantas T₁ se asignaron luego a varias tasas de glifosato, de modo que entre cada tasa había una serie de copias. Para *Arabidopsis*, 26,25 g ae/ha glifosato es una dosis efectiva para distinguir las plantas sensibles de aquellas que tienen niveles de resistencia significativos. Se aplicaron tasas elevadas para determinar los niveles relativos de resistencia (105, 420, 1680 o 3360 g ae/ha). La **Tabla 15** muestra las comparaciones sacadas a *dgt-1*.

25 Todas las aplicaciones de herbicida de glifosato se realizaron mediante un pulverizador de oruga en un volumen de pulverización de 187 L/ha. El glifosato usado fue de la formulación comercial de la sal de dimetilamina de Durango (480 g ae/L, Dow AgroSciences, LLC). Las plantas T₁ de número de copias bajo que presentaron tolerancia al glufosinato o al glifosato accedieron a la generación T₂.

30 Las primeras transformaciones de *Arabidopsis* se realizaron utilizando *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33 v1*. Los transformantes T₁ se seleccionaron primero del fondo de semilla no transformada utilizando un esquema de selección de glufosinato. Se analizaron tres pisos o 30.000 semillas para cada constructo T₁. Se calculó la frecuencia de transformación y los resultados de los constructos T₁ *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33* se presentan en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Frecuencia de transformación de constructos T₁ *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33* de *Arabidopsis* seleccionados con glufosinato para la selección del gen marcador seleccionable DSM-2.

Costruto	Casete	Frecuencia de transformación (%)
pDAB107532	AtUbi10/TraP14 <i>dgt-32 v1</i>	0,47
pDAB107533	AtUbi10/TraP23 <i>dgt-31 v1</i>	0,36
pDAB107534	AtUbi10/TraP24 <i>dgt-33 v1</i>	0,68

35 Las plantas T₁ seleccionadas anteriormente se trasplantaron después en macetas individuales y se pulverizaron con varias tasas de glifosato comercial. La **Tabla 15** compara la respuesta de *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33 v1* y los genes de control para conferir resistencia al glifosato a los transformantes T₁ de *Arabidopsis*. La respuesta se presenta en términos de % de lesión visual 2 WAT. Los datos se presentan como un histograma de individuos con poca o ninguna lesión (< 20%), lesión moderada (20-40%) o lesión grave (> 40%). Se presenta una media aritmética y una desviación estándar para cada tratamiento. El intervalo en la respuesta individual se indica también en la última columna para cada tasa y transformación. La *Arabidopsis* no transformada de tipo silvestre (cv. Columbia) sirvió como control sensible al glifosato. El gen *DGT-31 (v1)* con el péptido de tránsito TraP23 confirió una ligera tolerancia a los herbicidas con plantas de *Arabidopsis* T₁ individuales en comparación con el control negativo, pero el gen mostró una tolerancia mejorada con el péptido de tránsito TraP8. Tanto la DGT-32 como la DGT-33 demostraron una tolerancia alta al glifosato a las tasas probadas con TraP8 y con sus respectivos péptidos de tránsito al cloroplasto diferentes (TraP14 y TraP24 respectivamente). Dentro de un tratamiento dado, el nivel de respuesta de la planta varió en gran medida, lo que puede atribuirse al hecho de que cada planta representa un evento de transformación independiente y, por tanto, el número de copias del gen de interés varía de una a otra planta. Hay que señalar que, en cada tasa de glifosato ensayada, hubo individuos que fueron más tolerantes que otros. Se presenta en la **Tabla 15** un promedio de lesiones en la población global por tasa, para demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33 v1* en comparación con *dgt-1 v1* o los controles de tipo silvestre.

Tabla 15. Respuesta de *Arabidopsis* T₁ transformada con *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33 v1* a un intervalo de tasas de glifosato aplicadas después del brote, en comparación con una población homocigótica resistente a *dgt-1* (T4), o un control no transformado. % lesión visual 2 semanas después del tratamiento.

TraP23 <i>dgt-31</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	<20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	0	0	4	81,3	2,5	80 - 85
420 g ae/ha	0	0	4	97,3	4,9	90 - 100
1680 g ae/ha	0	0	4	90,0	7,1	85 - 100
3360 g ae/ha	0	0	4	91,3	6,3	85 - 100
TraP14 <i>dgt-32</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha	2	0	2	30,0	29,4	0 - 60
1680 g ae/ha	3	0	1	17,5	21,8	5 - 50
3360 g ae/ha	0	3	1	35,0	30,0	20 - 80
TraP24 <i>dgt-33</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	2	2	0	21,3	14,9	5 - 40
420 g ae/ha	1	1	2	46,3	30,9	5 - 70
1680 g ae/ha	1	0	3	62,5	38,8	5 - 90
3360 g ae/ha	1	0	3	62,0	36,0	8 - 80
TraP8 <i>dgt-31</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0
105 g ae/ha glifosato	0	1	3		43,8	17,0
420 g ae/ha glifosato	1	2	1		43,8	32,5
1680 g ae/ha glifosato	0	1	3		71,3	27,8
3360 g ae/ha glifosato	0	0	4		81,3	8,5
TraP8 <i>dgt-32</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0
105 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0
420 g ae/ha glifosato	4	0	0		7,5	5,0
1680 g ae/ha glifosato	3	1	0		10,8	9,6
3360 g ae/ha glifosato	4	0	0		12,8	3,2
TraP8 <i>dgt-33</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0

ES 2 716 481 T3

105 g ae/ha glifosato	4	0	0		0,0	0,0
420 g ae/ha glifosato	4	0	0		2,5	3,8
1680 g ae/ha glifosato	4	0	0		6,3	2,5
3360 g ae/ha glifosato	3	1	0		20,0	13,5
dgt-31 (control transformado)	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0,0
105 g ae/ha	0	1	3	42,5	15,0	20 - 50
420 g ae/ha	0	2	2	38,8	11,1	25 - 50
1680 g ae/ha	0	0	4	79,0	19,4	50 - 90
3360 g ae/ha	0	0	4	50,0	0,0	50
WT (control no transformado)	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
420 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
1680 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
3360 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
TraP23 dgt-31	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	0	0	4	81,3	2,5	80 - 85
420 g ae/ha	0	0	4	97,3	4,9	90 - 100
1680 g ae/ha	0	0	4	90,0	7,1	85 - 100
3360 g ae/ha	0	0	4	91,3	6,3	85 - 100
TraP14 dgt-32	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha	2	0	2	30,0	29,4	0 - 60
1680 g ae/ha	3	0	1	17,5	21,8	5 - 50
3360 g ae/ha	0	3	1	35,0	30,0	20 - 80
TraP24 dgt-33	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	2	2	0	21,3	14,9	5 - 40
420 g ae/ha	1	1	2	46,3	30,9	5 - 70
1680 g ae/ha	1	0	3	62,5	38,8	5 - 90
3360 g ae/ha	1	0	3	62,0	36,0	8 - 80
dgt-1 (control transformado)	% Lesiones			% Lesiones		

Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	0	1	3	42,5	15,0	20 – 50
420 g ae/ha	0	2	2	38,8	11,1	25 – 50
1680 g ae/ha	0	0	4	79,0	19,4	50 – 90
3360 g ae/ha	0	0	4	50,0	0,0	50
WT (control no transformado)	% Lesiones			% Lesiones		
Promedios	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
420 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
1680 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
3360 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100

Ejemplo 8: *dgt-32* y *dgt-33* como marcadores seleccionables.

dgt-32 y *dgt-33 v1* se utilizan como marcadores seleccionables con glifosato como agente de selección. El rendimiento de estos marcadores se analiza con *Arabidopsis* transformada. Aproximadamente 50 semillas de *Arabidopsis* de la generación T₄ (homocigóticas para *dgt-32* y *dgt-33 v1*) se fijan a aproximadamente 5.000 semillas de tipo silvestre (sensibles). Se comparan varios tratamientos, recibiendo cada bandeja de las plantas una o bien dos programaciones en el tiempo de aplicación de glifosato en uno de los siguientes esquemas de tratamiento: 7 DAP, 11 DAP, o 7 DAP seguido de 11 DAP. Dado que todos los individuos también contienen el gen *dsm-2* en el mismo vector de transformación, *dgt-32* y *dgt-33* seleccionados con glifosato pueden ser comparados directamente con *dsm-2* seleccionado con glifosinato.

Los tratamientos se aplican con una punta de pulverización DeVilbiss™. Las plantas se identifican como 17 DAP resistentes o sensibles. Los tratamientos de 26,25 - 280 g ae/ha 2,4-D aplicados 7 y 11 días después de la plantación (DAP) son igualmente efectivos en la frecuencia de selección. Estos resultados indican que *dgt-32* y *dgt-33 v1* se pueden usar efectivamente como un marcador seleccionable.

Heredabilidad. Una variedad de eventos T₁ se autopolinizaron para producir semilla T₂. Se hicieron pruebas de descendencia de estas semillas mediante la aplicación de IGNITE™ (200 g ae/ha) a 100 hermanos T₂ aleatorios. Cada planta T₂ individual se trasplantó en macetas cuadradas de 7,5 cm antes de la aplicación del rociador (pulverizador de oruga a una tasa de aplicación de 187 L/ha). Se determinaron las familias T₁ (plantas T₂) que se segregan en 3 Resistente anticipado: Modelo sensible 1 para un locus único heredado predominantemente con herencia mendeliana según lo determinado por el análisis de Chi cuadrado (P> 0,05).

La semilla se recogió de 5 a 15 individuos T₂ (semilla T₃). Se hicieron pruebas de descendencia de veinticinco hermanos T₃ de cada una de las 3 familias T₂ seleccionadas al azar. Los datos que no presentan segregación demuestran que *dgt-32* y *dgt-33 v1* se integraron de manera estable y se heredaron de manera mendeliana por lo menos a tres generaciones.

Caracterización de tolerancia a herbicidas adicionales de líneas T3 DGT. La semilla de *Arabidopsis* de la generación T3 se estratifica y se siembra en bandejas de selección. Una línea de control transformada que contiene *dgt-1* y el control no transformado se plantan de manera similar. Las plántulas se transfieren a macetas individuales de 7,5 cm en el invernadero. Todas las plantas se rocían con un pulverizador de oruga ajustado a 187 L/ha. Las plantas se rocían con un intervalo de glifosato de 420-3.360 g ae/ha (DURANGO™ DMA, Dow AgroSciences). Todas las aplicaciones se formulan en agua. Cada tratamiento se repite 4 veces, y las plantas se evalúan a los 7 y 14 días después del tratamiento.

Ejemplo 9: Transformación de especies de cultivos adicionales.

La soja se transforma con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* y/o *dgt-33* (con o sin un péptido de tránsito al cloroplasto) para proporcionar altos niveles de resistencia al herbicida glifosato, utilizando un método conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, sustancialmente las mismas técnicas descritas anteriormente en el Ejemplo 11 o en el Ejemplo 13 de la Publicación de Patente Internacional PCT No. WO 2007/053482.

El algodón se transforma con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* y/o *dgt-33* (con o sin un péptido de tránsito al cloroplasto) para

proporcionar niveles elevados de resistencia al herbicida glifosato utilizando un método conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, sustancialmente las mismas técnicas descritas anteriormente en los Ejemplos 14 de la patente de EE. UU. 7.838.733, o el Ejemplo 12 de la Publicación de Patente Internacional PCT N° WO 2007/053482.

- 5 La canola se transforma con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* y/o *dgt-33* (con o sin un péptido de tránsito al cloroplasto) para proporcionar niveles elevados de resistencia al herbicida glifosato utilizando un método conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo sustancialmente las mismas técnicas descritas con anterioridad en el Ejemplo 26 de la patente de EE. UU. 7.838.733, o el Ejemplo 22 de la Publicación de Patente Internacional PCT No. WO 2007/053482.

Ejemplo 10: Transformación del maíz.

- 10 Constructos de ADN para la transformación del maíz. Los métodos de clonación estándar, como se describió anteriormente, se usaron en la construcción de vectores binarios para su uso en la transformación del maíz mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. La **Tabla 16** lista los vectores que se construyeron para la transformación del maíz. Los elementos genéticos siguientes se usaron en los vectores que contenían *dgt-28*; se usó el promotor ubiquitina 1 de *Zea mays* (ZmUbi1; patente de Estados Unidos n° 5.510.474) para dirigir la secuencia codificante *dgt-28* que está flanqueada por una región 3' no traducida de lipasa de *Zea mays* (ZmLip 3'UTR; patente de Estados Unidos n° 7.179.902), el casete marcador seleccionable consiste en el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays* que se usó para impulsar la secuencia codificante *aad-1* (patente de EE. UU. n° 7.838.733) que está flanqueada por una región 3' no traducida de lipasa de *Zea mays*. La secuencia codificadora de *aad-1* confiere tolerancia a los herbicidas de fenoxi auxina, tales como los herbicidas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ariloxifenoxipropionato (AOPP).

- 20 Los constructos *dgt-28* se construyeron como vectores binarios estándar y vectores de sistema superbinario *Agrobacterium* (Japan Tobacco, Tokio, JP). Los vectores binarios estándar incluyen pDAB107663, pDAB107664, pDAB107665 y pDAB107665. Los vectores del sistema superbinario *Agrobacterium* incluyen pDAB108384, pDAB108385, pDAB108386 y pDAB108387.

- 25 Se completaron constructos adicionales que contienen un gen informador de *proteína fluorescente amarilla* (*yfp*; Solicitud de Patente de Estados Unidos 2007/0298412). pDAB109812 contiene una casete del gen informador *yfp* que es impulsado por el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays* y flanqueado por la región per5 3' no traducida de *Zea mays* (Zm per5 3'UTR; Patente de EE. UU. No. 7.179.902), la casete marcadora seleccionable consiste en el promotor del virus baciliforme de la caña de azúcar (SCBV; patente de EE. UU. n. 5.994.123) que se utiliza para dirigir la expresión de *aad-1* y está flanqueado por la región 3' no traducida de la lipasa de *Zea mays*. pDAB101556 contiene una casete *yfp* que es impulsada por el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays* y flanqueada por la región per 5 3' no traducida, la casete del marcador seleccionable consiste en el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays* que se usa para dirigir la expresión de *aad-1* y está flanqueada por la región 3' no traducida de la lipasa de *Zea mays*. pDAB107698 contiene una casete *dgt-28* que es impulsada por el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays* y está flanqueada por una región 3' no traducida de lipasa de *Zea mays*, una casete de *yfp* que es impulsada por el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays* y flanqueada por la región per 5 3' no traducida, la casete marcador seleccionable consiste en el promotor del virus baciliforme de la caña de azúcar que se usa para impulsar la expresión de *aad-1* y está flanqueada por la región 3' no traducida de la lipasa de *Zea mays*. Estos tres constructos son vectores binarios estándar.

Tabla 16. Vectores de transformación del maíz

Plásmido n°	Fig. n°	Descripción de los elementos genéticos
pDAB107663	34	ZmUbi1/TraP4 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB107664	35	ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB107665	36	ZmUbi1/TraP23 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB107666	37	ZmUbi1/TraP5 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB109812	38	ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmPer5 3'UTR :: SCBV/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB101556	39	ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmPer5 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB107698	40	ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmLip 3'UTR :: SCBV/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB108384	41	ZmUbi1/TraP4 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR vector superbinario
pDAB108385	42	ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR precursor superbinario
pDAB108386	43	ZmUbi1/TraP23 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR precursor superbinario
pDAB108387	44	ZmUbi1/TraP5 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR precursor superbinario

Esterilización de mazorcas y aislamiento embrionario. Para obtener embriones inmaduros de maíz, se cultivaron en el invernadero plantas de la línea de cría B 104 de *Zea mays* y se auto- o sib-polinizaron para producir mazorcas. Las mazorcas fueron cosechadas aproximadamente 9-12 días después de la polinización. En el día experimental, las mazorcas se esterilizaron superficialmente por inmersión en una solución al 20% de hipoclorito de sodio (5%) y se agitaron durante 20-30 minutos, seguido por tres enjuagues en agua estéril. Después de la esterilización, se diseccionaron asépticamente embriones zigóticos inmaduros (1,5 - 2,4 mm) de cada mazorca y se distribuyeron al azar en tubos de microcentrífuga que contenían medios de infección líquidos (medio basal LS, 4,43 g/L; solución de vitamina N6 [1000X], 1,00 mL/L; L-prolina, 700,0 mg/L; sacarosa, 68,5 g/L; D (+) glucosa, 36,0 g/L; 10 mg/mL de 2,4-D, 150mL/L). Para un conjunto dado de experimentos, se utilizaron embriones de tres mazorcas agrupados para cada transformación.

Iniciación del cultivo de *Agrobacterium*:

Las existencias de glicerol de *Agrobacterium* que contienen los vectores de transformación binarios descritos anteriormente se sembraron en placas de medio mínimo AB que contenían antibióticos apropiados y se desarrollaron a 20 °C durante 3 - 4 días. Se seleccionó una única colonia y se extendió a placas YEP que contenían los mismos antibióticos y se incubó a 28 °C durante 1 - 2 días.

Cultivo de *Agrobacterium* y co-cultivo. Las colonias de *Agrobacterium* se tomaron de la placa YEP, se suspendieron en 10 mL de medio de infección en un tubo desechable de 50 mL, y se ajustó la densidad celular a una OD₆₀₀ nm de 0,2 - 0,4 utilizando un espectrofotómetro. Los cultivos de *Agrobacterium* se pusieron en un agitador rotatorio a 125 rpm, a temperatura ambiente, mientras se realizaba la disección del embrión. Se aislaron embriones zigóticos inmaduros de un tamaño de 1,5 a 2,4 mm, de los granos de maíz esterilizados y se colocaron en 1 mL del medio de infección y se lavaron una vez en el mismo medio. La suspensión de *Agrobacterium* (2 mL) se añadió a cada tubo y los tubos se colocaron en una plataforma de agitación durante 10 - 15 minutos. Los embriones se transfirieron a medios de co-cultivo (MS Salts, 4,33 g/L; L-prolina, 700,0 mg/L; myo-inositol, 100,0 mg/L; hidrolizado enzimático de caseína 100,0 mg/L; Dicamba-KOH 30 mM, 3,3 mg/L; sacarosa, 30,0 g/L; Gelzan™, 3,00 g/L; MS-Vitamina modificada [1000X], 1,00mL/L; 8,5 mg/mL AgNO₃, 15,0 mg/L; DMSO, 100 mM), orientados con el escutelo hacia arriba y se incubaron a 25 °C, a la luz 24 horas a 50 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de intensidad luminosa durante 3 días.

Selección de callos y regeneración de eventos putativos. Después del período de cocultivo, los embriones se transfirieron a medios de reposo (MS Salts, 4,33 g/L; L-prolina, 700,0 mg/L; 1,2,3,5/4,6-hexahidroxíciclohexano, 100 mg/L; MES [(ácido 2-(n-morfolino)-etanosulfónico), ácido libre] 0,500 g/mL; hidrolizado enzimático de caseína 100,0 mg/L; dicamba-KOH 30 mM, 3,3 mg/L; sacarosa, 30,0 g/L; Gelzan 2,30 g/L; MS-Vitamina modificada [1000X], 1,00mL/L; 8,5mg/ml AgNO₃, 15,0 mg/L; Carbenicilina, 250,0 mg/L) sin agente selectivo y se incubó bajo 24 horas de luz a 50 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa y a 25 °C durante 3 días.

Los experimentos de respuesta a la dosis de inhibición del crecimiento sugirieron que las concentraciones de glifosato de 0,25 mM y superiores eran suficientes para inhibir el crecimiento celular en la línea de maíz B104 no transformada. Los embriones se transfirieron a un medio de Selección 1 que contenía glifosato 0,5 mM (sales de MS, 4,33 g/L; L-prolina, 700,0 mg/L; myo-inositol, 100,0 mg/L; MES [ácido 2-(n-morfolino)-etanosulfónico), ácido libre] 0,500 g/L; hidrolizado enzimático de caseína 100,0 mg/L; Dicamba-KOH 30 mM, 3,3 mg/L; sacarosa, 30,0 g/L; Gelzan™ 2,30 g/L; MS-vitamina modificada [1000X], 1,00mL/L; 8,5mg/ml AgNO₃, 15,0 mg/L; Carbenicilina, 250,0 mg/L) e incubados en luz oscura y/o bajo 24 horas a 50 $\text{mmoles m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de intensidad luminosa por 7 -14 días a 28 °C.

Los callos embriogénicos en proliferación se transfirieron a medios de Selección 2 que contenían glifosato 1,0 mM (sales de MS, 4,33 g/L; 1,2,3,5/4,6-hexahidroxíciclohexano, 100 mg/L; L-prolina, 700,0 mg/L; MES [(ácido 2-(n-morfolino) etanosulfónico), ácido libre] 0,500 g/L; caseína hidrolizada enzimática 100,0 mg/L; dicamba-KOH 30 mM, 3,3 mg/L; sacarosa, 30,0 g/L Gelzan™ 2,30 g/L; MS-Vitamina modificada [1000X], 1,00mL/L; 8,5mg/mL AgNO₃, 15,0 mg/L; Carbenicilina, 250,0 mg/L; R-Haloxifop ácido 0,1810 mg/L), y se incubaron en la oscuridad y/o bajo luz de 24 horas a 50 $\text{mmoles m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de intensidad luminosa durante 14 días a 28 °C. Esta fase de selección permitió que el callo transgénico proliferara y se diferenciara aún más. El período de selección de callos duró de tres a cuatro semanas.

Los callos proliferantes y embriogénicos se transfirieron a medios PreReg que contenían glifosato 0,5 mM (MS Salts, 4,33 g/L; 1,2,3,5/4,6-hexahidroxíciclohexano, 100 mg/L; L-prolina, 350,0 mg/L; MES [(ácido 2-(n-morfolino)-etanosulfónico), ácido libre] 0,250 g/L; hidrolizado enzimático de caseína 50,0 mg/L; NAA-NaOH 0,500 mg/L; ABA-EtOH 2,50 mg/L; BA 1,00 mg/L; sacarosa, 45,0 g/L; Gelzan™ 2,50 g/L; MS-Vitamina modificada [1000X], 1,00mL/L; 8,5mg/ml AgNO₃, 1,00 mg/L; carbenicilina, 250,0 mg/L) y se cultivaron bajo luz de 24 horas a 50 $\text{mmoles m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ de intensidad luminosa durante 7 días a 28 °C.

Los callos embriogénicos con yemas similares a brotes se transfirieron a un medio de regeneración que contenía glifosato 0,5 mM (MS Salts, 4,33 g/L; 1,2,3,5/4,6-hexahidroxíciclohexano, 100,0 mg/L; sacarosa, 60,0 g/L; Gellan Gum G434™ 3,00 g/L; MS-Vitamina modificada [1000X], 1,00mL/L; carbenicilina, 125,0 mg/L) y se cultivó a la luz 24 horas a 50 $\text{mmoles m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de intensidad luminosa durante 7 días.

Los brotes pequeños con raíces primarias se transfirieron a medios de enraizamiento (MS Salts, 4,33 g/L; MS-

Vitamina modificada [1000X], 1,00mL/L; 1,2,3,5/4,6-hexahidrox ciclohexano, 100 mg/L; sacarosa, 60,0 g/L; Gellan Gum G434™ 3,00 g/L; carbenicilina, 250,0 mg/L) en fitobandejas y se incubaron durante 16/8 horas de luz/oscuridad a 140-190 mmol m⁻² seg⁻¹ de intensidad luminosa durante 7 días a 27 °C. Las plantas transgénicas putativas se analizaron para determinar el número de copias del transgén utilizando los protocolos descritos anteriormente y se transfirieron a la tierra.

Confirmación molecular de la presencia de los transgenes *dgt-28* y *aad-1* dentro de las plantas de maíz. La presencia de las secuencias de polinucleótidos *dgt-28* y *aad-1* se confirmó mediante ensayos de sonda de hidrólisis. Las plantas de maíz T₀ aisladas se seleccionaron inicialmente mediante un ensayo de sonda de hidrólisis, análogo a TAQMAN™, para confirmar la presencia de los transgenes *aad-1* y *dgt-28*. Los datos generados por estos estudios se utilizaron para determinar el número de copias del transgén y se utilizaron para seleccionar eventos de maíz transgénico para el cruce y avance hacia la generación T₁.

Se recogieron muestras de tejido en placas de 96 pocillos, se realizó la maceración de tejido con un pulverizador de tejido KLECO™ y perlas de acero inoxidable (Hoover Precision Products, Cumming, GA), en tampón Qiagen™ RLT. Después de la maceración del tejido, el ADN genómico se aisló en un formato de alto rendimiento utilizando el *kit* Biosprint 96™ Plant (Qiagen, Germantown, MD) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. El ADN genómico se cuantificó mediante el *kit* de ensayo de ADN Pico Green de Quant-IT™ (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADN genómico cuantificado se ajustó a aproximadamente 2 ng/μL para el ensayo de sonda de hidrólisis utilizando un manipulador automático de líquidos BIOROBOT3000™ (Qiagen, Germantown, MD). La determinación del número de copias de transgénicos mediante un ensayo de sonda de hidrólisis, análogo al ensayo TAQMAN®, se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando el sistema LIGHTCYCLER®480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Se diseñaron ensayos para *aad-1*, *dgt-28* y un gen de referencia interno Invertase (Genbank Número de Registro: U16123.1) utilizando el Software de Diseño de Sonda LIGHTCYCLER® 2.0. Para la amplificación, se preparó la mezcla maestra de sondas LIGHTCYCLER®480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) a una concentración final de 1X en una reacción multiplex de 10 μL de volumen que contiene 0,4 μM de cada cebador para *aad-1* y *dgt-28* y 0,2 μM de cada sonda (Tabla 17).

Se realizó una reacción de amplificación en dos etapas con una extensión a 60 °C durante 40 segundos con adquisición de fluorescencia. Todas las muestras se analizaron y los valores promedio de umbral de ciclo (Ct) se utilizaron para el análisis de cada muestra. El análisis de los datos de PCR en tiempo real se realizó con el software LightCycler® versión 1.5 usando el módulo de cuantificación relativa y se basa en el método ΔΔCt. Los controles incluyeron una muestra de ADN genómico de un calibrador de copia única y dos verificaciones de copia conocidas que se incluyeron en cada ejecución. La Tabla 18 enumera los resultados de los ensayos de sonda de hidrólisis.

Tabla 17. Secuencias de cebador y sonda utilizadas para el ensayo de la sonda de hidrólisis de *aad-1*, *dgt-28* y referencia interna (Invertasa).

Nombre del oligonucleótido	Gen detectado	SEQ ID NO:	Secuencia Oligo
GAAD1F	cebador directo <i>aad-1</i>	58	TGTTCCGGTTCCTCTACCAA
GAAD1P	sonda <i>aad-1</i>	59	CACAGAACCCTCGCTTCAGCAACA
GAAD1R	cebador inverso <i>aad-1</i>	60	CAACATCCATCACCTTGACTGA
Sonda IV	sonda Invertasa	61	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTAC
IVF-Taq	cebador directo de invertasa	62	TGGCGGACGACGACTTGT
IVR-Taq	cebador inverso de invertasa	63	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
zmDGT28 F	cebador directo de <i>dgt-28</i>	64	TTCAGCACCCGTCAGAAT
zmDGT28 FAM	sonda <i>dgt-28</i>	65	TGCCGAGAACTTGAGGAGGT
zmDGT28 R	cebador inverso <i>dgt-28</i>	66	TGGTCGCCATAGCTTGT

Tabla 18. Copiar resultados de cantidades para eventos de *dgt-28*. Los eventos de bajo número de copias consistían en 1-2 copias transgénicas, números de copia única se listan entre paréntesis. Los eventos de alto número de copias contenían 3 o más copias transgénicas.

Plásmido utilizado para la transformación	Nº de eventos de bajo número de copias (copia única)	Nº de eventos de alto número de copias (copia única)
pDAB107663	43 (31)	10
pDAB107664	30 (24)	5
pDAB107665	40 (27)	10
pDAB107666	24 (12)	12
pDAB109812	2 (1)	0
pDAB101556	25 (15)	10
pDAB107698	3 (1)	2

5 Ejemplo 11: Tolerancia al herbicida en maíz transformado con *dgt-28*.

Se dejó que los eventos de transformación *dgt-28* de *Zea mays* (T₀) se aclimataran en el invernadero y se cultivaron hasta que las plantas pasaron del cultivo de tejidos a las condiciones de crecimiento en invernadero (es decir, 2-4 hojas nuevas de aspecto normal habían emergido del verticilo). Las plantas se cultivaron a 27 °C bajo condiciones de 16 horas de luz:8 horas de oscuridad en el invernadero. Las plantas se trataron luego con formulaciones comerciales de DURANGO DMA™ (que contiene el herbicida glifosato) con la adición de 2% p/v de sulfato amónico. Las aplicaciones de herbicidas se realizaron con un pulverizador de oruga a un volumen de pulverización de 187 L/ha, 50 cm de altura de pulverización. Las plantas T₀ se rociaron con un intervalo de glifosato de 280 a 4.480 g ae/ha de glifosato, que es capaz de dañar significativamente las líneas de maíz no transformadas. Una dosis letal se define como la tasa que causa > 95% de daño a la endogamia B104.

15 Los resultados de las plantas de maíz T₀ *dgt-28* demostraron que la tolerancia al glifosato se conseguía a velocidades de hasta 4.480 g ae/ha. Se usó un tipo de medio específico en la generación T₀. La atrofia mínima y el crecimiento vegetal global de las plantas transformadas en comparación con los controles no transformados demostraron que *dgt-28* proporciona una tolerancia alta al glifosato cuando se unen a los péptidos de tránsito al cloroplasto TraP5, TraP8 y TraP23.

20 Las plantas T₀ seleccionadas se autofertilizan o se retrocruzan para una mayor caracterización en la próxima generación. 100 líneas de *dgt-28* elegidas que contienen las plantas T₁ se pulverizan con 140-1.120 g ae/ha de glufosinato o 105-1680 g ae/ha de glifosato. Tanto el marcador seleccionable como el gen resistente al glifosato se construyen en el mismo plásmido. Por tanto, si se selecciona un gen tolerante al herbicida rociando con el herbicida, se cree que ambos genes están presentes. A los 14 DAT, se cuentan las plantas resistentes y sensibles para determinar el porcentaje de líneas que se segregaron como un solo locus, rasgo mendeliano dominante (3R: 1S) según se determina por el análisis de Chi cuadrado. Estos datos demuestran que *dgt-28* es heredable como gen de resistencia robusta a glifosato en una especie monocot. Se aplican mayores tasas de glifosato a los sobrevivientes de T₁ o F₁ para caracterizar aún más la tolerancia y protección proporcionada por el gen *dgt-28*.

30 Tolerancia al herbicida post-emergencia en el maíz T₀ transformado con *dgt-28*. Los eventos T₀ de *dgt-28* vinculados con TraP4, TraP5, TraP8 y TraP23 se generaron mediante transformación con *Agrobacterium* y se les permitió aclimatarse en condiciones de cámara de crecimiento controlada hasta que emergieron 2-4 hojas nuevas de aspecto normal. A las plantas se les asignaron números de identificación individuales y se tomaron muestras para los análisis del número de copias de *dgt-28* y *aad-1*. Basándose en los análisis del número de copias, las plantas se seleccionaron para los análisis de expresión de proteínas. Las plantas se trasplantaron en macetas más grandes con medios de cultivo nuevos y se cultivaron a 27 °C bajo 16 horas de luz: 8 horas de oscuridad en el invernadero. Las plantas restantes que no fueron muestreadas para la expresión de proteínas se trataron después con formulaciones comerciales de DURANGO DMA™ (glifosato) con la adición de 2% p/v de sulfato amónico. Los tratamientos se distribuyeron de manera que cada agrupación de plantas contenía eventos T₀ de número de copias variable. Las aplicaciones de herbicidas se realizaron con un pulverizador de oruga a un volumen de pulverización de 187 L/ha, altura de rociado 50 cm. Las plantas T₀ se pulverizaron con un intervalo de glifosato de 280-4480 g ae/ha de glifosato capaz de causar una lesión significativa en líneas de maíz no transformadas. Una dosis letal se define como la tasa que provoca > 95% de daño a la endogamia B104. B104 fue el fondo genético de los transformantes.

40 Los resultados de las plantas de maíz T₀ *dgt-28* demuestran que se alcanzó la tolerancia al glifosato hasta 4.480 g ae/ha. **Tabla 19.** La atrofia mínima y el crecimiento vegetal de las plantas transformadas en comparación con los

controles no transformados demostraron que *dgt-28* proporciona una protección robusta al glifosato cuando se vincula a TraP5, TraP8 y TraP23.

Tabla 19. Respuesta de eventos T₀ *dgt-28* de números de copias variables a tasas de glifosato que se encuentran en el intervalo de 280 a 4.480 g ae/ha + 2,0% p/v de sulfato amónico 14 días después del tratamiento.

TraP4 <i>dgt-28</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
280 g ae/ha	5	0	0	1,0	2,2	0 - 5
560 g ae/ha	6	0	0	2,0	4,0	0 - 10
1120 g ae/ha	12	0	0	1,3	3,1	0 - 10
2240 g ae/ha	7	0	0	1,7	4,5	0 - 12
4480 g ae/ha	7	0	0	1,1	3,0	0 - 8
TraP8 <i>dgt-28</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	6	0	0	0,0	0,0	0
280 g ae/ha	5	1	0	6,7	8,8	0 - 20
560 g ae/ha	0	2	0	20,0	0,0	20
1120 g ae/ha	7	0	0	1,4	2,4	0 - 5
2240 g ae/ha	3	1	0	7,5	15,0	0 - 30
4480 g ae/ha	6	0	0	1,7	4,1	0 - 10
TraP23 <i>dgt-28</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	6	0	0	0,8	2,0	0 - 5
280 g ae/ha	7	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1,3	2,5	0 - 5
1120 g ae/ha	10	2	0	3,3	7,8	0 - 20
2240 g ae/ha	6	0	0	1,3	3,3	0 - 8
4480 g ae/ha	6	1	0	4,3	7,9	0 - 20
TraP5 <i>dgt-28</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
280 g ae/ha	7	1	0	5,0	14,1	0 - 40
560 g ae/ha	8	0	0	0,6	1,8	0 - 5
1120 g ae/ha	7	1	0	5,0	14,1	0 - 40
2240 g ae/ha	8	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	8	0	0	0,0	0,0	0

Los análisis de expresión de proteínas por ELISA estándar demostraron un intervalo medio de proteína DGT-28 de 12,6 a 22,5 ng/cm² a través de los constructos probados.

Confirmación de la tolerancia al glifosato en la generación F1 bajo condiciones de invernadero. Las plantas T₀ de una sola copia que no fueron pulverizadas se retrocruzaron al fondo B104 no transformado para una caracterización adicional en la generación siguiente. En la generación T₁, se evaluó la tolerancia al glifosato para confirmar la herencia del gen *dgt-28*. Para las plantas T₁, se aplicó el herbicida ASSURE II™ (35 g ae/ha de quizalofop-metilo) en la fase de crecimiento V1 para seleccionar la proteína AAD-1. Tanto el marcador seleccionable como el gen de resistencia al glifosato se construyen en el mismo plásmido. Por tanto se cree que, si se selecciona un gen, ambos genes están presentes. Después de 7 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles y se eliminaron las plantas nulas de la población. Estos datos demuestran que *dgt-28* (v1) es heredable como gen firme de resistencia al glifosato en una especie monocotiledónea. Se tomaron muestras de las plantas para la caracterización de la proteína DGT-28 por ELISA estándar y del nivel de transcripción de ARN. Las plantas resistentes se pulverizaron con 560-4.480 g ae/ha de glifosato como se describió con anterioridad. Los datos demuestran una tolerancia alta de *dgt-28* vinculado con los péptidos de tránsito al cloroplasto TraP4, TraP5, TraP8 y TraP23 hasta 4480 g ae/ha de glifosato. **Tabla 20.**

Tabla 20. Respuesta de eventos de *dgt-28* de copia única F1 a tasas de glifosato que varían de 560 a 4.480 g ae/ha + 2,0% p/v de sulfato amónico, 14 días después del tratamiento.

B104/TraP4 :: <i>dgt-28</i>				% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	9,0	1,2	8 - 10
2240 g ae/ha	4	0	0	2,5	2,9	0 - 5
4480 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
B104/TraP8 :: <i>dgt-28</i>				% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1,3	2,5	0 - 5
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	5,0	4,1	0 - 10
4480 g ae/ha	4	0	0	6,3	2,5	5 - 10
B104/TraP23 :: <i>dgt-28</i>				% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	3	1	0	10,0	10,0	5 - 25
1120 g ae/ha	2	2	0	18,8	11,8	10 - 35
2240 g ae/ha	4	0	0	12,5	2,9	10 - 15
4480 g ae/ha	3	1	0	10,0	7,1	5 - 20
B104/TraP5 :: <i>dgt-28</i>				% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	8,0	0,0	8

1120 g ae/ha	4	0	0	11,3	3,0	8 - 15
2240 g ae/ha	4	0	0	12,5	2,9	10 - 15
4480 g ae/ha	4	0	0	10,0	2,5	10 - 15
B104 no transformado	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. Estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
1120 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100

Los datos de expresión de proteínas demuestran un intervalo de proteína DGT-28 medio de 42,2 a 88,2 ng/cm² a través de los eventos T₁ y constructos probados, estableciendo la expresión de proteínas en la generación T₁.

- 5 Caracterización de maíz *dgt-28* bajo condiciones de campo. Se enviaron eventos T₁ de copia única a una ubicación de campo para crear semillas híbridas hemigotas y consanguíneas homocigotas para una caracterización adicional. Las semillas híbridas se crearon cruzando eventos T₁ en la línea de transformación B104 del maíz a la línea 4XP811 consanguínea generando poblaciones híbridas que segregan 1: 1 (hemigóticas: nula) para el evento. Las semillas resultantes se enviaron a 2 ubicaciones separadas. Se plantó un total de cinco eventos de copia única por constructo en cada ubicación en un diseño de bloques completos al azar por triplicado. Los campos fueron diseñados para que las aplicaciones de glifosato se produjesen en la fase de crecimiento V4 y en un grupo separado de plantas, para aplicarse en la etapa de crecimiento V8. El híbrido convencional 4XP811/B104 se utilizó como control negativo.

- 10 Las filas experimentales se trataron con 184 g ae/ha de ASSURE II™ (106 g ai/L de quizalofop-metilo) para eliminar los segregantes nulos. Todas las entradas experimentales se segregaron 1:1 (sensible: resistente) (p = 0,05) con respecto a la aplicación de ASSURE II™. Se tomaron muestras de plantas resistentes seleccionadas de cada evento para la cuantificación de la proteína DGT-28 mediante ELISA estándar.

- 15 Las plantas resistentes a quizalofop-metilo fueron tratadas con el herbicida comercial DURANGO DMA™ (480 g ae/L de glifosato) con la adición de 2,5% p/v de sulfato amónico en cualquiera de las etapas de crecimiento V4 o V8. Las aplicaciones de herbicida se realizaron con una barra pulverizadora calibrada para suministrar un volumen de 187 L/ha, altura de pulverización de 50 cm. Las plantas se rociaron con un intervalo de glifosato de 1.120 a 4.480 g ae/ha, capaz de causar una lesión significativa en líneas de maíz no transformadas. Una dosis letal se define como la tasa que produce > 95% de daño a la endogamia 4XP811. Se realizaron evaluaciones de lesiones visuales para el porcentaje de clorosis visual, porcentaje de necrosis, porcentaje de inhibición del crecimiento y lesión visual total a los 7, 14 y 21 DAT (días después del tratamiento). Las evaluaciones se compararon con los controles no tratados para cada línea y los controles negativos.

- 25 Los datos de lesión visual para todos los programas de tiempos de evaluación demostraron una tolerancia alta de hasta 4.480 g ae/ha de DURANGO DMA™ en ambas ubicaciones y tiempos de aplicación. Los eventos representativos para la aplicación V4 se presentan desde una ubicación y son consistentes con otros eventos, tiempos de aplicación y ubicaciones. **Tabla 21.** Un evento del constructo que contiene *dgt-28* vinculado con TraP23 (pDAB107665) fue tolerante a la selección de ASSURE II™ para la proteína AAD-1, pero fue sensible a todas las tasas de glifosato aplicadas.

Tabla 21. Respuesta de los eventos *dgt-28* aplicados con un intervalo de glifosato de 1.120-4.480 g ae/ha + 2,5% p/v de sulfato amónico en la fase de crecimiento V4.

4XPB11//B104/TraP4 :: <i>dgt-28</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0

4XPB11//B104/TraP8 :: dgt-28	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4XPB11//B104/TraP23 :: dgt-28	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4XPB11//B104/TraP5 :: dgt-28	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4XPB11//B104 no transformado	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100

Se realizaron evaluaciones adicionales durante la fase de crecimiento reproductivo para la tasa de glifosato de 4.480 g ae/ha. Las evaluaciones visuales de las panículas, el tiempo de polinización y el relleno de la mazorca fueron similares a los controles no tratados de cada línea para todos los constructos, tiempos de aplicación y ubicaciones.

5 Los resultados de la cuantificación de la proteína DGT-28 demostraron un intervalo de expresión media de proteínas de 186,4 a 303,0 ng/cm². Los datos demuestran una tolerancia alta del maíz transformado con *dgt-28* en condiciones de campo a través de las etapas de crecimiento reproductivo hasta 4.480 g ae/ha de glifosato. Los datos también demostraron la detección de la proteína DGT-28 y la función basada en los resultados de tolerancia a la pulverización.

Confirmación de la heredabilidad y tolerancia del maíz *dgt-28* en el estado homocigótico. Las semillas del T₁S₂ se plantaron bajo las condiciones de invernadero como se describió anteriormente. Las mismas cinco líneas de copia única que se caracterizaron bajo las condiciones de campo se caracterizaron en el estado homogéneo. Las plantas se cultivaron hasta la fase de crecimiento V3 y se separaron en tres tasas de glifosato en el intervalo entre 1.120 y 4.480 g ae/ha de glifosato (DURANGO DMA™) y cuatro replicados por tratamiento. Las aplicaciones se realizaron con un pulverizador de oruga como se describió anteriormente y se formularon en 2,0% p/v de sulfato amónico. Una aplicación de sulfato amónico sirvió como verificación no tratada para cada línea. Se realizaron evaluaciones visuales 7 y 14 días después del tratamiento como se describió anteriormente. Los datos demostraron una tolerancia alta de hasta 4.480 g ae/ha de glifosato para todos los eventos probados. **Tabla 22.**

10

15

Tabla 22. Respuesta de eventos homocigóticos *dgt-28* aplicados con un intervalo de glifosato de 1.120-4.480 g ae/ha + 2,0% p/v de sulfato amónico.

TraP4 :: <i>dgt-28</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	3,8	2,5	0 - 5
4480 g ae/ha	4	0	0	14,3	1,5	12 - 15
TraP8 :: <i>dgt-28</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	9,0	1,2	8 - 10
4480 g ae/ha	4	0	0	11,3	1,5	10 - 15
TraP23 :: <i>dgt-28</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	4,5	3,3	0 - 8
2240 g ae/ha	4	0	0	7,5	2,9	5 - 10
4480 g ae/ha	4	0	0	15,0	0,0	15
TraP5 :: <i>dgt-28</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	1,3	2,5	0 - 5
2240 g ae/ha	4	0	0	9,0	2,0	8 - 12
4480 g ae/ha	4	0	0	15,0	2,4	12 - 18
B104 no transformado	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	4	100,0	0,0	100
2240 g ae/ha	4	0	4	100,0	0,0	100
4480 g ae/ha	4	0	4	100,0	0,0	100

La línea de pDAB107665 que no era tolerante en condiciones de campo no presentó tolerancia al glifosato y, por tanto, es consistente con las observaciones de campo (datos no mostrados). Con la excepción de la línea mencionada anteriormente, todas las réplicas que fueron tratadas con glifosato a partir de las líneas fueron no sensibles al glifosato. Por tanto, los datos demuestran la heredabilidad a una población homogénea de maíz *dgt-28* de manera mendeliana. La expresión de la proteína DGT-28 mediante ELISA estándar demostró un intervalo de expresión de proteína media de 27,5 a 65,8 ng/cm² en eventos de copia única que eran tolerantes al glifosato. Los datos demuestran la proteína funcional y la estabilidad de la proteína DGT-28 a través de generaciones.

Ejemplo 12: Uso de tolerancia al herbicida post-emergencia del glifosato como marcador seleccionable.

Como se describió con anterioridad, las plantas transformadas con T₀ se trasladaron del cultivo de tejidos y se aclimataron en el invernadero. Los eventos ensayados contenían *dgt-28* enlazado a péptidos de tránsito al cloroplasto TraP5, TraP8 y TraP23. Se demostró que estas plantas T₀ proporcionaron una tolerancia alta de hasta 4.480 g ae/ha

de glifosato, y las plantas no transformadas se controlaron con glifosato a concentraciones tan bajas como 280 g ae/ha. Estos datos demuestran que *dgt-28* puede utilizarse como marcador seleccionable utilizando una concentración de glifosato que varía de 280 a 4480 g ae/ha.

- Una serie de semillas de líneas de maíz fijadas que contienen el transgén *dgt-28* se añaden a una serie de semillas de maíz no transformadas. Las semillas se plantan y se dejan crecer hasta la etapa de desarrollo V1-V3, momento en el cual las plántulas se rocían con una dosis selectiva de glifosato en el intervalo de 280 a 4480 g ae/ha. Después de 7-10 días, se cuentan las plantas sensibles y las resistentes, y la cantidad de plantas tolerantes al glifosato se correlaciona con el número original de semillas transgénicas que contiene el transgén *dgt-28* que se plantaron.

Ejemplo 13: Apilamiento de maíz *dgt-28*.

- La proteína AAD-1 se usa como el marcador seleccionable en el maíz transformado *dgt-28* con fines de investigación. El gen *aad-1* se puede también utilizar como un rasgo tolerante a los herbicidas en el maíz para proporcionar una robusta tolerancia de 2,4-D hasta una aplicación de V8 en un cultivo. Cuatro eventos de los constructos pDAB107663 (TraP4 :: *dgt-28*), pDAB107664 (TraP8 :: *dgt-28*) y pDAB107666 (TraP5 :: *dgt-28*) se caracterizaron por la tolerancia de una aplicación de mezcla de tanque de glifosato y 2,4-D. El estudio de caracterización se completó con semillas F1 bajo condiciones de invernadero. Las aplicaciones se realizaron en un pulverizador de oruga como se describió anteriormente a las tasas siguientes: 1.120-2.240 g ae/ha de glifosato (selectivo para el gen *dgt-28*), 1.120-2.240 g ae/ha 2,4-D (selectivo para el gen *aad-1*), o una mezcla de tanque de los dos herbicidas a las tasas descritas. Las plantas eran calificadas a los 7 y 14 DAT. Los resultados de la pulverización para aplicaciones de los herbicidas a 2.240 g ae/ha se muestran en la **Tabla 23**.
- Tabla 23.** Respuesta de F1 *aad-1* y *dgt-28* maíz pulverizado con 2240 g ae/ha de 2,4-D, glifosato y una combinación de mezcla de los dos herbicidas 14 días después del tratamiento.

Evento de F1	2240 g ae/ha 2,4-D		2240 g ae/ha glifosato		2240 g ae/ha 2,4-D + 2240 g ae/ha glifosato	
	Media de % lesiones	Desv. estándar	Media de % lesiones	Desv. estándar	Media de % lesiones	Desv. estándar
107663 [3] - 012.AJ001	5,0	4,1	3,8	4,8	8,8	3,0
107663 [3] - 029.AJ001	2,5	5,0	1,3	2,5	5,0	5,8
107663 [3] - 027.AJ001	2,5	2,9	11,8	2,9	13,8	2,5
107663 [3] - 011.AJ001	3,8	2,5	11,5	1,0	12,8	1,5
B104	27,5	17,7	100,0	0,0	100,0	0,0

- Los resultados confirman que *dgt-28* puede apilarse con éxito con *aad-1*, aumentando así el espectro de herbicidas que se pueden aplicar al cultivo de interés (glifosato + ácidos fenoxiacéticos para *dgt-28* y *aad-1*, respectivamente).
- En la producción de cultivos en donde existen malezas de hoja ancha difíciles de controlar o biotipos de malezas resistentes, la pila se puede utilizar como medio de control de malezas y protección del cultivo de interés. Los rasgos de entrada o salida adicionales también se pueden apilar con el gen *dgt-28* en el maíz y en otras plantas.

Ejemplo 14: Transformación de otros cultivos

- Otros cultivos se transforman utilizando técnicas conocidas. Para la transformación de centeno mediada por *Agrobacterium*, véase p. ej. Popelka J. C., Xu J, Altpeter F., "Generation of rye with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of (*Secale cereale* L.) plants instantly marker-free transgenic rye", Transgenic Res. 2003 Oct; 12 (5): 587 - 96.). Para la transformación de sorgo mediada por *Agrobacterium*, véase, p. ej., Zhao et al., "Agrobacterium mediated sorghum transformation", Plant Mol. Biol. Dec. 2000; 44 (6): 789 - 98. Para la transformación de cebada mediada por *Agrobacterium*, véase, p. ej., Tingay et al., "Agrobacterium tumefaciens-mediated barley transformation", The Plant Journal, (1997) 11: 1369 - 1376. Para la transformación del trigo mediada por *Agrobacterium*, véase, p. ej., Cheng et al., "Genetic Transformaton of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*", Plant Physiol. 1997 Nov; 115 (3): 971 - 980. Para la transformación del arroz mediada por *Agrobacterium*, véase p.ej. Hiei et al., "Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*", Plant Mol. Biol. Sept 1997; 35 (1-2): 205 - 18.

Otras técnicas de transformación (no *Agrobacterium*) se utilizan para transformar *dgt-28*, *dgt-32* o *dgt-33*, por ejemplo, en Maíz (*Zea mays*), Trigo (*Triticum spp.*), Arroz (*Oryza spp.* y *Zizania spp.*), Cebada (*Hordeum spp.*), Algodón (*Abroma augusta* y *Gossypium spp.*), Soja (*Glycine max*), Azúcar y remolacha (*Beta spp.*), Caña de azúcar (*Arenga pinnata*), Tomate (*Lycopersicon esculentum*) y otras especies, *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* y otras especies, y *Cyphomandra betacea*, Patatas (*Solanum tuberosum*), batatas (*Ipomoea batatas*), Centeno (*Secale spp.*), Pimientos (*Capsicum annuum*, *chinense* y *frutescens*), Lechuga (*Lactuca sativa*, *perennis* y *pulchella*), Col (*Brassica spp.*), Apio (*Apium graveolens*), Berenjena (*Solanum melongena*), Maní (*Arachis hypogea*), Sorgo (*Sorghum spp.*), Alfalfa (*Medicago sativa*), Zanahoria (*Daucus carota*), Frijoles (*Phaseolus spp.* y otros géneros), Promed.na (*Promed.na sativa* y *strigosa*), Guisantes (*Pisum*, *Vigna* y *Tetragonolobus spp.*), Girasol (*Helianthus annuus*), Calabaza (*Cucurbita spp.*), Pepino (*Cucumis sativa*), Tabaco (*Nicotiana spp.*), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Césped (*Lolium*, *Agrostis*, *Poa*, *Cynodon* y otros géneros), Trébol (*Trifolium*), Algarroba (*Vicia*).

La resistencia al glifosato conferida por *dgt-28*, *dgt-32* y *dgt-33* incrementa la aplicabilidad de los herbicidas de glifosato para uso en temporada en muchos sistemas de cultivo de madera de hoja caduca y de hoja perenne. Las especies maderables resistentes al herbicida de glifosato aumentan la flexibilidad del uso excesivo de estos herbicidas sin problemas de lesiones. Así, *dgt-28*, *dgt-32* y/o *dgt-33* se transforman en especies maderables: aliso (*Alnus spp.*), fresno (*Fraxinus spp.*), álamo y chopo (*Populus spp.*), haya (*Fagus spp.*), abedul (Kspp.), cerezo (*Prunus spp.*), eucalipto (*Eucalyptus spp.*), nogal (*Carya spp.*), arce (*Acer spp.*), roble (*Quercus spp.*) y pino (*Pinus spp.*).

La resistencia al herbicida del glifosato aumenta la aplicabilidad de los herbicidas del glifosato para el control selectivo de malezas en especies ornamentales y frutales. Así, *dgt-28*, *dgt-32* y/o *dgt-33* se transforman en las especies ornamentales y frutales: rosa (*Rosa spp.*), arbusto ardiente (*Euonymus spp.*), petunia (*Petunia spp.*), begonia (*Begonia spp.*), rododendro (*Rhododendron spp.*), manzano (*Malus spp.*), pera (*Pyrus spp.*), melocotón (*Prunus spp.*) y caléndulas (*Tagetes spp.*).

Ejemplo 15: Apilamiento con otros rasgos.

Los cultivos transgénicos que contienen rasgos de resistencia a insectos (IR) prevalecen en las plantas de maíz, soja y algodón en toda América del Norte, y el uso de estos rasgos se está expandiendo a todo el mundo. Muchas empresas productoras de semillas han desarrollado cultivos transgénicos comerciales que combinan rasgos resistentes a los insectos y tolerantes a los herbicidas (HT). Estos incluyen rasgos de *Bacillus thuringiensis* (p. ej. toxinas Bt listadas en el sitio web lifesci.sussex.ac.uk, 2006), rasgos de resistencia a insectos no Bt y cualquiera o todos los rasgos HT mencionados anteriormente. La capacidad de controlar múltiples problemas de plagas a través de los rasgos de IR es un valioso concepto de producto comercial. Sin embargo, la conveniencia de este concepto de producto se restringirá si el control de malezas y el control de insectos son independientes entre sí.

Dgt-28, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33*, solos o apilados con uno o más rasgos de HT adicionales, se apilan con uno o más rasgos de entrada adicionales (por ejemplo, resistencia a insectos, resistencia a hongos, o tolerancia al estrés, et al. (véase www.isb.vt.edu), ya sea a través de la crianza convencional o conjuntamente como un nuevo evento de transformación. El rasgo o los rasgos de IR se apilan con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33*. Al obtener una secuencia de codificación de un rasgo de IR, se agregan elementos de expresión (por ejemplo, promotor, intrón, 3'UTR, etc.) y el rasgo de IR se apila molecularmente con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33* a través de metodologías de ADN recombinante.

Los rasgos de IR incluyen: CryIF (U.S. Pat. Nos. 5.126.133; 5.188.960; 5.691.308; 6.096.708; 6.573.240; y 6.737.273). Cry1A(c) (patentes de EE. UU. Nos. 6.114.138; 5.710.020; 6.251.656; y 6.229.004), CryIF y Cry1A(c) como una pila triple con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, o *dgt-33*, Cry34Ab(1) (patentes de EE. UU. Nos. 7.323.556; 7.897.342; 7.888.495; 7.875.430; 7.932.033; 7.956.246; 6.340.593). Cry35 Ab(1) (patentes de EE. UU. Nos. 6.340.593; 7.323.556; 7.897.342; 7.888.495; 7.875.430; 7.932.033; 7.956.246), y/o Cry35Ab(1) y Cry 34Ab(1) como triple pila con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* y/o *dgt-33*.

Los beneficios incluyen el control de malezas mejorado ofrecido por *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33*, y descrito en ejemplos anteriores, ligado a la capacidad de controlar plagas de insectos y/u otras tensiones agronómicas. Las plantas que comprenden dichos rasgos apilados con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* y/o *dgt-33* proporcionan un paquete agronómico completo de calidad del cultivo mejorada con la capacidad de controlar de manera flexible y económica cualquier número de problemas agronómicos. Los rasgos combinados de IR y HT tienen aplicación en la mayoría de los cultivos agronómicos y horticolas/ornamentales y forestales.

La combinación de *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33*, y la adecuada tolerancia al herbicida y resistencia a los insectos permitida por cualquiera del número de genes de IR Bt o no Bt se pueden aplicar a las especies de cultivo presentadas en este documento. El uso de cualquiera de los diversos herbicidas comerciales listados en este documento en tales cultivos se hace posible mediante la transformación de *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33* y el apilamiento con el correspondiente rasgo HT o rasgo IR, ya sea mediante crianza convencional o ingeniería genética. Las tasas de aplicación específicas de herbicidas representativos de estas químicas están determinadas por las etiquetas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Referencia de Protección de Cultivos) o compilación similar, etiquetas compiladas *on line* (por ejemplo, cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía comercial o académica de protección de cultivos, como la Guía de Protección de Cultivos de Agrilience (2005).

Ejemplo 16: Rasgo DGT apilado con un rasgo AAD en cualquier cultivo.

Apilando un rasgo *dgt* con un rasgo *aad* (por ejemplo, *aad-1* descrito en la patente de EE. UU. 7.838.733; o *aad-12* descrito en la Publicación de Patente Internacional PCT No. WO 2007/053482 A2), ya sea mediante crianza convencional o conjuntamente como nuevo evento de transformación, se han mejorado la eficacia del control de malezas, la flexibilidad y la capacidad para gestionar los cambios de malezas y el desarrollo de resistencia a herbicidas.

La transformación de cultivos con *aad-1* permite a un productor aplicar selectivamente herbicidas de ariloxialcanoato en cultivos de monocotiledóneas. Dichos cultivos de monocot tendrán un margen mayor de seguridad fenoxi auxina. Además, las fenoxi auxinas pueden aplicarse selectivamente en cultivos dicot transformados con *aad-1*. La transformación de cultivos con *aad-12* permite que un cultivador aplique selectivamente herbicidas de piridiloxiauxina y ariloxialcanoato en cultivos de dicot para controlar las especies de malezas. Al apilar *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33* con los rasgos *aad-1* o *aad-12*, se proporciona a los cultivadores un espectro más amplio de herbicidas para el manejo de malezas. Además, el uso de combinaciones de herbicidas da como resultado una mayor flexibilidad para la gestión de la resistencia a herbicidas dentro de las especies de malezas.

Se proporcionan las opciones siguientes de control de malezas para una planta en la que un rasgo *dgt* y un rasgo *aad* se apilan en cualquier especie de cultivo de monocot o dicot:

A. El glifosato se aplica a una tasa de aplicación post-emergente estándar (420 a 2.160 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1.120 g ae/ha) para el control de la mayoría de las especies de malezas herbáceas y de hoja ancha. Los rasgos *dgt* pueden proporcionar tolerancia a estas tasas de aplicación de glifosato. Para el control de malezas de hoja ancha resistentes al glifosato como *Conyza canadensis* o malezas inherentemente difíciles de controlar con glifosato (por ejemplo, *Commelina* spp), se aplica secuencialmente 280 - 2.240 g ae/ha (por ejemplo, 560 - 1120 g ae/ha) de 2,4 D en un tanque de mezcla, o como una premezcla con glifosato para proporcionar un control adicional. Tanto *aad-1* como *aad-12* proporcionan tolerancia a 2,4-D. Además, *aad-12* proporciona tolerancia a los herbicidas de piridiloxi auxina como triclopir y fluroxipir. Los herbicidas de piridiloxi auxina se aplican para controlar malezas de hoja ancha resistentes al glifosato como *Conyza canadensis* y *Commelina* spp. Para el triclopir, las tasas de aplicación suelen oscilar entre 70 - 1120 g ae/ha, por ejemplo 140 - 420 g ae/ha. Para el fluroxipir, las tasas de aplicación generalmente varían de 35 a 560 g ae/ha, por ejemplo, de 70 a 280 ae/ha.

B. El glifosato se aplica a una tasa de aplicación estándar postemergente (420 a 2.160 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1.120 g ae/ha) para el control de la mayoría de las especies de malezas de hoja ancha y gramíneas. Para el control de especies de gramíneas resistentes a glifosato como *Lolium rigidum* o *Eleusine indica*, se aplican de manera secuencial 10 - 200 g ae/ha (por ejemplo, 20 - 100 g ae/ha) de quizalofop, mezclado en tanque o como premezcla con glifosato para proporcionar control efectivo. *Aad-1* proporciona tolerancia al quizalofop. El apilamiento de *aad-1* en combinación con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33* en las especies de cultivos tiene como resultado cultivos que son tolerantes a los herbicidas descritos anteriormente.

C. El glifosato es eficaz en el control de especies de gramíneas distintas de las especies de malezas de hoja ancha. Los rasgos apilados *Aad-1* y *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33* permiten la aplicación de tasas de glifosato eficaces en gramíneas (105 - 840 g ae/ha, por ejemplo, 210 - 420 g ae). Luego se aplica secuencialmente 2,4-D (a 280 - 2240 g ae/ha, por ejemplo, 560 - 1120 g ae/ha), mezclado en tanque o como premezcla con tasas de glifosato eficaces en gramíneas, para proporcionar el control necesario de la maleza de hoja ancha. Se usa un herbicida AOPP similar al quizalofop a 10 - 200 g ae/ha (por ejemplo, 20 - 100 g ae/ha y 20 - 35 g ae/ha), para el control más firme de las malezas de gramíneas y/o para retrasar el desarrollo de gramíneas resistentes al glifosato. La baja tasa de glifosato también proporciona algún beneficio al control de malezas de hoja ancha; sin embargo, el control primario es a partir del 2,4-D.

D. Del mismo modo, los rasgos apilados *aad-12* y *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33* permiten la aplicación de tasas de glifosato eficaces para gramíneas (105 - 840 g ae/ha, por ejemplo, 210 - 420 g ae/ha). Luego, se aplica secuencialmente 2,4-D (a 280 - 2.240 g ae/ha, por ejemplo, 560 - 1.120 g ae/ha), mezclado en tanque o como una premezcla con tasas de glifosato eficaces en gramíneas para proporcionar el control necesario de la maleza de hoja ancha. El triclopir y el fluroxipir utilizados a las tasas mencionadas anteriormente también son componentes aceptables en el régimen de tratamiento. La baja tasa de glifosato también proporciona algún beneficio al control de malezas de hoja ancha; sin embargo, el control primario es del 2,4-D, triclopir o fluroxipir.

El uso de uno o más herbicidas de ariloxi auxina comerciales, solos o en combinación (secuencial o independientemente), se facilita mediante la transformación de *aad-12* en los cultivos. Del mismo modo, el uso de uno o más herbicidas de fenoxi auxina comerciales solos o en combinación (secuencial o independientemente) con uno o más herbicidas comerciales de AOPP es facilitado por *aad-1*. Apilar cualquiera de estos rasgos con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33* permite un manejo más firme de las especies de malezas. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de estas químicas están determinadas por las etiquetas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, etiquetas compiladas online (p. ej. cdms.net/manug/manuf.asp) o cualquier guía de protección de cultivos comercial o académica, tal como la Crop Protection Guide de Agrilience (2005).

Ejemplo 17: Rasgo DGT apilado con rasgo AHAS en cualquier cultivo.

Los rasgos que codifican la tolerancia al herbicida imidazolinona (AHAS) están actualmente presentes en varios cultivos plantados en América del Norte que incluyen, entre otros, maíz, arroz, girasol y trigo. Se han desarrollado otros cultivos tolerantes a la imidazolinona (por ejemplo, algodón y remolacha azucarera). Muchos herbicidas de imidazolinona (por ejemplo, imazamox, imazetapir, imazaquin, e imazapic) se usan actualmente de manera selectiva en varios cultivos convencionales. El uso de imazetapir, imazamox y el imazapyr no selectivo se ha facilitado a través de los rasgos de tolerancia a la imidazolinona similar a AHAS. Las HTC's tolerantes a la imidazolinona hasta la fecha tienen la ventaja de ser no transgénicas. Esta clase de química también tiene una actividad residual en el suelo significativa, por lo que puede proporcionar un control de malezas que se extiende más allá del tiempo de aplicación, a diferencia de los sistemas basados en glifosato o glufosinato. Sin embargo, el espectro de las malezas controladas por los herbicidas de imidazolinona no es tan amplio como el glifosato (Agrilience, 2003). Además, los herbicidas de imidazolinona tienen un modo de acción (inhibición de la acetolactato sintasa, ALS) al que muchas malezas han desarrollado resistencia (Heap I (2004). El estudio internacional de malezas resistentes a herbicidas, disponible en www.weedscience.com).

Dgt-28, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33* se apilan con un rasgo de tolerancia a la imidazolinona, ya sea a través de la reproducción convencional o conjuntamente como un evento de transformación novedoso, y se mejora la eficacia de control de las malezas, flexibilidad y capacidad para gestionar las tandas de malezas y el desarrollo de resistencia a los herbicidas.

Se proporcionan las siguientes opciones de control de malezas para una planta en la que un rasgo *dgt* y un rasgo de tolerancia a la imidazolinona se apilan en cualquier especie de cultivo monocot o dicot:

A. Se aplica Imazetapir a una tasa de aplicación estándar post-emergencia (35 a 280 g ae/ha, por ejemplo, 70 - 140 g ae/ha) para el control de muchas especies de malezas de hoja ancha y gramíneas.

i) Las malezas de hoja ancha resistentes a los inhibidores de ALS como *Amaranthus rudis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album* (entre otras, Heap, 2004) se controlan mediante la mezcla de glifosato en tanque a razón de 420 a 2.160 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1.120 g ae/ha.

ii) Las especies de hoja ancha intrínsecamente más tolerantes a los herbicidas de imidazolinona como *Ipomoea* spp. se controlan mezclando glifosato en tanque a 420 a 2.160 g ae/ha, por ejemplo 560 a 1.120 g ae/ha.

iii) Malezas de gramíneas resistentes al inhibidor de ALS como *Sorghum halepense* y *Lolium* spp. se controlan mezclando glifosato en tanque entre 420 y 2.160 g ae/ha, por ejemplo 560 a 1.120 g ae/ha.

iv) Las especies de malezas de gramíneas tolerantes intrínsecamente (p. ej. *Agropyron repens*) se controlan mezclando glifosato en tanque a 420 a 2.160 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1.120 g ae/ha.

El uso de cualquiera de varios herbicidas de imidazolinona o herbicidas de glifosato comerciales, solos o en combinaciones múltiples, se facilita mediante la transformación con *dgt-28* con *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33*, y se apila con cualquier rasgo de tolerancia a la imidazolinona, ya sea por crianza convencional o por ingeniería genética. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de estas químicas están determinadas por las etiquetas de herbicidas compiladas en el libro de CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, etiquetas compiladas online (por ejemplo cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía de protección de cultivos comercial o académica como la Crop Protection Guide de Agrilience (2005).

Ejemplo 18: Transformación de soja.

La soja transgénica (*Glycine max*) que contiene un transgén *dgt-28* integrado de forma estable se generó a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* de explantes de nódulos cotiledonarios de soja. Se utilizó una cepa de *Agrobacterium* desarmada que llevaba un vector binario que contenía un *dgt-28* funcional para iniciar la transformación.

La transformación mediada por *Agrobacterium* se llevó a cabo utilizando un procedimiento modificado de nudos semicotiledonarios de Zeng et al. (Zeng P., Vадnais D. A., Zhang Z., Polacco J. C., (2004), Plant Cell Rep., 22 (7): 478 - 482). Brevemente, las semillas de soja (cv. Maverick) se germinaron en medio basal y los nodos cotiledonarios se aislaron e infectaron con *Agrobacterium*. La iniciación de brotes, el alargamiento de los brotes y los medios de enraizamiento se suplementan con cefotaxima, timentina y vancomicina para la eliminación de *Agrobacterium*. Se empleó la selección a través de un herbicida para inhibir el crecimiento de brotes no transformados.

Los brotes seleccionados se transfirieron a un medio de enraizamiento para el desarrollo de la raíz y luego se transfirieron a la mezcla de suelo para la aclimatación de las plántulas.

Las láminas terminales de las plántulas seleccionadas se trataron tópicamente (técnica de pintura de hojas) con un

herbicida para detectar transformantes putativos. Las plántulas cribadas se transfirieron al invernadero, se dejaron aclimatar y luego se pintaron en hoja con un herbicida para reconfirmar la tolerancia. Se tomaron muestras de estas plantas T₀ putativas transformadas y se utilizaron análisis moleculares para confirmar la presencia del marcador seleccionable herbicida y el transgén *dgt-28*. Las plantas T₀ se dejaron autofertilizar en el invernadero para producir semilla T₁.

Se puede usar un segundo método de transformación de soja para producir plantas de soja transgénicas adicionales. Se usa una cepa de *Agrobacterium* desarmada que lleva un vector binario que contiene un *dgt-28* funcional para iniciar la transformación.

La transformación mediada por *Agrobacterium* se llevó a cabo utilizando un procedimiento *half-seed* (media semilla) modificado de Paz et al., (Paz M., Martínez J., Kalvig A., Fonger T. y Wang K., (2005) Plant Cell Rep., 25: 206 - 213). Brevemente, las semillas de soja maduras se esterilizaron durante la noche con gas cloro y se embebieron con H₂O estéril veinte horas antes de la transformación de la planta mediada por *Agrobacterium*. Las semillas se cortaron por la mitad con un corte longitudinal a lo largo del hilio para separar la semilla y quitar el tegumento de la misma. Se escindió el eje embrionario y se eliminó cualquier posible brote/yema del nudo cotiledonario. Los explantes de media semilla resultantes se infectaron con *Agrobacterium*. La iniciación de brotes, la elongación de brotes y el medio de enraizamiento se complementaron con cefotaxima, timentina y vancomicina para la eliminación de *Agrobacterium*. La selección herbicida se empleó para inhibir el crecimiento de brotes no transformados. Los brotes seleccionados se transfirieron al medio de enraizamiento para el desarrollo de la raíz y luego se transfirieron a la mezcla de suelo para la aclimatación de las plántulas.

Se tomaron muestras de plantas T₀ transformadas putativas y se usaron análisis moleculares para confirmar la presencia del marcador seleccionable y el transgén *dgt-28*. Se identificó que varios eventos contenían los transgenes. Estas plantas T₀ fueron avanzadas para el análisis adicional y se dejaron autofertilizar en el invernadero para dar lugar a semilla T₁.

Confirmación de la heredabilidad de *dgt-28* a la generación T₁. La heredabilidad de la proteína DGT-28 en la generación T₁ se evaluó en una de dos maneras. El primer método incluyó la siembra de semillas T₁ en medio Metro-mix y la aplicación de 411 g ae/ha de IGNITE™ 280 SL en plantas germinadas en la primera etapa de crecimiento trifoliado. El segundo método consistió en homogeneizar semillas para un total de 8 replicados usando un cojinete de bolas y un Geno/Grinder. Las pruebas de tiras ELISA para detectar la proteína PAT se utilizaron para detectar eventos hereditarios ya que el marcador seleccionable estaba en el mismo plásmido que *dgt-28*. Por cualquiera de los métodos, si una sola planta era tolerante al glufosinato o se detectaba con la prueba de tiras ELISA PAT, el evento demostraba la heredabilidad de la generación T₁.

Se seleccionaron un total de cinco constructos para determinar su heredabilidad como se describió anteriormente. Los plásmidos contenían *dgt-28* ligado con TraP4, TraP8 y TraP23. Los eventos en todas los constructos demostraron una heredabilidad del 68% de la proteína PAT :: DGT-28 en la generación T₁.

Tolerancia al herbicida postemergente en soja T₁ transformada con *dgt-28*. Las semillas de los eventos T₁ que se determinó que eran hereditarias por los métodos de cribado descritos anteriormente, se sembraron en medio Metro-mix en condiciones de invernadero. Las plantas se cultivaron hasta que el primer trifoliado se expandió completamente y se trató con 411 g ae/ha de IGNITE™ 280 SL para Selección del gen *pat* como se describió anteriormente. A las plantas resistentes de cada evento se les dieron identificadores únicos y se muestrearon para los análisis de cigosidad del gen *dgt-28*. Los datos de cigosidad se utilizaron para asignar 2 réplicas hemicigóticas y 2 homocigóticas a cada tasa de glifosato aplicada, lo que permitió un total de 4 réplicas por tratamiento cuando había suficientes plantas. Estas plantas se compararon con el tabaco Petite havana de tipo silvestre. Todas las plantas se rociaron con un pulverizador de oruga a razón de 187 l/ha. Las plantas se pulverizaron en un intervalo de 560 – 4.480 g ae/ha de sal de dimetilamina DURANGO™ (DMA). Todas las aplicaciones se formularon en agua con la adición de 2% p/v de sulfato amónico (AMS). Las plantas fueron evaluadas a los 7 y 14 días después del tratamiento. A las plantas se les asignó una calificación de lesión con respecto al retraso del crecimiento visual global, la clorosis y la necrosis. La generación T₁ está segregando, por lo que es de esperar una respuesta variable debido a la diferencia de cigosidad.

Tabla 24. Los resultados de la pulverización demuestran una tolerancia alta de 14 DAT (días después del tratamiento) de hasta 4.480 g ae/ha de glifosato de al menos un evento *dgt-28* por constructo caracterizado. Los eventos de copia única representativos de los constructos proporcionaron todos una tolerancia de hasta 4.480 g ae/ha en comparación con el control negativo de Maverick.

PDAB107543 (TraP4 :: <i>dgt-28</i>)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	4	0	33,8	7,5	25 - 40

ES 2 716 481 T3

1120 g ae/ha	2	2	0	25,0	11,5	15 - 35
2240 g ae/ha	2	2	0	17,5	2,9	15 - 20
4480 g ae/ha	0	2	2	33,8	13,1	20 - 45
PDAB107545 (TraP8 :: <i>dgt-28</i>)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1,5	1,0	0 - 2
1120 g ae/ha	4	0	0	2,8	1,5	2 - 5
2240 g ae/ha	4	0	0	5,0	2,4	2 - 8
4480 g ae/ha	4	0	0	9,5	1,9	8 - 12
PDAB107548 (TraP4 :: <i>dgt-28</i>)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1,8	2,4	0 - 5
1120 g ae/ha	4	0	0	2,8	1,5	2 - 5
2240 g ae/ha	4	0	0	3,5	1,7	2 - 5
4480 g ae/ha	4	0	0	8,8	3,0	5 - 12
PDAB107553 (TraP23 :: <i>dgt-28</i>)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	5,0	0,0	5
1120 g ae/ha	4	0	0	9,0	1,2	8 - 10
2240 g ae/ha	4	0	0	10,5	1,0	10 - 12
4480 g ae/ha	4	0	0	16,5	1,7	15 - 18
Maverik (control neg.)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	0	4	82,5	12,6	70 - 100
1120 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100

Protección de *dgt-28* contra tasas elevadas de glifosato en la generación T₂. Se realizó una prueba de descendencia de 45 plantas en dos a cinco líneas T₂ de *dgt-28* por constructo. Las líneas homocigóticas se eligieron basándose en los análisis de cigosidad completados en la generación anterior. Las semillas se plantaron como se describió anteriormente. Las plantas se rociaron luego con 411 g ae/ha de IGNITE 280 SL para la selección del marcador seleccionable *pat* como se describió anteriormente. Después de 3 DAT, se contaron las plantas resistentes y las sensibles.

Para los constructos que contienen TraP4 enlazada con *dgt-28* (pDAB107543 y pDAB107548), nueve de las doce líneas analizadas no se segregaron, lo que confirma líneas homogéneas en la generación T₂. Las líneas que contenían TraP8 unidas a *dgt-28* (pDAB107545) demostraron dos de las cuatro líneas sin segregantes y demostrando la herencia mendeliana a través de al menos dos generaciones de *dgt-28* en la soja. Las muestras de tejido se tomaron de plantas resistentes y la proteína DGT-28 se cuantificó por métodos ELISA estándar. Los datos demostraron un intervalo de proteína DGT-28 promedio de 32,8 a 107,5 ng/cm² para las líneas de T₂ no segregantes analizadas. Las líneas del constructo pDAB107553 (TraP23 :: *dgt-28*) no se seleccionaron previamente con glufosinato, y la respuesta a la dosis de glifosato se utilizó para probar tanto la homogeneidad como la tolerancia a tasas elevadas de glifosato. Los replicados de las líneas del constructo pDAB107553 fueron tolerantes a tasas que oscilaron entre 560 y 4.480 g ae/ha de glifosato y, por tanto, se confirmó que era una población homogénea y hereditaria hasta al menos dos generaciones.

Las tasas de DURANGO DMA que oscilan en el intervalo entre 560 y 4.480 g ae/ha de glifosato se aplicaron a soja 2-3 trifoliada como se describió anteriormente. Los datos de lesión visual a 14 DAT confirmaron los resultados de tolerancia que se demostraron en la generación T₁.

Tabla 25. Los datos demuestran una tolerancia alta del tabaco *dgt-28* hasta 3.360 g ae/ha de glifosato en el curso de dos generaciones, en comparación con el control no transformado.

pDAB107543 (TraP4 :: <i>dgt-28</i>)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	8,0	0,0	8
1120 g ae/ha	4	0	0	14,3	1,5	12 - 15
2240 g ae/ha	4	0	0	18,0	0,0	18
4480 g ae/ha	0	4	0	24,5	3,3	20 - 28
pDAB107545 (TraP8 :: <i>dgt-28</i>)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	2,8	1,5	2 - 5
2240 g ae/ha	4	0	0	5,0	0,0	5
4480 g ae/ha	4	0	0	10,0	0,0	10
pDAB107548 (TraP4 :: <i>dgt-28</i>)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	10,0	0,0	10
pDAB107553 (TraP4 :: <i>dgt-28</i>)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	-	0,0	0,0
560 g ae/ha	4	0	0	-	10,0	0,0
1120 g ae/ha	4	0	0	-	10,0	4,4
2240 g ae/ha	4	0	0	-	13,0	2,4
4480 g ae/ha	3	1	0	-	15,5	4,1
Maverik (control neg.)	% Lesiones			% Lesiones		

Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	0	4	77,5	15,0	70 - 100
1120 g ae/ha	0	0	4	97,5	2,9	95 - 100
2240 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100

Ejemplo 19: Transformación de arroz con *dgt-28*.

En un método ejemplar, el arroz transgénico (*Oryza sativa*) que contiene un transgén *dgt-28* integrado de manera estable se genera a través de la transformación, mediada por *Agrobacterium*, de la semilla de arroz esterilizada. Se utiliza una cepa de *Agrobacterium* desarmada que lleva un vector binario que contiene un *dgt-28* funcional para iniciar la transformación.

Los medios de cultivo se ajustan a pH 5,8 con KOH 1 M y se solidifican con 2,5 g/l de Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los callos embriogénicos se cultivan en placas Petri de 100 x 20 mm que contienen 30 ml de medio semisólido. Las plántulas de arroz se cultivan en 50 mL de medio en cajas MAGENTA. Las suspensiones de células se mantienen en matraces cónicos de 125 ml que contienen 35 mL de medio líquido y se hacen rotar a 125 rpm. La inducción y el mantenimiento de cultivos embriogénicos ocurren en la oscuridad a 25 - 26 °C, y la regeneración de la planta y el cultivo de la planta completa ocurren en una habitación iluminada con un fotoperíodo de 16 h (Zhang et al. 1996).

La inducción y el mantenimiento del callo embriogénico se realizan en un medio basal NB modificado como se describió anteriormente (Li et al. 1993), en donde el medio está adaptado para contener 500 mg/L de glutamina. Los cultivos en suspensión se inician y se mantienen en medio líquido SZ (Zhang et al. 1998) con la inclusión de 30 g/L de sacarosa en vez de maltosa. Medio osmótico (NBO) que consiste en medio NB con la adición de 0,256 M de manitol y de sorbitol. El callo resistente a los herbicidas se selecciona en medio NB suplementado con el agente selectivo de herbicidas apropiado durante 3 - 4 semanas. La pre-regeneración se realiza en medio (PRH50) que consiste en medio NB con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1 mg/L de ácido α -naftalenacético (NAA), 5 mg/L de ácido abscísico (ABA) y herbicida selectivo durante 1 semana. La regeneración de las plántulas sigue el cultivo en medio de regeneración (RNH50) que comprende medio NB que contiene 2,4-D, 0,5 mg/L de NAA y herbicida selectivo hasta que se regeneran los brotes supuestamente transgénicos. Los brotes se transfieren al medio de enraizamiento con sales basales de Murashige y Skoog de fuerza media y vitaminas B5 de Gamborg, suplementadas con 1% de sacarosa y herbicida selectivo.

Semillas maduras desecadas de *Oryza sativa* L. japonica cv. Taipei 309 se esterilizan como se describe en Zhang et al. 1996. Se inducen tejidos embriogénicos mediante el cultivo de semillas de arroz maduras estériles en medio NB en la oscuridad. El callo primario de aproximadamente 1 mm de diámetro se retira del escutelo y se usa para iniciar la suspensión celular en medio líquido SZ. Las suspensiones se mantienen luego como se describe en Zhang 1996. Los tejidos embriogénicos derivados de la suspensión se extraen del cultivo líquido 3-5 días después del subcultivo previo y se ponen en medio osmótico NBO para formar un círculo de aproximadamente 2,5 cm de ancho en una placa Petri y se cultivan durante 4 h antes del bombardeo. Dieciséis a veinte horas después del bombardeo, los tejidos se transfieren del medio NBO al medio de selección NBH50, asegurando que la superficie bombardeada mira hacia arriba y se incuba en la oscuridad durante 14 - 17 días. Los callos recién formados se separan de los explantes bombardeados originales y se colocan cerca en el mismo medio. Después de 8 a 12 días adicionales, el callo opaco relativamente compacto se identifica visualmente y se transfiere al medio de pre-regeneración PRH50 durante 7 días en la oscuridad. El callo en crecimiento, que se vuelve más compacto y opaco, se subcultiva en medio de regeneración RNH50 durante un período de 14 a 21 días en un fotoperíodo de 16 h. Los brotes de regeneración se transfieren a cajas MAGENTA que contienen medio 1/2 MSH50. Las plantas múltiples regeneradas a partir de un solo explante se consideran hermanas y se tratan como una línea de plantas independiente. Una planta se califica como positiva para el gen *dgt-28* si produce raíces gruesas y blancas y crece vigorosamente en el medio 1/2 MSH50. Una vez que las plántulas alcanzan la parte superior de las cajas MAGENTA, se transfieren al suelo en una maceta de 6 cm bajo una humedad del 100% durante una semana, y luego se trasladan a una cámara de crecimiento con un período de luz de 14 h a 30 °C y a 21 °C en la oscuridad durante 2-3 semanas antes de transplantar en macetas de 13 cm en el invernadero. Las semillas se recogen y se secan a 37 °C durante una semana antes del almacenamiento a 4 °C.

Análisis T₀ del arroz *dgt-28*. Los transformantes de arroz trasplantados obtenidos a través de la transformación con *Agrobacterium* se transplantaron en medios y se aclimataron a condiciones de invernadero. Todas las plantas fueron muestreadas para la detección con PCR de *dgt-28* y los resultados demuestran veintidós eventos positivos en PCR para pDAB110827 (TraP8 :: *dgt-28*) y un mínimo de dieciséis eventos positivos en PCR para pDAB110828 (TraP23 :: *dgt-28*). El análisis Southern para *dgt-28* de los eventos positivos en PCR demostró eventos simples (1-2 copias) para ambos constructos. La expresión de proteína de los eventos T₀ seleccionados demostraron intervalos de expresión

de proteína DGT-28 desde por debajo de los niveles de detección hasta 130 nm/cm². Eventos T₀ seleccionados del constructo pDAB110828 fueron tratados con 2.240 g ae/ha de DURANGO DMA™ como se describió anteriormente, y evaluados 7 y 14 días después del tratamiento. Los datos demostraron una tolerancia alta a la tasa de glifosato aplicada. A todas las plantas positivas a PCR se las dejó producir semilla T₁ para posterior caracterización.

- 5 Heredabilidad de *dgt-28* en arroz. Se realizó una prueba de descendencia de 100 plantas en cuatro líneas T₁ de *dgt-28* del constructo pDAB110827 que contiene el péptido de tránsito al cloroplasto TraP8. Las semillas fueron plantadas en macetas llenas de medio. Todas las plantas se rociaron luego con 560 g ae/ha de DURANGO DMA™ para la selección del gen *dgt-28* como se describió anteriormente. Después de 7 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Dos de las cuatro líneas analizadas para cada constructo segregaron como un solo locus, rasgo mendeliano
- 10 dominante (3R:1S), según se determina por el análisis de Chi cuadrado. El *dgt-28* es un gen hereditario de resistencia al glifosato en múltiples especies.

- 15 Tolerancia al herbicida post-emergencia en el arroz T₁ transformado con *dgt-28*. A las plantas resistentes a T₁ de cada evento utilizado en las pruebas de descendencia se les dieron identificadores únicos y se tomaron muestras para los análisis de cigosidad del gen *dgt-28*. Los datos de cigosidad se utilizaron para asignar 2 replicados hemicigótics y 2 homocigóticos a cada tasa de glifosato aplicada, lo que permitió un total de 4 replicados por tratamiento. Estas plantas se compararon con el arroz kitaake de tipo silvestre. Todas las plantas se rociaron con un pulverizador de oruga a razón de 187 L/ha. Las plantas se pulverizaron en un intervalo de 560 – 2.240 g ae/ha de DURANGO DMA™. Todas las aplicaciones se formularon en agua con la adición de 2% p/v de sulfato amónico (AMS). Las plantas se evaluaron a los 7 y 14 días después del tratamiento. A las plantas se les asignó una calificación de lesión con respecto la atrofia
- 20 del crecimiento visual general, la clorosis y la necrosis. La generación T₁ es segregante, por lo que se espera una respuesta variable debido a la diferencia de cigosidad.

Los resultados de la pulverización demuestran a 7 DAT (días después del tratamiento) que se detectó una lesión vegetativa mínima a tasas elevadas de glifosato (datos no mostrados).

- 25 **Tabla 26.** Datos de lesión visual a 14 DAT demuestran menos del 15% de lesión visual media hasta 2240 g ae/ha de glifosato.

TraP8 :: <i>dgt-28</i> Evento 1	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
TraP8 :: <i>dgt-28</i> Evento 2	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	3,8	4,8	0 - 10
1120 g ae/ha	4	0	0	12,0	3,6	8 - 15
2240 g ae/ha	4	0	0	15,0	6,0	8 - 20
Control no transformado	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	0	4	81,3	2,5	80 - 85
1120 g ae/ha	0	0	4	95,0	5,8	90 - 100
2240 g ae/ha	0	0	4	96,3	4,8	90 - 100

- 30 La detección de proteínas de DGT-28 se evaluó para replicados de las cuatro líneas T₁ probadas de pDAB110827. Los datos demostraron intervalos de proteína media DGT-28 de 20-82 ng/cm² y 21-209 ng/cm² para réplicas hemicigótics y homocigóticos, respectivamente. Estos resultados demostraron una expresión de proteína estable para la generación T₁ y la tolerancia del arroz *dgt-28* hasta 2.240 g ae/ha de glifosato después de una aplicación de 560 g ae/ha de glifosato utilizado para la selección.

Ejemplo 20: Transformación de césped con *dgt-28*.

La transformación genética, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, del transgén *dgt-28* en *bentgrass* (*agrostis*) rastrero se logra mediante callos embriogénicos iniciados a partir de semillas (cv. Penn-A-4). Véase "Eficiencia de la transformación del césped (*Agrostis stolonifera* L) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*" (Luo et al., 2004).

- 5 Las células de callo se infectan con una cepa de *A. tumefaciens* que alberga un vector súper-binario que contiene un transgén resistente a los herbicidas (p. ej. *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33*) dirigido por un promotor específico de monocot. La eficiencia de transformación estable general oscila entre 18% y 45%. La transferencia Southern y el análisis genético confirman la integración del transgén dentro del genoma de *bentgrass* rastrero y la transmisión normal y la expresión estable del transgén en la generación T₁. Todos los eventos de transformación independientes llevan de una a tres copias del transgén, y la mayoría (60-65%) contiene solo una copia única del transgén sin reajustes aparentes.

- 15 Las semillas maduras se descascarillaron con papel de lija y se esterilizaron en superficie en lejía Clorox™ al 10% (v/v) (hipoclorito sódico 6%) más 0,2% (v/v) de Tween 20 (polisorbato 20) con agitación vigorosa durante 90 min. Después de enjuagar cinco veces en agua destilada estéril, las semillas se colocan en medio inductor de callos (sales basales MS y vitaminas, 30 g/l de sacarosa, 500 mg/l de hidrolizado de caseína, 6,6 mg/l de ácido 3,6-dicloro-o-anísico (dicamba), 0,5 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP) y 2 g/l de Phytigel. El pH del medio se ajusta a 5,7 antes de autoclavar a 120 °C durante 20 min).

- 20 Las placas de cultivo que contienen explantes de semilla preparados se mantienen en la oscuridad a temperatura ambiente durante 6 semanas. Se seleccionan visualmente los callos embriogénicos y se subcultivan en medio fresco de inducción de callos en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 semana antes del co-cultivo.

- 25 Un día antes de la infección mediada por *Agrobacterium*, el callo embriogénico se divide en trozos de 1 a 2 mm y se pone en un medio de inducción de callo que contiene acetosiringona 100 µM. Luego se aplica a cada parte del callo una parte alícuota de 10 µl de suspensión de *Agrobacterium* (OD = 1,0 a 660 nm) que alberga el transgén *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33*, seguido de 3 días de co-cultivo en la oscuridad a 25 °C. Después se transfiere el callo y se cultiva durante 2 semanas en medio de inducción de callos más 125 mg/l de cefotaxima y 250 mg/l de carbenicilina para suprimir el crecimiento bacteriano.

- 30 La selección de plantas transgénicas se produce cuando el callo se traslada a un medio de inducción de callos que contiene 250 mg/l de cefotaxima y un herbicida. El material del callo se mantiene en este medio durante 8 semanas con un intervalo de subcultivo de selección de 3 semanas. El proceso de selección se realiza a temperatura ambiente en la oscuridad.

- Para la regeneración de las plantas, los eventos de callos proliferantes resistentes a los herbicidas se trasladan primero al medio de regeneración (medio basal MS, 30 g/l de sacarosa, 100 mg/l de mio-inositol, 1 mg/l de BAP y 2 g/l de Phytigel) suplementado con cefotaxima y un herbicida para la selección. Estos callos se mantienen en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 semana y luego se trasladan a la luz durante 2-3 semanas para desarrollar brotes.

- 35 Los brotes desarrollados se separan y se transfieren a un medio de regeneración libre de hormonas que contiene un herbicida y cefotaxima para promover el crecimiento de la raíz mientras se mantiene la presión de selección y se suprime cualquier célula de *Agrobacterium* restante. Las plántulas con raíces bien desarrolladas (3-5 semanas) se transfieren al suelo y se cultivan en invernadero o en el campo.

- 40 Las plantas transgénicas se mantienen al exterior libre en un vivero de contención (3-6 meses) hasta el solsticio de invierno en diciembre. Las plantas vernalizadas se transfieren luego al invernadero y se mantienen a 25 °C bajo un fotoperíodo de 16/8 h y se rodean de plantas de control no transgénicas que aíslan físicamente las plantas transgénicas de otras fuentes de polen. Las plantas transgénicas comienzan a florecer de 3 a 4 semanas después de ser trasladadas nuevamente al invernadero. Estas plantas se cruzan con el polen de las plantas de control circundantes. Las semillas recolectadas de cada planta transgénica individual se germinan en el suelo a 25 °C, y las plantas T₁ se cultivan en el invernadero para un análisis adicional.

- 50 Otras gramíneas se transforman con *dgt-28* de acuerdo con el protocolo descrito, que incluye prado anual (*Poa annua*), Bahiagrass, Bentgrass, Bermudagrass, Bluegrass, Bluestems, Brachiaria, Bromegrass, Browntop bent (*Agrostis capillaris*), Buffalograss, Canary Grass, Carpetgrass, Centipedegrass, Chewings fescue (*Festuca rubra commutate*), Crabgrass, Creeping bent (*Agrostis stolonifera*), Crested hairgrass (*Koeleria macrantha*), Dallisgrass, Fescue, Festolium, Hard/sheeps fescue (*Festuca ovina*), Gramagrass, Indiangrass, Johnsongrass, Lovegrass, mezclas (Equine, Pasture, etc.), Native Grasses, Orchardgrass, Perennial ryegrass (*Lolium perenne*), Redtop, Rescuegrass, Ryegrass anual y perenne, Slender creeping red fescue (*Festuca rubra trichophylla*), Smooth-stalked meadowgrass (*Poa pratensis*), St. Augustine, Strong creeping red fescue (*Festuca rubra rubra*), Sudangrass, Switchgrass, Tall fescue (*Festuca arundinacea*), Tufted hairgrass (*Deschampsia caespitosa*), Turfgrasses, Wheatgrass, and Zoysiagrass.

- 55 Ejemplo 21: Transformación de *Brassica* spp. con el rasgo *DGT*.

Un gen *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33* que confiere resistencia al glifosato se usa para transformar *Brassica napus*

var. Nexera™ 710 con transformación mediada por *Agrobacterium*.

Las semillas de *Brassica napus* se esterilizan en superficie con un 10% de lejía comercial durante 10 minutos y se enjuagan 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas se ponen después en la mitad de la concentración del medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) y se mantienen bajo un régimen de crecimiento establecido en 25 °C, y un fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad.

Se cortan los segmentos de hipocotilo (3-5 mm) de plántulas de 5 a 7 días y se colocan en medio de inducción de callos K1D1 (medio MS con 1 mg/l de kinetina y 1 mg/l de 2,4-D) durante 3 días como pre-tratamiento. Los segmentos se transfieren luego a una placa petri y se tratan con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un constructo que comprende *dgt-28*. Los *Agrobacterium tumefaciens* se cultivan durante la noche a 28 °C en la oscuridad en un agitador a 150 rpm, y posteriormente se re-suspenden en el medio de cultivo.

Después de un tratamiento de 30 min de los segmentos de hipocotilo con *Agrobacterium*, estos segmentos se ponen de nuevo en el medio de inducción de callos durante 3 días. Después del co-cultivo, los segmentos se ponen en K1D1TC (medio de inducción de callos que contiene 250 mg/l de carbenicilina y 300 mg/l de timentina) durante una semana de recuperación. Alternativamente, los segmentos se ponen directamente en el medio de selección K1D1H1 (por encima del medio con un herbicida). La carbenicilina y la timentina son los antibióticos utilizados para matar el *Agrobacterium*. El agente de selección permite el crecimiento de las células transformadas.

Las muestras de callo de eventos independientes aislados se analizan por PCR. Las muestras que dan positivo a la presencia de *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33* se confirman y avanzan a los medios para la regeneración. Los segmentos de hipocotilo callosos se ponen después en medio de regeneración de brotes B3Z1H1 (medio MS, 3 mg/l de bencilamino purina, 1 mg/l de zeatina, 0,5 gm/l de MES [ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico], 5 mg/l de nitrato de plata, herbicida selectivo, carbenicilina y timentina). Después de 3 semanas los brotes comienzan la regeneración. Los segmentos de hipocotilo junto con los brotes se transfieren a medio B3Z1H3 (medio MS, 3 mg/l de bencilamino purina, 1 mg/l de zeatina, 0,5 gm/l de MES [ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico], 5 mg/l de nitrato de plata, herbicida selectivo, carbenicilina y timentina) durante otras 3 semanas.

Los brotes se escinden de los segmentos de hipocotilo y se transfieren al medio de alargamiento de brotes MESH10 (MS, 0,5 gm/l de MES, herbicida selectivo, carbenicilina, timentina) durante 2-4 semanas. Los brotes alargados se cultivan para la inducción de la raíz en MSI.1 (MS con 0,1 mg/l de ácido indolbutírico). Una vez que las plantas establecen un sistema radicular, las plantas se trasplantan en el suelo. Las plantas se aclimatan bajo condiciones ambientales controladas en un Conviron™ durante 1-2 semanas antes de ser transferidas al invernadero.

Las plantas T₀ transformadas se autopolinizan en el invernadero para obtener semillas T₁. Las plantas T₀ y la progenie T₁ se rocían con un rango de concentraciones de herbicida de glifosato para establecer el nivel de protección mediante el gen *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32* o *dgt-33*.

Ejemplo 22: Transformación de Tabaco con *dgt-28*.

Se transformaron trozos de hojas de tabaco (cv. Petit Havana) utilizando *Agrobacterium tumefaciens* que contenía el transgén *dgt-28*. Las colonias individuales que contenían el plásmido que contiene el transgén *dgt-28* se inocularon en 4 mL de medio YEP que contenía espectinomicina (50 µg/ml) y estreptomycin (125 µg/ml) y se incubaron durante la noche a 28 °C en un agitador a 190 rpm. El cultivo de semillas de 4 mL se usó posteriormente para inocular un cultivo de 25 mL del mismo medio en un matraz Erlenmeyer apantallado de 125 mL. Este cultivo se incubó a 28 °C con agitación a 190 rpm hasta que alcanzó una OD600 de ~ 1,2. Luego se pusieron 10 mL de suspensión de *Agrobacterium* en placas Petri™ estériles de 60 x 20 mm.

Trozos de hojas recién cortadas (0,5 cm²) de plantas cultivadas asépticamente en medio MS (Phytotechnology Labs, Shawnee Mission, KS) con 30 g/l de sacarosa en PhytaTrays™ (Sigma, St. Louis, MO) se empaparon durante la noche en 10 mL de cultivo de *Agrobacterium* durante unos pocos minutos, se secaron sobre papel de filtro estéril y luego se colocaron en el mismo medio con la adición de 1 mg/L de ácido indolacético y 1 mg/L de 6-bencilamino purina. Tres días más tarde, los trozos de hojas co-cultivados con *Agrobacterium* que albergan el transgén *dgt-28* se transfirieron al mismo medio con 5 mg/L de Basta™ y 250 mg/L de cefotaxima.

Después de 3 semanas, las plántulas T₀ individuales se transfirieron a medio MS con 10 mg/L de Basta™ y 250 mg/L de cefotaxima 3 semanas más antes del trasplante al suelo y la transferencia al invernadero. Las plantas T₀ seleccionadas (como se identificaron usando los protocolos de análisis molecular descritos anteriormente) se dejaron autopolinizar y las semillas se recolectaron de las cápsulas cuando estaban completamente secas. Las plántulas T₁ se examinaron para determinar la cigosidad y la expresión del gen reportero (como se describe a continuación) y se identificaron las plantas seleccionadas que contienen el transgén *dgt-28*.

Las plantas se trasladaron al invernadero lavando el agar de las raíces, transplantando en tierra en macetas cuadradas de 13,75 cm, poniendo la maceta en una bolsa Ziploc® (SC Johnson & Son, Inc.), poniendo agua del grifo en el fondo de la bolsa, y poniéndola en luz indirecta en un invernadero a 30 °C durante una semana. Después de 3-7 días, se abrió la bolsa; las plantas se fertilizaron y se dejaron crecer en la bolsa abierta hasta que se aclimataron en el invernadero, momento en el cual la bolsa se retiró. Las plantas se desarrollaron en condiciones normales de

invernadero cálido (27 °C día, 24 °C noche, 16 horas día, mínimo natural + luz suplementaria = 1200 µE/m²s¹).

Antes de la propagación, se tomaron muestras de plantas T₀ para el análisis de ADN para determinar el número de copias del inserto *dgt-28* mediante PCR en tiempo real. Se puso tejido fresco en tubos y se liofilizó a 4 °C durante 2 días. Una vez que el tejido se secó completamente, se puso en el tubo una perla de tungsteno (Valenite) y las muestras se sometieron a 1 minuto de molienda en seco usando un molino de perlas Kelco. Luego se siguió el procedimiento estándar de aislamiento de ADN DNeasy™ (Qiagen, DNeasy 69109). Luego se tiñó una parte alícuota del ADN extraído con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se leyó en el fluorómetro (BioTek™) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/µl. Se usó como plantilla un total de 100 ng de ADN total. La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador Geneamp™ 9700 (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94 °C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 64 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto y 45 segundos, seguido de 72 °C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con EtBr y se confirmaron por transferencias Southern.

De cinco a nueve eventos positivos en PCR con 1-3 copias del gen *dgt-28* de 3 constructos que contienen una secuencia de péptido de tránsito al cloroplasto diferente (TraP4, TraP8 y TraP23) se regeneraron y se trasladaron al invernadero.

Todas las plantas positivas para PCR se muestrearon para la cuantificación de la proteína DGT-28 mediante ELISA estándar. La proteína DGT-28 se detectó en todas las plantas positivas en PCR y se observó una tendencia a un aumento en la concentración de proteína con el aumento del número de copias de *dgt-28*.

Heredabilidad de *aad-12* (v1) en tabaco. Se realizó una prueba de descendencia de 100 plantas en cinco líneas T₁ de *dgt-28* por constructo. Los constructos contenían una de las siguientes secuencias de péptidos de tránsito al cloroplasto: TraP4, TraP8 o TraP23. Las semillas se estratificaron, se sembraron y se trasplantaron con respecto al procedimiento de *Arabidopsis* ejemplificado anteriormente, con la excepción de que las plantas nulas no se eliminaron en la selección inicial antes del trasplante. Todas las plantas se rociaron luego con 280 g ae/ha IGNITE 280 SL para la selección del marcador seleccionable *pat* como se describió anteriormente. Después de 3 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles.

Cuatro de las cinco líneas analizadas para cada constructo segregaron como un solo locus, rasgo mendeliano dominante (3R:1S) según se determina por el análisis de Chi cuadrado. El *dgt-28* es un gen hereditario de resistencia a glifosato en múltiples especies.

Tolerancia al herbicida postemergencia en el tabaco T₁ transformado con *dgt-28*. A las plantas resistentes a T₁ de cada evento utilizado en la prueba de descendencia se les dieron identificadores únicos y se tomaron muestras para los análisis de cigosidad del gen *dgt-28*. Los datos de cigosidad se utilizaron para asignar 2 réplicas hemicigóticas y 2 homocigóticas a cada tasa de glifosato aplicada, lo que permitió un total de 4 réplicas por tratamiento. Estas plantas se compararon de nuevo con el tabaco Petite Havana de tipo silvestre. Todas las plantas se rociaron con un pulverizador de oruga a 187 l/ha. Las plantas se pulverizaron en un intervalo de 560 - 4480 g ae/ha DURANGO DMA™. Todas las aplicaciones se formularon en agua con la adición de 2% p/v de sulfato amónico (AMS). Las plantas fueron evaluadas a los 7 y 14 días después del tratamiento. A las plantas se les asignó una calificación de lesión con respecto a la atrofia visual general, la clorosis y la necrosis. La generación T₁ es segregante, por lo que es de esperar una respuesta variable debido a la diferencia de cigosidad.

Los resultados de la pulverización demuestran a 7 DAT (días después del tratamiento) que se detectó lesión vegetativa mínima a tasas elevadas de glifosato (datos no mostrados). Después de 14 DAT, los datos de lesiones visuales demuestran una mayor lesión con los eventos de copia única del constructo que contiene TraP4 en comparación con los eventos de copia única de las estructuras TraP8 y TraP23.

Tabla 27. A una tasa de 2.240 g ae/ha de glifosato se demostró una lesión promedio de 37,5% con el evento que contiene TraP4, donde los eventos que contienen TraP8 y TraP23 demostraron una lesión promedio de 9,3% y 9,5%, respectivamente.

TraP4 :: <i>dgt-28</i> (pDAB107543)	% Lesiones			% Lesiones		
	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
Tasa de aplicación						
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	2	2	0	18,0	8,1	10 - 25
1120 g ae/ha	1	3	0	24,5	4,9	18 - 30
2240 g ae/ha	0	3	1	37,5	6,5	30 - 45
4480 g ae/ha	0	2	2	42,5	2,9	40 - 45
TraP8 :: <i>dgt-28</i> (pDAB107545)	% Lesiones			% Lesiones		
	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)

Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	3,3	3,9	0 - 8
1120 g ae/ha	4	0	0	6,5	1,7	5 - 8
2240 g ae/ha	4	0	0	9,3	3,0	5 - 12
4480 g ae/ha	2	0	0	17,5	6,5	10 - 25
TraP23 :: <i>dgt-28</i> (pDAB107553)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	10,0	1,6	8 - 12
1120 g ae/ha	4	0	0	8,8	3,0	5 - 12
2240 g ae/ha	4	0	0	9,5	4,2	5 - 15
4480 g ae/ha	4	0	0	15,8	1,5	15 - 18
Petite havana	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	0	4	85,0	4,1	80 - 90
1120 g ae/ha	0	0	4	91,3	2,5	90 - 95
2240 g ae/ha	0	0	4	94,5	3,3	90 - 98
4480 g ae/ha	0	0	4	98,3	2,4	95 - 100

Estos resultados demostraron la tolerancia de *dgt-28* hasta 4.480 g ae/ha de glifosato, así como las diferencias en tolerancia proporcionadas por las secuencias de péptidos de tránsito al cloroplasto unidas al gen *dgt-28*.

- 5 Protección de *dgt-28* contra tasas elevadas de glifosato en la generación T₂. Se realizó una prueba de descendencia de 25 plantas en dos o tres líneas T₂ de *dgt-28* por constructo. Las líneas homocigóticas fueron elegidas basándose en los análisis de cigosidad completados en la generación anterior. Las semillas fueron estratificadas, sembradas y trasplantadas como se describió anteriormente. Todas las plantas se rociaron luego con 280 g ae/ha de Ignite 280 SL para la selección del marcador seleccionable *pat* según se describió anteriormente. Después de 3 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Todas las líneas analizadas para cada constructo no se segregaron, confirmando así las líneas homogéneas en la generación T₂ y demostrando la herencia mendeliana a través de al menos dos generaciones de *dgt-28* en el tabaco.

- 15 Se aplicaron tasas de DURANGO DMA™ en el intervalo 420 – 3.360 g ae/ha de glifosato, a 2-3 hojas de tabaco como se describió anteriormente. Los datos de lesiones visuales al 14 DAT confirmaron los resultados de tolerancia que se demostraron en la generación T₁. Los resultados foliares de líneas de dos copias del constructo que contiene TraP4 demostraron una tolerancia similar a la de las líneas TraP8 y TraP23 de copia única (datos no mostrados).

Tabla 28. Líneas de una sola copia del constructo que contiene TraP4 con *dgt-28* demostraron incremento de lesiones en comparación con las líneas de constructos que contienen TraP8 y TraP23 con *dgt-28*.

TraP4 :: <i>dgt-28</i> (pDAB107543)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha	0	4	0	23,8	4,8	20 - 30
840 g ae/ha	0	4	0	30,0	4,1	25 - 35
1680 g ae/ha	0	4	0	35,0	5,8	30 - 40
3360 g ae/ha	0	4	0	31,3	2,5	30 - 35

TraP8 :: <i>dgt-28</i> (pDAB107545)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha	4	0	0	2,5	2,9	0 - 5
1680 g ae/ha	4	0	0	9,3	3,4	5 - 12
3360 g ae/ha	4	0	0	10,5	1,0	10 - 12
TraP23 :: <i>dgt-28</i> (pDAB107553)	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha	4	0	0	6,3	2,0	5 - 10
1680 g ae/ha	4	0	0	10,0	0,0	10
3360 g ae/ha	3	1	0	13,8	4,8	10 - 20
<i>Petite havana</i>	% Lesiones			% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 20%	20-40%	> 40%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha	0	0	4	95,0	0,0	95
840 g ae/ha	0	0	4	98,8	1,0	98 - 100
1680 g ae/ha	0	0	4	99,5	1,0	98 - 100
3360 g ae/ha	0	0	4	100	0,0	100

Los datos demuestran una tolerancia alta del tabaco *dgt-28* hasta 3.360 g ae/ha de glifosato a través de dos generaciones en comparación con el control no transformado.

- 5 Plantas seleccionadas de cada evento fueron muestreadas antes de las aplicaciones de glifosato para los análisis de la proteína DGT-28 mediante ELISA DGT-28 estándar. Los datos demostraron la expresión de la proteína media DGT-28 de las líneas simples (1-2 copias) a través de constructos en el intervalo de 72,8-114,5 ng/cm². Los datos demuestran que *dgt-28* está expresando proteína en la generación T₂ de tabaco transformado y los datos de tolerancia confirman la proteína funcional DGT-28.

- 10 Apilamiento de *dgt-28* para aumentar el espectro de herbicidas en el tabaco (cv. Petit Havana). Las plantas homocigóticas *dgt-28* (pDAB107543 y pDAB107545) y *aad-12* v1 (pDAB3278) (véase PCT/US2006/042133 para este último) se cruzaron recíprocamente y se recolectó semilla F₁. La semilla F₁ de dos cruces recíprocos de cada gen se estratificaron y se trataron 6 reps de cada cruce con 1.120 g ae/ha glifosato (selectivo para el gen *dgt-28*), 1.120 g ae/ha 2,4-D (selectivo para el gen *aad-12*), o una mezcla de tanque de los dos herbicidas a las tasas descritas. Las plantas se clasificaron a los 14 DAT. Los resultados de la pulverización se muestran en la **Tabla 29**.

- 15 **Tabla 29.** Respuesta de F₁ *aad-12* y *dgt-28*.

	<i>aad-12</i> x TraP4 :: <i>dgt-28</i>	<i>aad-12</i> x TraP8 :: <i>dgt-28</i>	<i>Petite havana</i>
Tasa de aplicación	Tolerancia		
1.120 g ae/ha 2,4-D	++++	++++	–
1.120 g ae/ha glifosato	++	++	–
1.120 g ae/ha 2,4-D + 1.120 g ae/ha glifosato	++	++	–

Los resultados confirman que *dgt-28* se puede apilar con éxito con *aad-12* (*v1*), aumentando así el espectro de herbicidas que se pueden aplicar al cultivo de interés (glifosato + ácidos fenoxiacéticos para *dgt-28* y *aad-12*, respectivamente). En la producción de cultivos en los que existen malezas de hoja ancha difíciles de controlar o biotipos de malezas resistentes, la pila se puede utilizar como un medio de control de malezas y protección de la cosecha de interés. Los rasgos de entrada o salida adicionales también podrían apilarse con el gen *dgt-28*.

Ejemplo 23: Resistencia al glifosato en el trigo.

Producción de vectores binarios que codifican DGT-28. Vectores binarios que contienen la expresión DGT-28 y las casetes de selección PAT fueron diseñados y ensamblados utilizando la experiencia y técnicas comúnmente conocidas en este campo. Cada casete de expresión de DGT-28 contenía el promotor, la región 5' no traducida y el intrón del gen de ubiquitina (*Ubi*) de *Zea mays* (Toki et al. Plant Physiology 1992, 100 1503 - 07), seguido de una secuencia de codificación que consta de uno de los cuatro péptidos de tránsito (TraP4, TraP8, TraP23 o TraP5) fusionados al extremo 5' de una versión sintética del gen de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (DGT-28), que había sido codón-optimizado para la expresión en plantas. La casete de expresión DGT-28 terminó con una región 3' no traducida (UTR) que comprende el terminador transcripcional y el sitio de poliadenilación de un gen de lipasa (*Vp1*) de *Z. mays* (Paek et al. Mol Cells 1998 30; 8 (3) 336 - 42). La casete de selección PAT estaba compuesta por el promotor, la región 5' no traducida y el intrón del gen de Actina (*Act1*) de *Oryza sativa* (McElroy et al. The Plant Cell 1990 2 (2) 163 - 171), seguido de una versión sintética del gen de la fosfinotricina acetil transferasa (PAT) aislado de *Streptomyces viridochromogenes*, que había sido codón-optimizado para la expresión en plantas. El gen de PAT codifica una proteína que confiere resistencia a los inhibidores de la glutamina sintetasa que comprende la fosfinotricina, el glufosinato y el bialafos (Wohlleben et al. Gene 1988, 70 (1), 25 - 37). La casete de selección se terminó con la UTR 3' que comprende el terminador transcripcional y los sitios de poliadenilación del gen 35s del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Chenault et al. Plant Physiology 1993 101 (4), 1395 - 1396).

La casete de selección fue sintetizada por un proveedor comercial de síntesis de genes (GeneArt, Life Technologies) y se clonó en un vector binario habilitado para Gateway. Las casetes de expresión DGT-28 se subclonaron en pDONR221. El clon de ENTRY resultante se usó en una reacción de LR Clonase II (Invitrogen, Life Technologies) con el vector binario habilitado para Gateway codificando la casete de expresión de fosfinotricina acetil transferasa (PAT). Las colonias de todos los plásmidos ensamblados se seleccionaron inicialmente mediante digestión de restricción de ADN purificado utilizando endonucleasas de restricción obtenidas de New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) y Promega (Promega Corporation, WI). Se realizaron preparaciones de ADN plásmido utilizando el *kit* QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden) o el Sistema Pureipeld Plasmid Maxiprep (Promega Corporation, WI), siguiendo las instrucciones de los proveedores. El ADN plasmídico de los clones seleccionados se secuenció utilizando la secuenciación ABI Sanger y el protocolo de secuenciación del ciclo Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies). Los datos de secuencia se ensamblaron y se analizaron utilizando el software SEQUENCHER™ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

Los cuatro clones de expresión binaria resultantes: pDAS000122 (TraP4-DGT28), pDAS000123 (TraP8-DGT28), pDAS000124 (TraP23-DGT28) y pDAS000125 (TraP5-DGT28) se transformaron cada uno de ellos en *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA5.

Producción de eventos de trigo transgénico con el constructo de expresión *dgt-28*. Las plantas de trigo transgénicas que expresan uno de los cuatro constructos de expresión de DGT-28 se generaron mediante la transformación mediada por *Agrobacterium* utilizando la línea de trigo donante Bobwhite MPB26RH, siguiendo un protocolo similar al de Wu et al. Transgenic Research 2008, 17: 425 - 436. Los supuestos eventos transgénicos T₀ se seleccionaron en relación con la tolerancia a la fosfinotricina (PPT), el fenotipo conferido por el marcador seleccionable PAT, y se transfirieron al suelo. Las plantas T₀ se cultivaron en condiciones de contención de invernadero y se produjo semilla T₁. En conjunto, se generaron aproximadamente 45 eventos T₀ independientes para cada constructo de expresión de DGT-28.

Resistencia al glifosato en eventos de trigo *dgt-28* trigo T₀. A los eventos se les permitió aclimatarse en el invernadero y se cultivaron hasta que surgieron 2-4 hojas nuevas de apariencia normal del verticilo (es decir, las plantas habían pasado del cultivo de tejidos a las condiciones de cultivo en invernadero). Las plantas se cultivaron a 25 °C bajo 12 horas de iluminación suplementaria en el invernadero hasta la madurez. Se completó un cribado inicial de la tolerancia al glifosato y los análisis de Taqman en plantas T₁ cultivadas en las mismas condiciones descritas anteriormente. Los datos permitieron caracterizar aún más la determinación de eventos T₁ hereditarios. Se replantaron seis eventos de bajo número de copias (1-2 copias) y dos eventos T₁ multicopia bajo condiciones de invernadero y se desarrollaron hasta la fase de 3 hojas. Las plantas T₁ se rociaron con una formulación comercial de glifosato (Durango DMA™) a partir de un intervalo de 420 a 3.360 g ae/ha, que son capaces de dañar significativamente las líneas de trigo no transformadas. Se incluyó en la aplicación una adición de 2% p/v de sulfato amónico. Una dosis letal se define como la tasa que causa > 75% de lesión al control no transformado Bob White MPB26RH. Se aplicó herbicida.

En este ejemplo, las aplicaciones de glifosato se utilizaron tanto para determinar la segregación del gen *dgt-28* en la generación T₁ como para demostrar la tolerancia al aumento de los niveles de glifosato. La respuesta de las plantas se presenta en términos de escala de lesión visual 21 días después del tratamiento (DAT). Los datos se presentan como un histograma de individuos que muestran menos del 25% de lesión visual (4), 25% - 50% de lesión visual (3),

50% - 75% de lesión visual (2) y más del 75% de lesión (1). Se presenta una media aritmética y una desviación estándar para cada constructo utilizado para la transformación del trigo. El intervalo de puntuación de la respuesta individual también se indica en la última columna para cada tasa y transformación. El tipo natural, el trigo no transformado (cv Bob White MPB26RH), sirvió como control sensible al glifosato. En la generación T₁, las plantas hemicigóticas y homocigóticas estaban disponibles para las pruebas para cada evento y, por tanto, se incluyeron para cada tasa de glifosato ensayada. Las plantas hemicigóticas contendrán la mitad de la dosis del gen como plantas homocigóticas, por lo que puede esperarse una variabilidad de respuesta al glifosato en la generación T₁.

Los resultados de las plantas de trigo T₁ *dgt-28* demostraron que la tolerancia al glifosato se alcanzaba a tasas de hasta 3.360 g ae/ha con los péptidos de tránsito al cloroplasto TraP4, TraP5, TraP8 y TraP23. **Tabla 30.** Los datos son de un evento T₁ de bajo número de copias pero son representativos de la población para cada constructo.

Tabla 30. Respuesta de eventos de trigo T₁ *dgt-28* de bajo número de copias al glifosato 21 días después del tratamiento.

TraP4 :: <i>dgt-28</i>	% Lesiones				% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 25%	25-50%	50-75%	> 75%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
420 g ae/ha	5	0	0	0	4,0	0,0	4
840 g ae/ha	6	2	0	0	3,75	0,46	3 - 4
1680 g ae/ha	4	2	0	0	3,67	0,52	3 - 4
3360 g ae/ha	4	2	0	0	3,67	0,52	3 - 4
TraP8 :: <i>dgt-28</i>	% Lesiones				% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 25%	25-50%	50-75%	> 75%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
420 g ae/ha	5	3	0	0	3,63	0,52	3 - 4
840 g ae/ha	3	5	0	0	3,38	0,52	3 - 4
1680 g ae/ha	4	3	0	0	3,57	0,53	3 - 4
3360 g ae/ha	5	5	0	0	3,50	0,53	3 - 4
TraP23 :: <i>dgt-28</i>	% Lesiones				% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 25%	25-50%	50-75%	> 75%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
420 g ae/ha	9	2	0	0	3,82	0,40	3 - 4
840 g ae/ha	8	1	0	0	3,89	0,33	3 - 4
1680 g ae/ha	7	5	0	0	3,58	0,0	3 - 4
3360 g ae/ha	8	2	0	0	3,80	4,8	3 - 4
TraP5 :: <i>dgt-28</i>	% Lesiones				% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 25%	25-50%	50-75%	> 75%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
420 g ae/ha	5	2	0	0	3,71	0,49	3 - 4
840 g ae/ha	4	2	0	0	3,67	0,52	3 - 4
1680 g ae/ha	7	3	0	0	3,70	0,48	3 - 4
3360 g ae/ha	6	0	0	0	4,00	0,00	3 - 4
Bobwhite MPB26RH	% Lesiones				% Lesiones		
Tasa de aplicación	< 25%	25-50%	50-75%	> 75%	Promed.	Desv. estándar	Intervalo (%)
420 g ae/ha	0	1	1	10	1,25	0,62	1 - 3
840 g ae/ha	0	0	0	10	1,00	0,00	1
1680 g ae/ha	0	0	0	12	1,17	0,58	1 - 3
3360 g ae/ha	0	0	0	10	1,00	0,00	1

A los 21 DAT, se cuentan las plantas resistentes y sensibles para determinar el porcentaje de líneas que se segregaron

como un solo locus, rasgo mendeliano dominante (3R: 1 S) según se determina mediante el análisis de Chi cuadrado. **Tabla 31.** Estos datos demuestran que *dgt-28* es heredable como gen de alta resistencia al glifosato en una especie monocot.

Tabla 31. Porcentaje de eventos T₁ *dgt-28* por constructo que demostraron la heredabilidad de una manera mendeliana basándose en una selección de glifosato a tasas en el intervalo de 420-3.360 g ae/ha.

ID del constructo	CTP:GOI	% de eventos T1 probados que se segregaron en un solo locus	% de eventos T1 probados que se segregaron como 2 loci	Nº de eventos T ₁ probados
pDAS000122	TraP4 :: <i>dgt-28</i>	62,5%	37,5%	8
pDAS000123	TraP8 :: <i>dgt-28</i>	87,5%	12,5%	8
pDAS000124	TraP23:: <i>dgt-28</i>	12,5%	87,5%	8
pDAS000125	TraP5:: <i>dgt-28</i>	62,5%	0,0%	8

Confirmación molecular de plantas transgénicas T₀ para la integración de T-ADN que codifica DGT-28. El ADN genómico se extrajo del material foliar liofilizado de todas las plantas de trigo T₀ putativas. El tejido foliar recién recolectado se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 24 h en una Labconco Freezone 4.5® de (Labconco, Kansas City, MO) a -40 °C y una presión 133 x 10⁻³ mBar. El material liofilizado se sometió a extracción de ADN utilizando el *kit* DNeasy® Plant DNA Extraction Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN de cada planta T₀ se ensayó para determinar la presencia o ausencia de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* por arrastre y el número de copias integradas del T-ADN que codifica DGT-28. La presencia o ausencia de la cepa de *A. tumefaciens* se realizó mediante un ensayo dúplex Taqman® qPCR para amplificar el gen de la ubiquitina endógena (cebadores directos e inversos y sonda):

5' GCGAAGATCCAGGACAAGGA 3' (SEC ID NO: 85; cebador directo)

5' CTGCTTACCGGCAAAGATGAG 3' (SEC ID NO: 86; cebador inverso)

5' TTCCCCCGGACCAGCAGCGT 3' (SEC ID NO: 87; sonda)

del genoma del trigo, y virC de pTiBo542:

5' CCGACGAGAAAGACCAGCAA 3' (SEC ID NO: 88; cebador directo)

5' CTTAAGTTGTCGATCGGGACTGT 3' (SEC ID NO: 89; cebador inverso)

5' TGAGCCTCTCGTCGCCGATCACAT 3' (SEC ID NO: 90; sonda).

El número de copias de T-ADN integradas se estimó usando un ensayo qPCR Taqman® dúplex siguiendo el procedimiento de Livak y Schmittgen (Methods 2001 25: 402 - 8). El ensayo amplificó el gen endógeno de una sola copia de puroindolina- b (*Pinb*) en el genoma D del trigo hexaploide (Gautier et al. Plant Science 2000 153, 81 - 91):

5' ATTTTCCATTCACTTGCCCC 3' (SEC ID NO: 91; cebador directo)

5' TGCTATCTGGCTCAGCTGC 3' (SEC ID NO: 92; cebador inverso)

5' ATGGTGGAAGGGCGGTTGTGA 3' (SEC ID NO: 93; sonda)

y una región del promotor de Actina (*Act1*) presente en el T- ADN:

5 'CTCCCGCGCACCGATCTG 3' (SEC ID NO: 94; cebador directo)

5 'CCCGCCCCTCTCCTCTTTC 3' (SEC ID NO: 95; cebador inverso)

5 'AAGCCGCTCTCGCCACCCA 3' (SEC ID NO: 96; sonda).

Las plantas que no amplificaron un producto de *virC* y a partir de las cuales se amplificaron los productos correctos con cebadores para la ubiquitina endógena y el promotor de actina del arroz, se clasificaron como transgénicas. El número de T-ADN integrado se estimó a partir de $2\Delta\Delta C$ (T), de acuerdo con Livak y Schmittgen (Methods 2001 25: 402-8). En general, aproximadamente el 95% de todas las plantas T₀ tenían al menos una copia integrada del ADN-T. **Tabla 32.**

Tabla 32. Número de plantas T0 independientes generadas y número estimado de T-ADN integrado que codifica DGT-28.

Vector	nº de plantas T0 independientes	nº de eventos T0 independientes positivos para transgén	nº de eventos T-ADN multi-copias (≥ 4)	nº de eventos T-ADN de bajo nº de copias (≥ 3)
pDAS000122	45	43	15	28
pDAS000123	44	42	11	31
pDAS000124	45	44	21	23
pDAS000125	46	39	15	24

Desarrollo de ensayos de cigosidad por PCR para rastrear la herencia de transgenes. Las secuencias que flanquean los sitios de integración de T-ADN se identificaron mediante la digestión del ADN genómico purificado con ocho endonucleasas de restricción, seguido de la ligación de adaptadores de doble cadena específicos de los salientes creados por las endonucleasas de restricción. Después de la ligación del adaptador, se realizó la PCR con un cebador biotinilado en el extremo 3' o 5' del T-ADN que codifica DGT-28 y un cebador en cada adaptador. Los productos de la PCR se capturaron y purificaron en perlas de inmovilización reversible en fase sólida Ampure (SPRI) (Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter Company). Luego se realizó una PCR anidada y los productos de amplificación fueron secuenciados por el método de Sanger utilizando la química BigDye® v3.1 (Applied Biosystems) en una plataforma de electroforesis capilar automatizada ABI3730xl®. El análisis de secuencia realizado utilizando el software Sequencher (GeneCodes, Ann Arbor, MI) se utilizó para generar (cuando es posible) una secuencia de consenso. La secuencia de consenso resultante y los *singletons* ("solteros"), o instancia única, se utilizaron como consultas de BlastN contra contigs de secuencia del estudio del genoma ensamblado para brazos de cromosoma ordenados por flujo, del trigo de la variedad Chinese Spring (www.wheatgenome.org) para determinar los cromosomas en los que se había producido la integración del T-ADN y para permitir el diseño de cebadores específicos del subgenoma para el desarrollo de ensayos de cigosidad por PCR.

Se desarrollaron dos ensayos de PCR para cada evento transgénico para permitir el rastreo de la herencia transgénica en generaciones posteriores. El primer ensayo (en lo sucesivo denominado PCR *out-out*) se diseñó para amplificar a través del sitio de integración de TDNA. La amplificación específica para subgenomas en este ensayo se logró usando PCR *on-off* con cebadores diseñados para posicionar la penúltima base (que contenía un enlace de fosforotioato) sobre la variación de la secuencia de nucleótidos que distinguía el locus objetivo de copias duplicadas (tanto homólogas como parálogas) del locus en otra parte del genoma del trigo. El segundo ensayo (en lo sucesivo denominado PCR *in-out*) se diseñó para amplificar desde el T-ADN en la secuencia endógena. Este ensayo utilizó uno de los cebadores del ensayo de PCR *out-out* y un cebador diseñado para el extremo 3' o 5' de los T-ADN que codifican DGT-28. Los cebadores de PCR se diseñaron para tener una longitud de entre 18 y 27 nucleótidos y una temperatura de fusión de 60 a 65 °C, la óptima de 63 °C. Los ensayos de PCR tanto *out-out* como *in-out* se realizaron en un volumen de reacción de 25 µl con dNTP 0,2 mM, 1x tampón de PCR Phusion (New England BioLabs), MgCl₂ 1,5 mM, ADN polimerasa de Hotstart Phusion de 0,5U (New England BioLabs), 25 ng de ADN genómico purificado y 0,4 µM de cada cebador. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron 98 °C durante 30 s y luego (98 °C durante 10 s, 65 °C durante 20 s, 72 °C durante 60 s) durante 40 ciclos. La cigosidad de las plantas transgénicas se asignó como se muestra en la Tabla 33.

Tabla 33. Eventos transgénicos para los que se desarrollaron ensayos de cigosidad por PCR y se utilizaron secuencias de cebadores para PCR *out-out* e *in-out*.

PCR Out-out				
Constructo	Código del evento	Cebador 1 (5'→3')*	Cebador 2 (5'→3')*	Tamaño (pb)
pDAS000122	hh08-6678-2-1	GGTTTGTGTAATCCC TCTGTTGG*T (SEQ ID NO:97)	GTGGTCATGACAGTA TGATAACAG*G (SEQ ID NO:98)	303
pDAS000122	hh08-6678-8-1	GGGTCTGCCCAATGA AGCG*A (SEQ ID NO:99)	TCTCGCTTCTCTCAT AACACATCGT*G (SEQ ID NO:100)	217
pDAS000123	hh08-6729-5-1	GACCTCTCTCACCT CCTCCT*C (SEQ ID NO:101)	CCAAATAATAAGTGA GAGAGGGGCA*T (SEQ ID NO:102)	286

PCR Out-out				
Constructo	Código del evento	Cebador 1 (5'→3')*	Cebador 2 (5'→3')*	Tamaño (pb)
pDAS000123	mp45-6739-14-1	TAGTTCCCTGTCGT GTGCAA*A (SEQ ID NO:103)	CAACAGCAGCCTCAC CAATCA*C (SEQ ID NO:104)	555
pDAS000123	mp45-6739-5-1	CAAGAACGGTGCTCC TTTTTTAA*G (SEQ ID NO:105)	AGCCCTTCCTCTGCA TCCTT*A (SEQ ID NO:106)	440
pDAS000124	yl02-6762-8-1	GGCTGTGTTGCACAC AAATAGAG*A (SEQ ID NO:107)	CAGCAGCACGGTAGG TAGATTG*T (SEQ ID NO:108)	473
pDAS000124	gt19-6752-4-1	CCGATAAGACGGCAA CTGATTAA*A (SEQ ID NO:109)	AGGCTGGCTTCTAGT GGAAGGA*G (SEQ ID NO:110)	215
pDAS000124	hh08-6761-1-1	GGGTTTCCGGCTGGA GAC*G (SEQ ID NO:111)	CCAAAAGCAATTTTC GTTATAAGATGC*C (SEQ ID NO:112)	302
OlipDAS000124	yl02-6762-6-1	CCAGATAATCTGTGG GCTCCT*G (SEQ ID NO:113)	GCAGCAGCTTGCCTT AAGC*A (SEQ ID NO:114)	161
pDAS000125	hh08-6780-10-1	TGCTTGTTTCTGTTG TCATCATAGGT*T (SEQ ID NO:115)	CATTTGTTGGGTTTC CACGTAC*G (SEQ ID NO:116)	145
pDAS000125	hh08-6780-8-1	GAGCGCGGCTAAAGG TCAAAA*C (SEQ ID NO:117)	CCGATTACATGGAC TTGATGGAG*T (SEQ ID NO:118)	241
PCR in-out				
pDAS000122	hh08-6678-2-1	GGTTTGTTGAATCCC TCTGTTGG*T (SEQ ID NO:119)	GCCGCCTCCAGTGAG TGTTGCTGCTTGTTG A*G (SEQ ID NO:120)	732
pDAS000122	hh08-6678-8-1	GGGTCTGCCCAATGA AGCG*A (SEQ ID NO:121)	GCCGCCTCCATAATG TGTGAGTAGTTCCCA GATAAG*G (SEQ ID NO:122)	297
pDAS000123	hh08-6729-5-1	GCCGCCTCCAGTGAG TGTTGCTGCTTGTTG A*G (SEQ ID NO:123)	CCAAATAATAAGTGA GAGAGGGGCA*T (SEQ ID NO:124)	510

PCR in-out				
pDAS000123	mp45-6739-14-1	GCCGCCTCCATAATG TGTGAGTAGTTCCCA GATAAG*G (SEQ ID NO:125)	CAACAGCAGCCTCAC CAATCA*C (SEQ ID NO:126)	510
pDAS000123	mp45-6739-5-1	GCCGCCTCCATAATG TGTGAGTAGTTCCCA GATAAG*G (SEQ ID NO:127)	AGCCCTTCCTCTGCA TCCTT*A (SEQ ID NO:128)	580
pDAS000124	yl02-6762-8-1	GCCGCCTCCATAATG TGTGAGTAGTTCCCA GATAAG*G (SEQ ID NO:129)	CAGCAGCACGGTAGG TAGATTG*T (SEQ ID NO:130)	672
pDAS000124	gt19-6752-4-1	GCCGCCTCCAGTGAG TGTTGCTGCTTGTGT A*G (SEQ ID NO:131)	AGGCTGGCTTCTAGT GGAAGGA*G (SEQ ID NO:132)	594
pDAS000124	hh08-6761-1-1	GCCGCCTCCATAATG TGTGAGTAGTTCCCA GATAAG*G (SEQ ID NO:133)	CCAAAAGCAATTTTC GTTATAAGATGC*C (SEQ ID NO:134)	528
pDAS000124	yl02-6762-6-1	GCCGCCTCCAGTGAG TGTTGCTGCTTGTGT A*G (SEQ ID NO:135)	GCAGCAGCTTGCCTT AAGC*A (SEQ ID NO:136)	633
pDAS000125	hh08-6780-10-1	GCCGCCTCCATAATG TGTGAGTAGTTCCCA GATAAG*G (SEQ ID NO:137)	CATTTGTTGGGTTTC CACGTAC*G (SEQ ID NO:138)	280
pDAS000125	hh08-6780-8-1	GCCGCCTCCAGTGAG TGTTGCTGCTTGTGT A*G (SEQ ID NO:139)	CCGATTTACATGGAC TTGATGGAG*T (SEQ ID NO:140)	680
* indica unión fosforotioato				

Evaluación fenotípica de plantas transgénicas T₁ para la tolerancia al glifosato. Para determinar si los eventos transgénicos con constructos de expresión de DGT-28 presentaban tolerancia al glifosato, las plantas T₁ derivadas de eventos individuales se evaluaron fenotípicamente en condiciones de contención de invernadero. Se realizaron dos cribados fenotípicos. En el primer cribado (preliminar), los eventos transgénicos (con semilla T₁ suficiente para ambos cribados fenotípicos) se evaluaron para determinar la tolerancia al glufosinato y al glifosato para confirmar la expresión de DGT-28 y establecer el orden de clasificación del intervalo para la tolerancia al herbicida entre eventos. En el segundo cribado (detallado), los eventos transgénicos seleccionados fueron evaluados para determinar la tolerancia al glifosato a diferentes tasas de dosis de pulverización para establecer el nivel de tolerancia al herbicida conferido dentro de los eventos y entre los constructos de expresión de DGT-28.

Doce semillas T₁ por evento seleccionado y tres replicados (12 semillas cada uno) de la línea Bobwhite MPB26RH del trigo donante no transformado se sembraron en macetas de 85 mm y se cultivaron hasta la fase de 2 hojas, bien regadas, a 25 °C con iluminación adicional que proporciona un fotoperíodo de 12 horas. Las macetas se colocaron en

un diseño aleatorio para permitir que se eliminen los efectos ambientales durante el análisis de los datos. Los eventos transgénicos examinados se enumeran en la **Tabla 34**. En la fase de 2 hojas, todas las plantas T₁ y la primera réplica de 12 plantas de trigo donante no transformadas se pulverizaron con glufosinato a una tasa de dosis de 420 g ai/ha. Las plantas se inspeccionaron visualmente al cabo de cuatro días y se usaron plantas representativas que capturaron el intervalo de respuestas fenotípicas para desarrollar una escala de puntuación de 0 a 6. **Tabla 35**.

5

Tabla 34. Eventos transgénicos probados en cribado preliminar.

Entrada	Vector	Código de evento	Nº estimado de T-DNA integrado que codifica DGT-28*
1	pDAS000122	hh08-6678-6-1	Evento de bajo nº de copias
2	pDAS000122	mp45-6696-2-1	Evento de bajo nº de copias
3	pDAS000122	hh08-6718-2-1	Evento de bajo nº de copias
4	pDAS000122	km51-6686-1-1	Evento de bajo nº de copias
5	pDAS000122	mp45-6677-5-1	Evento de bajo nº de copias
6	pDAS000122	mp45-6696-4-1	Evento de bajo nº de copias
7	pDAS000122	mp45-6711-2-1	Evento de bajo nº de copias
8	pDAS000122	mp45-6711-4-1	Evento de bajo nº de copias
9	pDAS000122	hh08-6678-7-1	Evento de bajo nº de copias
10	pDAS000122	mp45-6711-7-1	Evento de bajo nº de copias
11	pDAS000122	mp45-6711-3-1	Evento de bajo nº de copias
12	pDAS000122	hh08-6678-2-1	Evento de bajo nº de copias
13	pDAS000122	mp45-6711-5-1	Evento de bajo nº de copias
14	pDAS000122	mp45-6711-6-1	Evento de bajo nº de copias
15	pDAS000122	mp45-6696-1-1	Evento de bajo nº de copias
16	pDAS000122	hh08-6678-8-1	Evento de bajo nº de copias
17	pDAS000122	gt19-6680-3-1	Evento multi-copias
18	pDAS000122	mp45-6711-10-1	Evento multi-copias
19	pDAS000122	mp45-6711-31-1	Evento multi-copias
20	pDAS000122	yl02-6709-1-1	Evento multi-copias
21	pDAS000122	mp45-6711-11-1	Evento multi-copias
22	pDAS000123	hh08-6729-6-1	Evento de bajo nº de copias
23	pDAS000123	mp45-6739-4-1	Evento de bajo nº de copias
24	pDAS000123	gt19-6733-7-1	Evento de bajo nº de copias
25	pDAS000123	mp45-6739-7-1	Evento de bajo nº de copias
26	pDAS000123	gt19-6733-9-1	Evento de bajo nº de copias
27	pDAS000123	gt19-6733-2-1	Evento de bajo nº de copias
28	pDAS000123	yl02-6735-5-1	Evento de bajo nº de copias
29	pDAS000123	yl02-6735-1-1	Evento de bajo nº de copias
30	pDAS000123	hh08-6729-8-1	Evento de bajo nº de copias
31	pDAS000123	gt19-6733-5-1	Evento de bajo nº de copias
32	pDAS000123	mp45-6739-14-1	Evento de bajo nº de copias
33	pDAS000123	mp45-6739-2-1	Evento de bajo nº de copias
34	pDAS000123	hh08-6729-5-1	Evento de bajo nº de copias

ES 2 716 481 T3

35	pDAS000123	mp45-6739-5-1	Evento de bajo nº de copias
36	pDAS000123	hh08-6729-7-1	Evento de bajo nº de copias
37	pDAS000123	hh08-6729-9-1	Evento de bajo nº de copias
38	pDAS000123	gt19-6733-10-1	Evento de bajo nº de copias
39	pDAS000123	gt19-6733-8-1	Evento de bajo nº de copias
40	pDAS000123	hh08-6729-3-1	Evento multi-copias
41	pDAS000123	mp45-6739-16-1	Evento multi-copias
42	pDAS000123	gt19-6733-6-1	Evento multi-copias
43	pDAS000123	di01-6745-1-1	Evento multi-copias
44	pDAS000123	gt19-6733-1-1	Evento multi-copias
45	pDAS000123	mp45-6739-1-1	Evento multi-copias
46	pDAS000124	mp45-6756-4-1	Evento de bajo nº de copias
47	pDAS000124	y102-6762-3-1	Evento de bajo nº de copias
48	pDAS000124	y102-6762-11-1	Evento de bajo nº de copias
49	pDAS000124	gt19-6752-10-1	Evento de bajo nº de copias
50	pDAS000124	gt19-6752-14-1	Evento de bajo nº de copias
51	pDAS000124	y102-6762-4-1	Evento de bajo nº de copias
52	pDAS000124	mp45-6756-2-1	Evento de bajo nº de copias
53	pDAS000124	mp45-6756-1-1	Evento de bajo nº de copias
54	pDAS000124	y102-6762-8-1	Evento de bajo nº de copias
55	pDAS000124	y102-6762-6-1	Evento de bajo nº de copias
56	pDAS000124	gt19-6752-4-1	Evento de bajo nº de copias
57	pDAS000124	gt19-6752-23-1	Evento de bajo nº de copias
58	pDAS000124	hh08-6761-1-1	Evento de bajo nº de copias
59	pDAS000124	hh08-6761-3-1	Evento de bajo nº de copias
60	pDAS000124	y102-6762-1-1	Evento de bajo nº de copias
61	pDAS000124	y102-6762-7-1	Evento de bajo nº de copias
62	pDAS000124	gt19-6752-7-1	Evento de bajo nº de copias
63	pDAS000124	y102-6762-12-1	Evento multi-copias
64	pDAS000124	gt19-6752-6-1	Evento multi-copias
65	pDAS000124	gt19-6752-22-1	Evento multi-copias
66	pDAS000124	gt19-6752-24-1	Evento multi-copias
67	pDAS000124	gt19-6752-18-1	Evento multi-copias
68	pDAS000124	y102-6762-5-1	Evento multi-copias
69	pDAS000125	hh08-6780-9-1	Evento de bajo nº de copias
70	pDAS000125	y102-6781-8-1	Evento de bajo nº de copias
71	pDAS000125	hh08-6780-1-1	Evento de bajo nº de copias
72	pDAS000125	hh08-6785-3-1	Evento de bajo nº de copias
73	pDAS000125	hh08-6780-7-1	Evento de bajo nº de copias
74	pDAS000125	hh08-6780-4-1	Evento de bajo nº de copias

75	pDAS000125	gt19-6777-2-1	Evento de bajo nº de copias
76	pDAS000125	hh08-6785-4-1	Evento de bajo nº de copias
77	pDAS000125	yl02-6781-4-1	Evento de bajo nº de copias
78	pDAS000125	hh08-6780-16-1	Evento de bajo nº de copias
79	pDAS000125	hh08-6780-8-1	Evento de bajo nº de copias
80	pDAS000125	hh08-6780-10-1	Evento de bajo nº de copias
81	pDAS000125	hh08-6780-11-1	Evento de bajo nº de copias
82	pDAS000125	hh08-6780-12-1	Evento de bajo nº de copias
83	pDAS000125	hh08-6780-6-1	Evento de bajo nº de copias
84	pDAS000125	gt19-6777-5-1	Evento de bajo nº de copias
85	pDAS000125	hh08-6785-7-1	Evento de bajo nº de copias
86	pDAS000125	hh08-6780-13-1	Evento de bajo nº de copias
87	pDAS000125	hh08-6785-1-1	Evento de bajo nº de copias
88	pDAS000125	hh08-6785-8-1	Evento multi-copias
89	pDAS000125	yl02-6781-1-1	Evento multi-copias
90	pDAS000125	hh08-6780-3-1	Evento multi-copias
91	pDAS000125	yl02-6781-7-1	Evento multi-copias
92	pDAS000125	hh08-6780-15-1	Evento multi-copias
Basado en el ensayo Taqman® qPCR dúplex. El nº de copias bajo y múltiple indica T-DNA integrado ≤ 3 y ≥ 4 , respectivamente.			

Tabla 35. Escala de puntuación utilizada para registrar la respuesta fenotípica al glufosinato a los 4 días después de la pulverización.

Puntuación	Descripción
0	Germinación retardada o mal establecimiento de la planta; excluir de análisis subsiguientes
1	> 75% de hojas necróticas; brote clorótico/marchito/ muerto
2	25-75% de hojas necróticas; brotes/hojas en su mayoría cloróticas
3	10-25% de hojas necróticas; < 50% de hojas cloróticas; marchitamiento moderado; menor brote clorótico
4	< 10% de hojas necróticas; marchitamiento menor; clorosis menor
5	puntas de las hojas necróticas; planta sana
6	planta sana

- 5 Cada planta del ensayo se calificó luego en relación con la escala de puntuación, con el anotador "cegado" con respecto al genotipo de la planta para eliminar el sesgo de puntuación. Cinco días después de la puntuación del glufosinato, todas las plantas T1 y la primera y segunda réplicas de plantas de trigo donante no transformadas se pulverizaron con glifosato a una tasa de dosis de 420 g ia/ha. La tercera réplica restante de la línea de trigo donante no transformado (12 plantas en total) no se pulverizó. Las plantas se inspeccionaron visualmente a los 7, 14 y 21 días
- 10 después de la pulverización. Se desarrolló una escala de puntuación que captura el intervalo de respuestas fenotípicas para cada valor de tiempo y se utiliza para puntuar toda la prueba. En cada momento, el anotador "se cegó" con respecto al genotipo de la planta. La escala de puntuación a los 7 días después de la pulverización varió de 0 a 7 (**Tabla 36**) y de 1 a 4 a los 14 y 21 días después de la pulverización (**Tabla 37**). La longitud de la planta, el número de retoños y las anomalías morfológicas también se registraron para cada planta 14 días después de la pulverización con glifosato. Las plantas con germinación tardía o establecimiento deficiente se excluyeron de los análisis posteriores.
- 15

Tabla 36. Escala de puntuación utilizada para registrar la respuesta fenotípica al glifosato a los 7 días después de la pulverización.

Puntuación	Descripción
0	Planta muerta
1	> 75% de hojas necróticas; brote clorótico/marchito/ muerto
2	50-75% de hojas necróticas; clorosis y marchitamiento severos
3	25-50% de hojas necróticas; < 50% de hojas cloróticas; marchitamiento moderado
4	10-25% de hojas necróticas; < 25% de hojas cloróticas; marchitamiento menor
5	< 10% de hojas necróticas; clorosis menor
6	puntas de las hojas necróticas; resto de la planta sano
7	planta sana

Tabla 37. Escala de puntuación utilizada para registrar la respuesta fenotípica al glifosato a los 14 y 21 días después de la pulverización.

Puntuación	Descripción
1	planta muerta
2	50-75% de hojas necróticas; clorosis y marchitamiento severos; planta moribunda
3	< 25% de hojas necróticas; < 25% de hojas cloróticas; menor marchitamiento; signos de crecimiento
4	planta sana

El análisis de la respuesta al glufosinato no pudo revelar una diferencia fenotípica clara entre las plantas de trigo donantes no transformadas que se pulverizaron y las plantas donantes no transformadas que no se pulverizaron (datos no mostrados). Como consecuencia, la tolerancia de los eventos transgénicos al glufosinato no pudo evaluarse de manera fiable. En cambio, el análisis de la respuesta al glifosato 21 días después de la pulverización reveló una clara diferencia fenotípica entre las plantas donantes no transformadas pulverizadas y no pulverizadas. Tabla 38. Por tanto, los análisis para la tolerancia al glifosato entre los eventos transgénicos se basaron en las puntuaciones de respuesta recopiladas 21 días después de la pulverización. Se consideró que un evento transgénico presentaba tolerancia al glifosato cuando 4 o más de las 12 plantas T1 para ese evento tuvieron una puntuación de respuesta mayor o igual a 3. Este criterio estaba basado en la expectativa de que cada evento se segregaría 1: 2: 1 (homocigoto presente: hemocigoto: homocigoto ausente) para el transgén en la generación T1 y para permitir que se identifiquen los eventos con una expresión de DGT28 débil. Los eventos transgénicos se clasificaron por la tolerancia al glifosato observada utilizando una puntuación agregada arbitraria calculada a partir de plantas tolerantes individuales. La puntuación agregada se calculó a partir de las puntuaciones de respuesta a los 14 y 21 días y la longitud de la planta, el número de retoños y las anomalías morfológicas registradas a los 14 días después de la pulverización.

Tabla 38. Respuesta fenotípica de plantas de trigo donantes no transformadas, al tratamiento con herbicida a los 21 días después de la pulverización.

	pulverizado con glufosinato	pulverizado con glifosato	tasa de supervivencia
Replicado 1	Si	Si	10 de 12 muertas/moribundas
Replicado 2	No	Si	10 de 12 muertas/moribundas
Replicado 3	No	No	12 de 12 sanas

En general, 67 de los 92 eventos transgénicos cribados mostraron evidencia de tolerancia al glifosato. **Tabla 39.** Se seleccionaron seis eventos transgénicos, que se estimó que tenían ≤ 3 copias integradas del transgén, y dos eventos transgénicos que se estimó que tenían 4 o más transgenes integrados para cada vector de expresión DGT-28 para su inclusión en el segundo (detallado) cribado fenotípico.

Tabla 39. Respuesta fenotípica de eventos transgénicos al tratamiento con glifosato, por orden de clasificación.

pDAS000122	mp45-6711-7-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	8,0	Sí
pDAS000124	gt19-6752-4-1	Nº copias bajo	91,7%	Tolerante	7,3	Sí
pDAS000122	gt19-6680-3-1	Copias múltiples	100,0%	Tolerante	7,2	Sí
pDAS000123	gt19-6733-1-1	Copias múltiples	50,0%	Tolerante	7,2	No
pDAS000122	mp45-6711-4-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	6,2	Sí
pDAS000125	hh08-6780-8-1	Nº copias bajo	58,3%	Tolerante	6,1	Sí
pDAS000123	mp45-6739-16-1	Copias múltiples	75,0%	Tolerante	6,1	Sí
pDAS000125	hh08-6780-10-1	Nº copias bajo	75,0%	Tolerante	6,1	Sí
pDAS000125	hh08-6785-8-1	Copias múltiples	50,0%	Tolerante	5,9	Sí
pDAS000125	hh08-6785-7-1	Nº copias bajo	50,0%	Tolerante	5,8	Sí
pDAS000124	gt19-6752-22-1	Copias múltiples	91,7%	Tolerante	5,8	Sí
pDAS000123	di01-6745-1-1	Copias múltiples	100,0%	Tolerante	5,7	Sí
pDAS000122	hh08-6678-2-1	Nº copias bajo	75,0%	Tolerante	5,5	Sí
pDAS000122	hh08-6678-7-1	Nº copias bajo	58,3%	Tolerante	5,3	Sí
pDAS000125	hh08-6780-6-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	5,2	Sí
pDAS000123	gt19-6733-6-1	Copias múltiples	83,3%	Tolerante	5,0	No
pDAS000125	hh08-6780-11-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	5,0	Sí
pDAS000125	hh08-6780-7-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	3,7	Sí
pDAS000124	yl02-6762-8-1	Nº copias bajo	83,3%	Tolerante	3,5	Sí
pDAS000124	yl02-6762-6-1	Nº copias bajo	83,3%	Tolerante	3,3	Sí
pDAS000122	mp45-6711-2-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	3,2	Sí
pDAS000122	mp45-6711-11-1	Copias múltiples	100,0%	Tolerante	3,0	Sí
pDAS000122	mp45-6677-5-1	Nº copias bajo	33,3%	Tolerante	2,7	No
pDAS000125	hh08-6785-4-1	Nº copias bajo	58,3%	Tolerante	2,5	No
pDAS000123	yl02-6735-1-1	Nº copias bajo	83,3%	Tolerante	2,1	Sí
pDAS000122	mp45-6711-3-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	1,7	No
pDAS000125	yl02-6781-1-1	Copias múltiples	41,7%	Tolerante	1,7	No
pDAS000124	hh08-6761-1-1	Nº copias bajo	100,0%	Tolerante	1,6	Sí
pDAS000125	hh08-6780-16-1	Nº copias bajo	91,7%	Tolerante	1,4	No
pDAS000123	hh08-6729-8-1	Nº copias bajo	83,3%	Tolerante	1,1	Sí
pDAS000125	hh08-6780-1-1	Nº copias bajo	91,7%	Tolerante	0,9	No
pDAS000123	hh08-6729-5-1	Nº copias bajo	83,3%	Tolerante	0,7	Sí
pDAS000124	mp45-6756-1-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	0,7	Sí
pDAS000123	mp45-6739-14-1	Nº copias bajo	91,7%	Tolerante	0,5	Sí
pDAS000125	gt19-6777-2-1	Nº copias bajo	75,0%	Tolerante	0,3	No
pDAS000124	yl02-6762-5-1	Copias múltiples	91,7%	Tolerante	0,2	No
pDAS000125	hh08-6780-3-1	Copias múltiples	66,7%	Tolerante	0,0	Sí
pDAS000122	mp45-6696-1-1	Nº copias bajo	83,3%	Tolerante	-0,1	No
pDAS000122	hh08-6678-8-1	Nº copias bajo	58,3%	Tolerante	-0,1	Sí

ES 2 716 481 T3

pDAS000125	hh08-6780-12-1	Nº copias bajo	75,0%	Tolerante	-0,3	No
pDAS000125	yl02-6781-4-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	-0,4	No
pDAS000124	gt19-6752-6-1	Copias múltiples	50,0%	Tolerante	-0,9	No
pDAS000122	mp45-6696-4-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	-0,9	No
pDAS000125	hh08-6780-9-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	-1,1	No
pDAS000123	mp45-6739-5-1	Nº copias bajo	83,3%	Tolerante	-1,1	Sí
pDAS000124	yl02-6762-1-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	-1,1	No
pDAS000123	yl02-6735-5-1	Nº copias bajo	83,3%	Tolerante	-1,3	No
pDAS000124	yl02-6762-7-1	Nº copias bajo	91,7%	Tolerante	-1,6	Sí
pDAS000124	gt19-6752-24-1	Copias múltiples	50,0%	Tolerante	-1,6	No
pDAS000123	mp45-6739-7-1	Nº copias bajo	41,7%	Tolerante	-1,7	No
pDAS000124	gt19-6752-18-1	Copias múltiples	100,0%	Tolerante	-1,7	Sí
pDAS000123	gt19-6733-2-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	-1,8	No
pDAS000124	gt19-6752-10-1	Nº copias bajo	33,3%	Tolerante	-2,0	No
pDAS000123	mp45-6739-4-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	-2,0	Sí
pDAS000125	gt19-6777-5-1	Nº copias bajo	50,0%	Tolerante	-2,4	No
pDAS000124	gt19-6752-14-1	Nº copias bajo	58,3%	Tolerante	-2,5	No
pDAS000122	yl02-6709-1-1	Copias múltiples	50,0%	Tolerante	-2,5	No
pDAS000125	yl02-6781-8-1	Nº copias bajo	58,3%	Tolerante	-2,7	No
pDAS000124	gt19-6752-23-1	Nº copias bajo	83,3%	Tolerante	-2,7	No
pDAS000124	mp45-6756-2-1	Nº copias bajo	75,0%	Tolerante	-2,7	No
pDAS000124	yl02-6762-3-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	-3,4	No
pDAS000123	gt19-6733-8-1	Nº copias bajo	41,7%	Tolerante	-3,4	No
pDAS000123	hh08-6729-7-1	Nº copias bajo	50,0%	Tolerante	-3,6	No
pDAS000125	hh08-6785-3-1	Nº copias bajo	66,7%	Tolerante	-4,2	No
pDAS000123	mp45-6739-1-1	Copias múltiples	33,3%	Tolerante	-4,4	No
pDAS000122	mp45-6711-31-1	Copias múltiples	41,7%	Tolerante	-4,5	No
pDAS000125	hh08-6780-15-1	Copias múltiples	66,7%	Tolerante	-4,8	No
pDAS000123	gt19-6733-10-1	Nº copias bajo	33,3%	Tolerante	-5,1	No
pDAS000125	hh08-6780-13-1	Nº copias bajo	100,0%	Tolerante	-5,5	No
pDAS000122	mp45-6711-5-1	Nº copias bajo	75,0%	Tolerante	-5,7	No
pDAS000122	mp45-6711-10-1	Copias múltiples	58,3%	Tolerante	-10,4	No
pDAS000123	gt19-6733-5-1	Nº copias bajo	0,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000124	gt19-6752-7-1	Nº copias bajo	0,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000122	hh08-6718-2-1	Nº copias bajo	0,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000123	hh08-6729-9-1	Nº copias bajo	0,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000124	hh08-6761-3-1	Nº copias bajo	0,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000125	hh08-6785-1-1	Nº copias bajo	0,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000122	mp45-6696-2-1	Nº copias bajo	0,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000123	mp45-6739-2-1	Nº copias bajo	0,0%	Susceptible	n/a	No

pDAS000122	km51-6686-1-1	Nº copias bajo	8,3%	Susceptible	n/a	No
pDAS000122	mp45-6711-6-1	Nº copias bajo	8,3%	Susceptible	n/a	No
pDAS000124	y102-6762-12-1	Copias múltiples	8,3%	Susceptible	n/a	No
pDAS000123	gt19-6733-7-1	Nº copias bajo	16,7%	Susceptible	n/a	No
pDAS000123	hh08-6729-3-1	Copias múltiples	16,7%	Susceptible	n/a	No
pDAS000124	mp45-6756-4-1	Nº copias bajo	16,7%	Susceptible	n/a	No
pDAS000125	hh08-6780-4-1	Nº copias bajo	16,7%	Susceptible	n/a	No
pDAS000122	hh08-6678-6-1	Nº copias bajo	25,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000123	gt19-6733-9-1	Nº copias bajo	25,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000123	hh08-6729-6-1	Nº copias bajo	25,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000124	y102-6762-11-1	Nº copias bajo	25,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000124	y102-6762-4-1	Nº copias bajo	25,0%	Susceptible	n/a	No
pDAS000125	y102-6781-7-1	Copias múltiples	25,0%	Susceptible	n/a	No

* Una puntuación positiva indica una mayor tolerancia al glifosato. La puntuación agregada estandarizada para las plantas de trigo donantes no tratadas y no transformadas fue 12,2.

- 5 Pantalla fenotípica detallada. Se sembraron cuatro réplicas de 12 semillas T1 por evento seleccionado y ocho réplicas (12 semillas cada una) de la línea de trigo donante no transformado Bobwhite MPB26RH, en macetas de 85 mm, y se cultivaron hasta la fase de 2 hojas en condiciones bien regadas a 25 °C con iluminación suplementaria que proporciona un fotoperiodo de 12 horas. Las macetas se colocaron en un diseño aleatorio para permitir que los efectos ambientales se eliminasen durante el análisis de los datos. Los eventos transgénicos examinados se enumeran en la **Tabla 40**. En la fase de 2 hojas, se registró la longitud de la planta y el número de hojas para cada planta antes de pulverizar con glifosato. El primero, segundo, tercero y cuarto replicados de plantas T1 para cada evento seleccionado y la línea de trigo donante no transformada se pulverizaron a una tasa de dosis de 420, 840, 1680 y 3360 g ia/ha, respectivamente.
- 10 Los replicados quinto, sexto, séptimo y octavo de la línea de trigo donante no transformado (48 plantas en total) no se pulverizaron. A los 7, 14 y 21 días después de la pulverización, las plantas se clasificaron según su longitud, el número de hojas y la respuesta fenotípica al glifosato utilizando la escala de puntuación de la **Tabla 37**. También se registró cualquier anomalía morfológica. Para la puntuación, el anotador "se cegó" con respecto al genotipo de la planta y la tasa de dosis de rociado para evitar el sesgo de puntuación. Las plantas con germinación retardada y establecimiento
- 15 deficiente (criterio: longitud de la planta < 6 cm) en la puntuación previa al rociado se excluyeron de los análisis posteriores.

Tabla 40. Eventos transgénicos probados en cribado fenotípico detallado.

Entrada	Vector	Código de evento	Número estimado de T-DNA integrada que codifica DGT-28*
1	pDAS000122	mp45-6677-5-1	Evento de nº de copias bajo
2	pDAS000122	mp45-6711-7-1	Evento de nº de copias bajo
3	pDAS000122	mp45-6711-4-1	Evento de nº de copias bajo
4	pDAS000122	hh08-6678-2-1	Evento de nº de copias bajo
5	pDAS000122	hh08-6678-7-1	Evento de nº de copias bajo
6	pDAS000122	hh08-6678-8-1	Evento de nº de copias bajo
7	pDAS000122	mp45-6711-2-1	Evento de nº de copias bajo
8	pDAS000122	gt19-6680-3-1	Evento de copias múltiples
9	pDAS000122	mp45-6711-11-1	Evento de copias múltiples
10	pDAS000123	v102-6735-1-1	Evento de nº de copias bajo
11	pDAS000123	hh08-6729-8-1	Evento de nº de copias bajo
12	pDAS000123	hh08-6729-5-1	Evento de nº de copias bajo
13	pDAS000123	mp45-6739-14-1	Evento de nº de copias bajo

14	pDAS000123	mp45-6739-5-1	Evento de nº de copias bajo
15	pDAS000123	mp45-6739-7-1	Evento de nº de copias bajo
16	pDAS000123	mp45-6739-4-1	Evento de nº de copias bajo
17	pDAS000123	mp45-6739-16-1	Evento de copias múltiples
18	pDAS000123	di01-6745-1-1	Evento de copias múltiples
19	pDAS000124	gt19-6752-4-1	Evento de nº de copias bajo
20	pDAS000124	v102-6762-8-1	Evento de nº de copias bajo
21	pDAS000124	y102-6762-6-1	Evento de nº de copias bajo
22	pDAS000124	hh08-6761-1-1	Evento de nº de copias bajo
23	pDAS000124	mp45-6756-1-1	Evento de nº de copias bajo
24	pDAS000124	y102-6762-7-1	Evento de nº de copias bajo
25	pDAS000124	gt19-6752-22-1	Evento de copias múltiples
26	pDAS000124	gt19-6752-18-1	Evento de copias múltiples
27	pDAS000125	hh08-6780-8-1	Evento de nº de copias bajo
28	pDAS000125	hh08-6780-10-1	Evento de nº de copias bajo
29	pDAS000125	hh08-6785-7-1	Evento de nº de copias bajo
30	pDAS000125	hh08-6780-6-1	Evento de nº de copias bajo
31	pDAS000125	hh08-6780-11-1	Evento de nº de copias bajo
32	pDAS000125	hh08-6780-7-1	Evento de nº de copias bajo
* Basado en el ensayo dúplex Taqman® qPCR. Copias bajas y múltiples indican ≤ 3 y ≥ 4 T-DNA integrado, respectivamente.			

El análisis de la respuesta al glifosato a los 7, 14 y 21 días después de la pulverización reveló una clara diferencia fenotípica entre las plantas de trigo donantes no transformadas pulverizadas y no pulverizadas. Esta diferenciación fue máxima a los 21 días y se observó en todas las tasas de dosis de glifosato. **Tabla 41.** Para evaluar la tolerancia de los eventos transgénicos al glifosato a cada tasa de dosis de pulverización, las plantas T1 nulas (es decir, las plantas que no llevan el transgén) se excluyeron de los análisis posteriores. Se consideró que las plantas T1 con una puntuación de respuesta de menos de tres a los 21 días después de la pulverización tenían el genotipo nulo. El análisis de varianza (ANOVA) basado en fenotipos tolerantes reveló un efecto significativo para el constructo de expresión de DGT-28, evento transgénico y dosis de pulverización de glifosato. **Tabla 42.** Sin embargo, múltiples pruebas de comparación no pudieron desvelar una interpretación biológica significativa del origen de estas diferencias debido al rango limitado de puntajes de respuesta (es decir, 1 a 4; **Tabla 40**) que se usa para registrar el fenotipo de plantas individuales. En general, los ocho eventos transgénicos independientes analizados para cada construcción de expresión de DGT-28 mostraron una tolerancia similar al glifosato a cada tasa de dosis de rociado, lo que indica que los cuatro transgenes DGT-28 confirieron un fenotipo dominante y que una sola copia fue suficiente para conferir tolerancia al glifosato. Cada una de las construcciones de expresión de DGT-28 reveló una tolerancia efectiva de al menos 3360 g ai/ha de glifosato.

Tabla 41. Respuesta fenotípica de plantas de trigo donante no transformadas a diferentes tratamientos con glifosato a los 21 días después de pulverizar.

	Tasa de dosis (g ai/ha)	Nº de plantas a la puntuación pre-pulverización	Nº de plantas supervivientes a los 14 días después de la pulverización	Nº de plantas supervivientes a los 21 días después de la pulverización
Replicado 1	420	10	0	0
Replicado 2	840	10	3	0
Replicado 3	1680	11	0	0
Replicado 4	3360	10	1	0

Replicado 5	0	9	8	8
Replicado 6	0	8	8	8
Replicado 7	0	12	12	12
Replicado 8	0	12	12	12

Tabla 42. Análisis de varianza (ANOVA) basado en plantas tolerantes al glifosato.

	Df ¹	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr (>F) ²
Replicado	11	1,29	0,12	0,728	0,71181
Vector	4	139,54	34,88	216,025	2,00 E-16 ***
Código Evento	29	178,52	6,16	38,122	2,00 E-16 ***
Dosis Pulveriz.	3	2,14	0,71	4,417	0,00427**
¹ Grados de libertad; estadísticamente significativos a 0,001 (***) y 0,01 (**) respectivamente.					

Confirmación molecular de la presencia de T-ADN en plantas T1 tolerantes al glifosato. Los ensayos de cigosidad de PCR desarrollados en el Ejemplo 2 se usaron para confirmar la presencia de T-ADN que codifica DGT-28 en las plantas T1 tolerantes al glifosato reservadas para la producción de semillas T2 (véase el Ejemplo 6). En conjunto, se realizaron pruebas de cigosidad por PCR para 104 plantas T1, de las que el 89% se confirmó que contenían al menos una copia del transgén. Tabla 43. Estos resultados confirmaron que la tolerancia al glifosato observada fue conferida por la presencia de T-ADN que codifica DGT-28.

Tabla 43. Segregación de transgén observada entre plantas T1.

Constructo	Código del evento	Homocigoto para la presencia del transgen	Hemicigoto para la presencia del transgen	Homocigoto para la ausencia del transgen	Plantas escapes observadas
pDAS000122	hh08-6678-2-1	0	7	2	Si
pDAS000122	hh08-6678-8-1	2	7	0	No
pDAS000123	hh08-6729-5-1	7	4	0	No
pDAS000123	mp45-6739-14-1	1	8	0	No
pDAS000123	mp45-6739-5-1	0	9	0	No
pDAS000124	gt19-6752-4-1	5 (homo o hemi)		3	Si
pDAS000124	hh08-6761-1-1	3	2	3	Si
pDAS000124	y102-6762-6-1	7 (homo o hemi)		2	Si
pDAS000124	y102-6762-8-1	3	6	0	No
pDAS000125	hh08-6780-10-1	6	4	0	No
pDAS000125	hh08-6780-8-1	2	7	1	Si

Generación de semillas T2 para eventos transgénicos tolerantes al glifosato. Aproximadamente ocho plantas T1 tolerantes al glifosato se guardaron de los cribados fenotípicos para los 32 eventos transgénicos que se seleccionaron para su inclusión en el cribado fenotípico detallado (Tabla 40). Las plantas se transfirieron a macetas de 200 mm y se cultivaron en condiciones de buen riego a 25 °C con iluminación adicional que proporcionó un fotoperíodo de 12 horas. Las puntas en cada planta se embolsaron individualmente antes de la floración para evitar el cruce.

Aunque en ciertas realizaciones se han descrito aspectos de esta invención, pueden modificarse adicionalmente dentro del alcance de esta descripción. Por tanto, esta solicitud está destinada a cubrir cualquier variación, uso o

adaptación de las realizaciones de la invención usando sus principios generales. Además, esta solicitud está destinada a cubrir tales desviaciones de la presente descripción que se encuentran dentro de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que pertenecen estas realizaciones y que están dentro de los límites de las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

5 <110> Dow Agrosiences
Lira, Justin
Cicchillo, Robert
Yerkes, Carla
Robinson, Andrew

10 <120> PLANTAS RESISTENTES AL GLIFOSATO Y MÉTODOS ASOCIADOS
<130> 2971-P10153.1US (68831)
<160> 145
<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1
<211> 415
<212> PRT
<213> Streptomyces sveticus

<400> 1
Met Arg Gly Met Pro Ala Leu Ser Leu Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr
1 5 10 15
Ala Arg Ala Leu Phe Leu Ala Ala Ala Asp Gly Val Thr Thr Leu
20 25 30
Val Arg Pro Leu Arg Ser Asp Asp Thr Glu Gly Phe Ala Glu Gly Leu
35 40 45
Val Arg Leu Gly Tyr Arg Val Gly Arg Thr Pro Asp Thr Trp Gln Val
50 55 60
Asp Gly Arg Pro Gln Gly Pro Ala Val Ala Glu Ala Asp Val Tyr Cys
65 70 75 80
Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro Thr Leu Ala Ala Ala
85 90 95
Gly His Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser Pro Gln Met Arg Arg Arg
100 105 110
Pro Leu Leu Pro Leu Ser Arg Ala Leu Arg Asp Leu Gly Val Asp Leu
115 120 125
Arg His Glu Glu Ala Glu Gly His His Pro Leu Thr Val Arg Ala Ala
130 135 140
Gly Val Glu Gly Gly Glu Val Thr Leu Asp Ala Gly Gln Ser Ser Gln
145 150 155 160

ES 2 716 481 T3

Tyr Leu Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Pro Leu Thr Arg Gln Gly Leu
 165 170 175
 Arg Ile Arg Val Thr Asp Leu Val Ser Ala Pro Tyr Val Glu Ile Thr
 180 185 190
 Leu Ala Met Met Arg Ala Phe Gly Val Glu Val Ala Arg Glu Gly Asp
 195 200 205
 Val Phe Val Val Pro Pro Gly Gly Tyr Arg Ala Thr Thr Tyr Ala Ile
 210 215 220
 Glu Pro Asp Ala Ser Thr Ala Ser Tyr Phe Phe Ala Ala Ala Ala Leu
 225 230 235 240
 Thr Pro Gly Ala Glu Val Thr Val Pro Gly Leu Gly Thr Gly Ala Leu
 245 250 255
 Gln Gly Asp Leu Gly Phe Val Asp Val Leu Arg Arg Met Gly Ala Glu
 260 265 270
 Val Ser Val Gly Ala Asp Ala Thr Thr Val Arg Gly Thr Gly Glu Leu
 275 280 285
 Arg Gly Leu Thr Ala Asn Met Arg Asp Ile Ser Asp Thr Met Pro Thr
 290 295 300
 Leu Ala Ala Ile Ala Pro Phe Ala Ser Ala Pro Val Arg Ile Glu Asp
 305 310 315 320
 Val Ala Asn Thr Arg Val Lys Glu Cys Asp Arg Leu Glu Ala Cys Ala
 325 330 335
 Glu Asn Leu Arg Arg Leu Gly Val Arg Val Ala Thr Gly Pro Asp Trp
 340 345 350
 Ile Glu Ile His Pro Gly Pro Ala Thr Gly Ala Gln Val Thr Ser Tyr
 355 360 365
 Gly Asp His Arg Ile Val Met Ser Phe Ala Val Thr Gly Leu Arg Val
 370 375 380
 Pro Gly Ile Ser Phe Asp Asp Pro Gly Cys Val Arg Lys Thr Phe Pro
 385 390 395 400
 Gly Phe His Glu Ala Phe Ala Glu Leu Arg Arg Gly Ile Gly Ser
 405 410 415

<210> 2

<211> 1248

<212> ADN

<213> Streptomyces svaceus

<400> 2

ES 2 716 481 T3

atgagagggg	tgccagcctt	gtctttacct	ggatcaaaga	gtatcacagc	tagggcactc	60
tttcttgctg	ctgctgctga	tggggttact	actttggtga	ggccattgag	aagtgacgac	120
acagaaggat	tcgctgaggg	gttagttcgt	ttaggctatc	gtgtagggag	gacacccgat	180
acttggaag	tcgatggcag	accacaagga	ccagcagtgg	ctgaggctga	cgtctactgt	240
agagacggag	caaccaccgc	tagattcttg	ccaaccttag	cagctgctgg	tcacggaaca	300
tacagatttg	atgcttcacc	acagatgagg	agacgtcctc	ttttgccctt	aagcagagcc	360
ttgagggatt	tgggtgtcga	tcttagacac	gaagaagctg	aagggtcatca	ccctctgact	420
gtccgtgctg	ctggggttga	aggaggagag	gttacttttg	atgctggtca	gtcaagtcag	480
tatctcactg	ccttggtgct	ccttggtccc	cttacaagac	aaggactgag	gataaggggt	540
actgatttgg	tgtcagcacc	atacgtggag	attacgcttg	caatgatgag	ggctttcgga	600
gttgaagtgg	caagggaggg	agatgtgttc	gttggtccac	ctggtggata	tcgtgcaact	660
acgtatgcta	tagaaccgga	cgcaagtact	gcttcttact	tcttcgcagc	tgctgctttg	720
actcctggag	ctgaagtgac	tgtacctggg	ttaggcacgg	gagcacttca	aggagatttg	780
ggattttag	atgtcttaag	gagaatggga	gccgaggtgt	ccgtaggagc	tgatgcaacc	840
actgttagag	gaactggtga	attgctgggc	cttacagcca	acatgagaga	cataagtgat	900
acgatgccga	ccctcgctgc	aatagcaccc	tttgctagtg	ctccagttag	aatcgaggat	960
gttgccaaca	ctcgtgtcaa	agaatgtgac	agacttgagg	cttgtgcaga	gaaccttagg	1020
aggttgggag	taagggttgc	aacgggtccg	gactggattg	agatacacc	tggtccagct	1080
actggtgctc	aagtcacaag	ctatggtgat	cacagaattg	tgatgtcatt	tgcagtgact	1140
ggacttcgtg	tgcttgggat	cagcttcgac	gaccctggct	gtgttcgtaa	gacttttcct	1200
gggtttcacg	aggctttcgc	agaattgagg	cgtggcattg	ggagctga		1248

<210> 3

<211> 1251

<212> ADN

5 <213> Streptomyces sviveus

<400> 3

atggcaagag	ggatgccagc	cttgtcgctg	cctggctcaa	agtcgatcac	ggctagagca	60
ctctttctcg	cagcagcagc	cgacggagtc	accacgcttg	tgagaccgct	gcggtcagac	120
gacaccgagg	gttttgcgga	aggcctcgtc	agactgggct	atcgggttgg	gaggactccc	180

ES 2 716 481 T3

gacacgtggc aagtggacgg aaggccacaa ggtccagcag ttgccgaggc tgatgtgtat	240
tgtagagacg gtgcaacaac ggctaggttc ctccccacac tcgcagctgc tggacacggg	300
acctacagat ttgatgcctc tccccagatg aggagaaggc cactgctgcc tctttctagg	360
gctttgaggg accttggcgt tgatcttcgc cacgaggaag cggaaggga ccaccccttg	420
accgtgagag ctgctggagt cgagggaggt gaggttacac tcgatgctgg acagtctctt	480
cagtacttga cggcactgct gctgctcggc ccgctcacac gccaaagggt gcggattcgc	540
gtcactgata tggtagcgc tccgtacgtg gagattacac ttgcgatgat gagagctttt	600
ggggctcagg ttgcacgcga aggcgacgtt ttcgtggtgc ctctggtgg ctacagagcg	660
actacgtacg cgattgagcc agatgccagc accgcaagct acttctttgc agctgctgcg	720
ttgacacctg gagccgaggt cacagtgcct ggactcggga ccggagcgct tcaaggggat	780
ctcggcttcg tggacgtgct gcggaggatg ggtgccgagg tcagcgtggg agcagacgct	840
acgactgtta gaggcacggg tgagcttaga ggccttacag caaacatgag ggacatatcc	900
gacacgatgc cgacgcttgc tgccatcgct ccgttcgctt cagcacccgt cagaattgaa	960
gatgtggcga aactcgcgt caaagagtgc gacagacttg aagcgtgtgc cgagaacttg	1020
aggaggttgg gagtgagagt cgcaactggt ccagactgga tcgagatcca ccctggtcca	1080
gctactggag cgcaagtcac aagctatggc gaccatagga ttgttatgtc attcgagtg	1140
accggactca gagttcctgg gatctcttcc gacgacctg gttgctgctg gaaaacgttc	1200
cctggcttcc acgaggcatt tgccgagctg cggagaggaa ttggttcctg a	1251

<210> 4

<211> 1248

<212> ADN

5 <213> Streptomyces sviceus

<400> 4

atgcgtggta tgcctgcact gagcctgcct ggtagcaaaa gcattaccgc acgtgcactg	60
tttctggctg cagcagcaga tgggtgtacc accctggttc gtctctgctg ttctgatgat	120
accgaagggt ttgcagaagg tctgggtcgt ctgggttata gtgttggtcg tacaccggat	180
acctggcaag ttgatggtcg tccgcagggt ccggcagttg ccgaagcaga tgtttattgc	240
cgtgatggtg caaccaccgc acgttttctg ccgacctggt cagcagccgg tcatggcacc	300
tatcgttttg atgcatctcc gcagatgcgt cgtcgtccgc tgctgccgct gtctcgtgca	360
ctgctgatac tgggtgttga tctgctcat gaagaagcag aaggtcatca tccgctgacc	420
gttcgtgcag ccggtgttga aggtggtgaa gtgacctggt atgccggtca gagcagccag	480
tatctgaccg cactgctgct gctgggtccg ctgacacgtc agggctctgcg tattcgtggt	540
accgatctgg ttagcgcacc gtatgtggaa attaccctgg caatgatgcg tgcatttggt	600

ES 2 716 481 T3

gttgaagttg	cacgtgaagg	tgatgttttt	gttgttccgc	ctggtggtta	tcgcgcaacc	660
acctatgcaa	ttgaaccgga	tgcaagcacc	gcaagctatt	tttttgcagc	agcagccctg	720
acaccgggtg	cagaagttac	cgttcctggt	ctgggcacag	gtgcactgca	gggtgatctg	780
ggatttggtg	atgttctgcg	tcgtatgggt	gccgaagtta	gcgttggtgc	agatgccacc	840
accgttcgtg	gtacaggtga	actgctggtg	ctgaccgcaa	atatgctgta	tattagcgat	900
accatgccga	cactggctgc	aattgcaccg	tttgcaagcg	caccggttcg	tattgaagat	960
gttgccaaca	cccgtgttaa	agaatgtgat	cgcttggaag	catgtgcaga	aaatctgcgt	1020
cgtctgggcg	ttcgtgttgc	aaccgggtccg	gattggattg	aaattcatcc	gggtccggca	1080
accggtgcac	aggttaccag	ctatggtgat	catcgatctg	ttatgagctt	tgcagttacc	1140
ggctctcgctg	ttccgggtat	tagctttgat	gatccgggtt	gtgttcgtaa	aacctttccg	1200
ggttttcatg	aagcttttgc	agaactgcgt	cgtggtattg	gtagctaa		1248

<210> 5

<211> 1599

<212> ADN

5 <213> Glycine max

<400> 5

atggctcaag	tctcccgtgt	tcacaatctt	gctcagtcaa	cccaaactctt	tggacattca	60
agcaactcaa	acaaactgaa	gtctgtgaat	tctgtctcac	ttcgcccacg	cctttgggga	120
gcatccaaga	gtcgcatacc	aatgcacaag	aatgggagtt	tcattgggcaa	cttcaatggt	180
gggaaaggca	attctggtgt	cttcaaagtt	tcagcttctg	ttgcagccgc	agagaaaccc	240
agcacttccc	ctgagattgt	tcttgaaccc	attaaggact	tcagtggaac	aatcactctg	300
cctggatcaa	agagtctttc	aaacagaata	cttctcttgg	cagctctgag	tgaaggaacc	360
actgtagtgt	acaacctttt	gtactctgaa	gatattcatt	acatgttggg	tgctctcaga	420
actcttgggt	tgagagttga	agatgacaag	accacaaaac	aagccatagt	tgaaggatgt	480
gggtgggtgt	ttccaacaag	caaagaatcc	aaagatgaga	tcaacttggt	tcttggcaat	540
gctggaattg	caatgagaag	cctcactgct	gcagttagttg	cagctgggtg	gaatgcaagt	600
tatgtccttg	atggtgtccc	cagaatgagg	gaaaggccca	tcggtgacct	tgtggctggc	660
ctgaaacagc	ttggagcaga	tggtgattgc	ttcttgggca	caaactgccc	tccagtgaga	720
gtgaatggga	agggagggtt	gcctggtgga	aagggtcaaac	tgagtggatc	agtctcttcc	780
cagtatctga	ctgccttgct	catggctgcc	cctctggctt	tgggtgatgt	ggagattgaa	840
atagtggaca	agttgatttc	tgttccatat	gtggaaatga	ccctcaaact	catggagagg	900
tttgaggttt	ctgttgaaca	ttctggcaac	tgggatcggt	tccttgatca	tggaggtcag	960
aagtacaaaa	gccctggcaa	tgcttttggt	gaaggggatg	caagctctgc	ttcctatctc	1020

ES 2 716 481 T3

ttggctgggg	ctgccatcac	tggtgggacc	atcactgtga	atggctgtgg	cacctcatcc	1080
cttcaagggtg	atgtaaagtt	tgagaggtc	ttggagaaaa	tggtgcca	ggcacctgg	1140
tctgagaaca	gtgtaactgt	gtctggacct	cccagagact	tcagtggcag	aaaggttctc	1200
cgtggaattg	atgtgaacat	gaacaagatg	ccagatgtgg	ccatgaccct	cgctgttgta	1260
gccctgtttg	caaattggacc	aactgcaatc	cgatgtgtg	cttcatggag	gggaaggag	1320
acagagagga	tgattgccat	ttgcacagaa	ctccgcaaac	ttggtgcaac	agttgaagag	1380
ggaccagatt	actgtgtgat	aacccacct	gagaagctca	atgtgacagc	cattgacacc	1440
tatgatgacc	acagaatggc	aatggctttc	tcccttgctg	cctgtggtga	tgtgcctgtg	1500
actatcaaag	accctgggtg	cacaaggaag	acatttccag	actactttga	agttttggag	1560
aggttgacaa	agcactgagt	agttagctta	atcacctag			1599

<210> 6

<211> 1551

<212> ADN

5 <213> Brassica napus

<400> 6

atggctcaat	cttcaaggat	ttgccacggt	gttcagaacc	cttgtgtgat	catatccaat	60
ctcagtaaga	gcaatcagaa	caaatacccc	ttctctgtct	ccctcaaaac	tcatacaacca	120
cgtgcatcta	gttggggatt	gaagaaaagt	gggacaatgc	tgaacggatc	agtcattagg	180
cctgtaaagg	ttacagcctc	tgtgtccacg	agtgaagg	caagcgagat	cgctttacaa	240
ccgattagag	aaatctcttg	gcttatcaag	ttgcctggct	ccaaatcact	ctccaatagg	300
atacttcttt	tggtgcact	gagtgaaggc	acaactgttg	tggaacaact	gctcaactcc	360
gatgatataca	actacatgct	tgacgccttg	aagaagttag	gactcaatgt	ggagagagat	420
agcgttaaca	atcgtgctgt	cgtagaagga	tgtggtggca	tctttcctgc	atctctggat	480
tctaagagcg	acatcgagct	ttacttgggc	aatgctgcaa	cagccatgag	accgttaact	540
gctgctgtta	ccgcagctgg	aggaaatgct	agttatgtgc	ttgatggtgt	tccaagaatg	600
agggaaaggc	caatagggga	tttggtcgtc	ggactgaaac	agctcgggtc	tgacgttgaa	660
tgtacttttag	gcacaaactg	tcctcccgtg	cgtgttaacg	caaattggtg	actgcctggt	720
ggaaagggtca	agttgtcttg	ctccatttcc	agtcaatacc	ttacggcttt	gctcatggct	780
gcaccacttg	ccttaggtga	tgtggagatt	gagatcattg	acaagctcat	atctgttccg	840
tacgtggaaa	tgacacttaa	gctgatggaa	agattcggag	tttcagccga	acattccgat	900
agctgggagc	gtttctttgt	aaagggtggg	cagaagtaca	agtctcctgg	caatgcttat	960
gtggaagggtg	acgcttcttc	agctagttag	ttcttggtg	gtgcagccat	aactggcgag	1020
acagttaccg	tggaaggatg	cggaactacc	agcctccaag	gtgatgtcaa	gttcgcagag	1080
gtgttgga	agatggggtg	caaagtttcc	tggaagagaa	actcagttac	tgtaacggga	1140
cctagtaggg	atgcttttgg	gatgcgtcac	cttagggcag	ttgacgtgaa	catgaacaag	1200
atgccagatg	tcgctatgac	tttagcagtt	gtggcactgt	ttgccgatgg	tcctacaacg	1260
attagggagc	tagcttcttg	gagagtcaaa	gaaactgaga	ggatgatcgc	catttgtact	1320
gagcttcgta	agttgggtgc	cacagttgaa	gaagggtccg	attactgctg	gattactcct	1380
ccagctaaag	ttaagcctgc	tgagattgat	acctatgatg	accacagaat	ggctatggcc	1440
tttagcctcg	ctgcatgtgc	cgatgttcca	gtcacgatca	aggaccctgg	ctgtactaga	1500
aagacatttc	ccgactactt	tcaagtgcct	gagtcaatca	cgaaacactg	a	1551

ES 2 716 481 T3

<210> 7
 <211> 1551
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

5 <400> 7
 atggtctaat cttcaaggat ttgccacggt gttcagaacc cttgtgtgat catatccaat 60
 cttagtaaga gcaatcagaa caaatcaccc ttctctgtct ccctcaaaac tcatcaacca 120
 cgtgcatcta gttggggatt gaagaaaagc ggaacaatgc tgaacggatc agtcattagg 180
 cctgtaaagg ttactgcatc tgtgtccacg agtgaaaagg caagcgagat cgtcttacia 240
 ccgattagag aaatctctgg gcttatcaag ttgcctggct ccaaactact ctccaatagg 300
 atacttcttt tggctgcact gagtgaaggc acaactggtt tggacaactt gctcaactcc 360
 gatgatatac actacatgct tgacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat 420
 agcgttaaca atcgtgctgt cgtagaagga tgtgggtgaa tctttcctgc atctctggat 480
 tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgctgcaa cagccatgag atccttaact 540
 gctgctgtta ccgcagctgg tggaaatgct agttatgtgc ttgatgggtg tccaagaatg 600
 agggaaaggc caatagggga tttggctcgtc ggactcaaac agctcgggtc tgacgttgaa 660
 tgtactttag gcacaaactg tcctcccgtg cgtgttaacg caaatgggtg actgcctggg 720
 ggaaaagtca agttgtctgg ctccatttcc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct 780
 gcaccacttg ccttaggtga tgtggagatt gagatcattg acaagctcat atctgttccg 840
 tacgtggaaa tgacacttaa gctgatggaa agattcggag tttcagccga acattccgat 900
 agctggggtc gtttctttgt aaagggaggc cagaagtaca agtctcctgg aaacgcatac 960
 gtggaagggt acgcttcttc agctagttag ttcttggctg gtgcagccat aactggcgag 1020
 acagttaccg tgggaaggat cggaactacc agcctccaag gtgatgtcaa gttcgagag 1080
 gtgttggaag agatgggggt caaagtttcc tggacagaga actcagttac tgtaacggga 1140
 cctagtaggg atgcttttgg gatgcgtcac cttagagccg ttgacgtgaa catgaacaag 1200
 atgccagatg tcgctatgac cttagctgtg gttgcaactg ttgccgatgg tcctacaacg 1260
 attagggacg tagcctcttg gagagtcaaa gaaaccgaga ggatgatcgc cttttgtact 1320
 gagcttcgta agttgggtgc cacagttgaa gaaggggtcc attactgctg gattactcct 1380
 ccagctaaag ttaagccagc agagattgat acctatgatg accacagaat ggctatggct 1440
 ttcagcctcg ctgcatgtgc cgatgttcca gtcacgatca aggaccctgg ctgtactaga 1500
 aagacatttc ccgactactt tcaagtgcct gagtcaatca cgaaacactg a 1551

10 <210> 8
 <211> 1551
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

<400> 8

ES 2 716 481 T3

atggctcaat cttcaaggat ttgccacggt gttcagaacc cttgtgtgat catatccaat	60
ctcagtaaga gcaatcagaa caaatcaccc ttctctgtct ccctgaaaac tcatcaacca	120
cgtgcatcta gttggggatt gaagaaaagt ggcacaatgc tgaacggatc agtcattagg	180
cctgtaaagg ttacagcctc tgtgtccacg agtgaaaagg caagcgagat cgtcttacia	240
ccgattagag aaatctctgg gcttatcaag ttgcctggct ccaaactact ctccaatagg	300
atacttcttt tggctgcact gagtgaaggg acaactgttg tggacaactt gctcaactcc	360
gatgatatac actacatgct tgacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat	420
agcgttaaca atcgtgctgt cgtagaagga tgtggtggaa tctttcctgc atctctggat	480
tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgctggca tcgccatgag atccttaact	540
gctgctgtta ccgcagctgg tggaaatgct agttatgtgc ttgatggtgt tccaagaatg	600
agggaaaggc caatagggga tttggtgtgc ggactcaaac agctcgggtc tgacgttgaa	660
tgtacttttag gcacaaactg tcctcccgtg cgtgttaacg caaatggtgg actgcctggt	720
ggaaaaggta agttgtctgg ctccatttcc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct	780
gcaccacttg ccttaggtga tgtggagatt gagatcattg acaagctcat atctgttccg	840
tacgtggaaa tgacacttaa gctgatggaa agattcggag tttcagccga acattccgat	900
agctgggata gtttcttcgt aaagggaggg cagaagtaca agtctcctgg gaacgcatac	960
glggaagggt acgcttcttc agctagttaac ttcttggctg gtgcagccat aactggcgag	1020
acagttaccg tgggaaggat cggaactacc agccttcaag gtgatgtcaa gttcgagag	1080
gtgttggaag agatgggggt caaagtttcc tggacagaga actcagttac tgtaacggga	1140
cctagtaggg atgcttttgg aatgagacac cttagggcag ttgacgtgaa catgaacaag	1200
atgccagatg tcgctatgac tttagctgta gtggcactgt tcgcagatgg tcctacaacg	1260
ataagggacg tagcctcttg gagagtcaaa gaaaccgaga ggatgatcgc cttttgtact	1320
gagcttcgta agttgggtgc cacagttgaa gaaggggccg attactgctg gattactcct	1380
ccagctaaag ttaagccagc agagattgat acctatgatg accacagaat ggctatggcc	1440
tttagcctcg ctgcatgtgc cgatgttcca gtcacgatca aggaccctgg ctgtactaga	1500
aagacatttc ccgactactt tcaagtgcct gagtcaatca cgaaacactg a	1551

<210> 9

<211> 1533

<212> ADN

<213> Triticum aestivum

<400> 9

5

ES 2 716 481 T3

atggcaatgg ctgctgctgc tactatggct gcaagcgctt cctcttccgc tgtgagctta	60
gacagagcag ctccagcacc atctaggcgt ctgccaatgc cagcagctag accagctagg	120
agaggtgcag tccgtttgtg gggaccaagg ggagcagctg cacgtgctac aagtgtcgca	180
gcaccagcag caccgagtgg agctgaggaa gtcgtgcttc aacctatcag agagatcagc	240
ggtgccgtcc agctccctgg gtcaaagtca cttagcaaca gaatacttct tttgagcgca	300
ttgtcagagg gcacgacagt ggtggataac cttctgaact ctgaagatgt tcactacatg	360
cttgaggctt tggaggcatt aggtctttct gttgaagccg ataaggttgc taagcgtgct	420
gtggtggttg gttgcggagg gagattccca gttgagaaag atgctcaaga ggaagttaag	480
ctgtttcttg gaaatgctgg gattgcaatg aggagcttga ctgctgctgt ggttgctgct	540
ggtggaaatg ccacatacgt ccttgatgga gtgcctagaa tgagagagag accgattggg	600
gatctggtgg ttggccttca gcaacttga gacagcgtg actgctttct tggaacaaac	660
tgtccacccg ttaggatcaa cgggaaagga ggtctccctg gtgggaaggt taagtgtctt	720
ggatcaatct ctagtcatga tctgtcatca cttctcatgg ctgcacctct tgcacttgaa	780
gatgttgaga ttgaaatcat agacaaactc atatcagttc catacgtgga aatgacgctg	840
aagctgatgg agaggttcgg agtgacagca gagcactcag attcttggga taggttctac	900
atcaaggagg gtcagaagta caaatcacct gggaaacgctt acgtggaagg tgatgcctct	960
tctgcttctt acttcctcgc tggagcagca atcaccggag gaactgttac tgtcgaaggt	1020
tgcggaacta cttccttgca aggggacgtc aagttcgag aagtcttaga aatgatggga	1080
gctaaagtta cttggaccga tacaagtgtt acagtgactg gtcctccacg tcaacccttt	1140
ggaaggaagc acctcaaagc cgttgatgtt aacatgaaca agatgccaga tgtcgccatg	1200
acgcttgccg ttgtggctct gttcgcagat ggtccacag ccattagaga cgtggccagc	1260
tggaggggtga aagaaactga aaggatggtc gccattagaa cagagttaac caaacttga	1320
gctactgtgg aagagggacc cgactattgc atcattacac ctcccagaaa gctgaacata	1380
accgctattg acacttatga tgatcatcgt atggctatgg ccttttcatt agcagcttgc	1440
gctgaggtgc cagtaacat tagagatcct ggggtgacta ggaaaacttt ccctaactac	1500
ttcgatgtcc tttcaacatt cgtgaagaat tga	1533

<210> 10

<211> 1281

<212> ADN

<213> Streptomyces roseosporus

<400> 10

ES 2 716 481 T3

```

atgacggtga tagagatacc tgggtctaag tctgttacag ccagagcact gttcttggca      60
gctgctgccg atgggacgac tactcttctt agaccattgc gtagcgatga cactgagggc      120
ttcgcagaag gactgaggaa tctgggctat gctgtggaac aagaggctga taggtggcgt      180
gtccaaggca gaccagctgg accagcagcc acggaagcag atgtctattg cagagatggt      240
gccaccaccg ctaggttcct tccgacactg gcagcagcag ctgcttccgg aacctacaga      300
ttcgacgctt cagcacagat gcgtcgtcgt ccccttgctc cattgacaag ggcacttaca      360
gccttgggtg tggatcttag acacgaagga gcagacggac atcatccgct caccgttcgt      420
gcagctggca tcgaaggagg agaattgacg ctcgacgctg gcgagtccag ccaatacttg      480
acagcactgc tcatgctcgg acctcttaca acaaaggac ttcgcatcga agttacagaa      540
ctcgtctctg caccctacgt ggaaatcacc ctcgctatga tgagagactt tgggtgtggag      600
gttgagaggg aggggaatac cttcaccgtt ccaagcccat cttcaagact taggtccaat      660
agagggtggac ccataggagg ctatagagct actacgtatg ctgtcgagcc agatgcctca      720
actgcctctt acttctttgc agctgctgcc ctcactggtc gcgaggtcac agtgcctgga      780
ttggggactg gagctttgca aggtgatttg cgtttcgtgg atgtgctgag agaaatgggt      840
gccgaggtgt ctgttggtcc ggacgccaca actgtgcgct caactggcag attgagggga      900
atcactgtga acatgagaga tatctcagac acgatgccta cactcgcagc tattgcacct      960
tatgccgatg gtccagtggg gattgaagat gttgccaaca cccgtgtgaa ggagtgtgac     1020
cgtctggagg cttgtgctga gaatctgagg gcaatgggaa tcaccgtcca tacgggtccg     1080
gataggatag aaatccatcc tggaacacct aaaccgactg ggatcgccac ccacggagat     1140
caccgcatag tcatgtcatt tgccgtcgct ggccttcgca ctcctggcct cacttacgac     1200
gaccctggct gcgtgcgtaa gaccttcctt agatttcacg aggtgtttgc cgacttcgct     1260
cacgaccttg agggaaggtg a                                     1281

```

<210> 11

<211> 1248

<212> ADN

5 <213> streptomyces griseus

<400> 11

```

atgggtgcag tgacagtcac cgacattcct ggaagcaaga gcgtgacagc aagggcactc      60

```

ES 2 716 481 T3

ttcttggcag cagcagccga tggaacgaca acactgcttc gtcctctgag gtcagacgac	120
acggaggggt ttgccgaggg tcttaagaat ctcggttatg ccgttgagca agaggctgac	180
cgttggaggg tcgaaggcag accggatggt ccagctgctc cggatgcaga tgtctactgc	240
cgtgatggtg caacgactgc acgctttctt ccaaccctcg tcgcagcagc agcttctgga	300
acgtatcggt tcgacgcctc agcacagatg aggagacgtc ccttggctcc actcactagg	360
gcactgacag ctcttggcgt ggatttgaga catggtggag aggaggggtca tcatccactg	420
actgtcagag ctgttggcat agaagggtggc gatgtgtgctc ttgacgctgg tgaatcttct	480
cagtatctca cagcccttct tatgttgggt ccgttgactg ccaaagggtct tagaatcgaa	540
gtcactgatc tcgtgagcgc tccttacgtt gaaatcactc tggccatgat gagagatttc	600
ggagttgatg ttagcagaga aggaaacact ttcaccgtgc cgtccggagg ctatagagct	660
acagcctacg ctgtggagcc agacgcaagc acggcttctt acttctttgc agcagctgcc	720
ctcactggac gcgaggtgac ggtccctggg ctgggaattg gtgctcttca aggagacctt	780
cgttttgttg acgtgctgcg tgatatggga gcagaggtgt ctgttgacc agatgccacg	840
acagtgcgct caactggcag actccgtggc attacagtta ctatgagaga catttcagac	900
acgatgccaa cactcgctgc tattgcacct cacgctgatg gacccgtccg tattgaggac	960
gtggcaaaca ctctgtgcaa ggaatgtgat aggcttgagg catgtgctca aaaccttaga	1020
gctatgggaa tcacggtgca tactgggcac gattggattg agattctccc tgggactcca	1080
aagccaacgg gaatagctac gcacggagat cacagaatcg ttatgtcctt cgcagtggct	1140
ggtttgttga cccctgggct gacatacgat gatctggct cgcgccgcaa gacttttcca	1200
aggttccacg aagttttcgc tgactttgct gcatcacccc aagcctga	1248

<210> 12

<211> 1368

<212> ADN

5 <213> Glycine max

<400> 12

atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaaattgt tctggaaccg	60
attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggttagca aaagcctgag caatcgatt	120
ctgtgctggt cagcactgag cgaaggcacc accgttgttg ataactctgct gtatagcgaa	180
gatattcatt atatgctggg tgactgctg accctgggtc tgcgtgttga agatgataaa	240
accaccaaac aggccattgt tgaaggttgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc	300
aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcaggcaccg caatgcgtcc gctgaccgca	360
gcagttgttg cagccggtgg taatgcaagc tatgttctgg atggtgttcc gcgtatgcgt	420
gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggt ctgaaacagc tgggtgcaga tgttgattgt	480

ES 2 716 481 T3

```

tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggta aagggtggtct gccgggtggt 540
aaagttaaac tgagcggtag cgttagcagc cagtatctga ccgcactgct gatggcagct 600
ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat 660
gttgaaatga ccctgaaact gatggaacgt tttggtgtta gcgttgaaca tagcggtaat 720
tgggatcggt tttctggttca tgggtggccag aaatataaat ctccgggtaa tgcctttgtt 780
gaaggatgat caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cgggtgtaca 840
attaccgtta atggttgttg caccagcagc ctgcagggcg atgttaaatt tgccgaagtg 900
ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcggtccg 960
ccgcgtgatt ttagcggctg taaagtcttg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg 1020
ccggatgttg ccatgaccct ggcagttgtt gccctgtttg caaatggtcc gaccgcaatt 1080
cgtgatgttg caagctggcg tgttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa 1140
ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg 1200
gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgtatggc aatggcattt 1260
agcctggcag catgtggtga tgttccggtg accattaaag atccggggtg tacacgtaaa 1320
acctttccag attattttga agttctggaa cgcctgacca aacattaa 1368

```

<210> 13

<211> 1368

<212> ADN

5 <213> Glycine max

<400> 13

```

atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaattgt tctggaaccg 60
attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggtagca aaagcctgag caatcgtatt 120
ctgctgctgg cagcactgag cgaaggcacc accgttggtg ataatctgct gtatagcgaa 180
gatattcatt atatgctggg tgcactgcgt accctgggtc tgcgtgttga agatgataaa 240
accaccaaac aggccattgt tgaaggttgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc 300
aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcagcaaccg caatgcgtcc gctgaccgca 360
gcagttgttg cagccggtgg taatgcaagc tatgttctgg atggtgttcc gcgtatgcgt 420
gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggt ctgaaacagc tgggtgcaga tgttgattgt 480
tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggta aagggtggtct gccgggtggt 540
aaagttaaac tgagcggtag cgttagcagc cagtatctga ccgcactgct gatggcagct 600
ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat 660
gttgaaatga ccctgaaact gatggaacgt tttggtgtta gcgttgaaca tagcggtaat 720
tgggatcggt tttctggttca tgggtggccag aaatataaat ctccgggtaa tgcctttgtt 780

```

ES 2 716 481 T3

gaaggtgatg caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cgggtgtaca	840
attaccgtta atggttgtgg caccagcagc ctgcagggcg atgttaaatt tgccgaagtg	900
ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcgggtccg	960
ccgcgtgatt ttagcggctg taaagttctg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg	1020
ccggatgttg ccatgaccct ggcagttggt gccctgtttg caaatgggtcc gaccgcaatt	1080
cgtgatgttg caagctggcg tggttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa	1140
ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg	1200
gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgtatggc aatggcattt	1260
agcctggcag catgtggtga tggtccggtg accattaaag atccgggttg tacacgtaaa	1320
acctttccag attattttga agttctggaa cgcctgacca aacattaa	1368

<210> 14

<211> 1368

<212> ADN

5 <213> Glycine max

<400> 14

atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaaattgt tctggaaccg	60
attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggttagca aaagcctgag caatcgtatt	120
ctgctgctgg cagcactgag cgaaggcacc accgttgttg ataactctgct gtatagcgaa	180
gatattcatt atatgctggg tgcactgcgt accctgggtc tgcgtgttga agatgataaa	240
accaccaaac aggccattgt tgaaggttgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc	300
aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcagcaaccg caatgcgtag cctgaccgca	360
gcagttgttg cagccggttg taatgcaagc tatgttctgg atggtgttcc gcgtatgcgt	420
gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggt ctgaaacagc tgggtgcaga tgttgattgt	480
tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggta aagggtgtct gccgggtggt	540
aaagttaaac tgagcggtag cgtagcagc cagtatctga ccgcactgct gatggcagct	600
ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat	660
gttgaaatga ccctgaaact gatggaacgt tttggtgtta gcgttgaaca tagcggtaat	720
tgggatcggt tcttggttca tgggtggccag aaatataaat ctccgggtaa tgcctttggt	780
gaaggtgatg caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cgggtgtaca	840
attaccgtta atggttgtgg caccagcagc ctgcagggcg atgttaaatt tgccgaagtg	900
ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcgggtccg	960
ccgcgtgatt ttagcggctg taaagttctg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg	1020
ccggatgttg ccatgaccct ggcagttggt gccctgtttg caaatgggtcc gaccgcaatt	1080
cgtgatgttg caagctggcg tggttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa	1140
ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg	1200
gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgtatggc aatggcattt	1260
agcctggcag catgtggtga tggtccggtg accattaaag atccgggttg tacacgtaaa	1320
acctttccag attattttga agttctggaa cgcctgacca aacattaa	1368

<210> 15

<211> 1368

<212> ADN

<213> Glycine max

10

ES 2 716 481 T3

<400> 15
atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaaattgt tctggaaccg 60
attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggtagca aaagcctgag caatcgtatt 120
ctgctgctgg cagcactgag cgaaggcacc accgttggtg ataatctgct gtatagcgaa 180
gatattcatt atatgctggg tgcactgcgt accctgggtc tgcgtggtga agatgataaa 240
accaccaaac aggccattgt tgaaggttgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc 300
aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcaggcatcg caatgcgtag cctgaccgca 360
gcagttggtg cagccggtgg taatgcaagc tatgttctgg atggtggtcc gcgtatgcgt 420
gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggt ctgaaacagc tgggtgcaga tgttgattgt 480
tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggtg aagggtgtct gccgggtggt 540
aaagttaaac tgagcggtag cgtagcagc cagtatctga ccgactgct gatggcagct 600
ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat 660
gttgaatga cctgaaact gatggaacgt tttggtgtta gcgttgaaca tagcggtaat 720
tgggatcggt tttctggttca tgggtggccag aaatataaat ctccgggtaa tgcctttggt 780
gaaggtgatg caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cgggtgtaca 840
attaccgtta atggttggtg caccagcagc ctgcaggcg atgttaaatt tgccgaagtg 900
ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcggtccg 960
ccgctgtgatt ttagcggctg taaagtctg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg 1020
ccggatggtg ccatgaccct ggcagttggt gccctgtttg caaatggtcc gaccgcaatt 1080
cgtgatggtg caagctggcg tgttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa 1140
ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg 1200
gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgtatggc aatggcattt 1260
agcctggcag catgtggtga tgttccggtg accattaaag atccgggttg tacacgtaaa 1320
acctttccag attattttga agttctggaa cgcctgacca aacattaa 1368

<210> 16
<211> 1350
<212> ADN
<213> Brassica napus

<400> 16

ES 2 716 481 T3

atgaccagcg aaaaagccag cgaaattggt ctgcagccga ttcgtgaaat tagcggctctg	60
attaaactgc ctggtagcaa aagcctgagc aatcgtattc tgctgctggc agcactgagc	120
gaaggcacca ccgttggtga taatctgctg aacagcgacg atattaacta tatgctggat	180
gccctgaaaa aactgggtct gaatgttgaa cgtgatagcg ttaataatcg tgccgttggt	240
gaaggttgtg gtggcatttt tccggcaagc ctggatagca aatccgatat cgaactgtat	300
ctgggtaatg cagccaccgc aatgcgtccg ctgaccgcag cagttaccgc agccgggtgt	360
aatgcaagct atgttctgga tgggtgtccg cgtatgcgtg aacgtccgat tggatgatctg	420
gttggttggtc tgaacagct ggggtgcagat gttgaatgta ccctgggcac caattgtccg	480
cctgttcgtg ttaatgcaaa tgggtgtctg cctgggtgta aagttaaact gagcggtagc	540
attagcagcc agtatctgac cgcactgctg atggcagctc cgctggcact gggatgatgtt	600
gaaatcgaga ttattgataa actgatcagc gttccgtatg ttgaaatgac cctgaaactg	660
atggaacggt ttggtgttag cgcagaacat agcgatagct gggatcgctt ttttgtaaa	720
gggtggccaga aatataaatc tccgggtaac gcctatgttg aaggatgatgc aagcagcgca	780
tcttattttt tggcaggcgc agcaattacc ggtgaaaccg ttaccgttga aggttgcggt	840
acaaccagcc tgcagggtga tgttaaattt gccgaagtgc tggaaaaaat ggggtgtaaa	900
gtgagctgga ccgaaaatag cgttaccgtt accggtccga gccgtgatgc atttggtatg	960
cgtcatctgc gtgcagttga tgtgaacatg aacaaaatgc cggtatgttg catgaccctg	1020
gcagttgttg cactgtttgc agatgggtccg accaccattc gtgatgttg aagctggcgt	1080
gttaaagaaa ccgaacgcat gattgcaatt tgtaccgaac tgcgtaaat ggggtgcaacc	1140
gttgaagaag gtagcgatta ttgcgttatt acccctccg caaaagttaa accggcagaa	1200
atcgatacct atgatgatca tcgtatggca atggcattta gcctggcagc atgtgcagat	1260
gttccggtga ccattaaaga tccgggtgtg acacgtaaaa cttttccgga ttattttcag	1320
gtgctggaaa gcatcaccaa acactaataa	1350

<210> 17

<211> 1347

<212> ADN

5 <213> Brassica napus

<400> 17

atgaccagcg aaaaagccag cgaaattggt ctgcagccga ttcgtgaaat tagcggctctg	60
--	----

ES 2 716 481 T3

attaaactgc	ctggttagcaa	aagcctgagc	aatcgtattc	tgctgctggc	agcactgagc	120
gaaggcacca	ccgttggtga	taatctgctg	aacagcgacg	atattaacta	tatgctggat	180
gccctgaaaa	aactgggtct	gaatgttgaa	cgtgatagcg	ttaataatcg	tgccgttggt	240
gaaggttggtg	gtggcatttt	tccggcaagc	ctggatagca	aatccgatat	cgaactgtat	300
ctgggtaatg	cagccaccgc	aatgcgtagc	ctgaccgcag	cagttaccgc	agccggtggg	360
aatgcaagct	atgttctgga	tggtgttccg	cgtatgcgtg	aacgtccgat	tggtgatctg	420
gttggttggtc	tgaaacagct	gggtgcagat	gttgatgta	ccctgggcac	caattgtccg	480
cctgttcgtg	ttaatgcaaa	tggtggtctg	cctggtggta	aagttaaact	gagcggtagc	540
attagcagcc	agtatctgac	cgcactgctg	atggcagctc	cgctggcact	gggtgatggt	600
gaaatcgaga	ttattgataa	actgatcagc	gttccgtatg	ttgaaatgac	cctgaaactg	660
atggaacggt	ttggtgttag	cgcagaacat	agcgatagct	gggatcgctt	ttttgttaaa	720
gggtggccaga	aatataaatc	tccgggtaac	gcctatgttg	aagggtgatgc	aagcagcgca	780
tcttattttc	tggcaggcgc	agcaattacc	gggtgaaaccg	ttaccgttga	agggtgcggt	840
acaaccagcc	tgcagggtga	tggttaaattt	gccgaagtgc	tggaaaaaat	gggttgtaaa	900
gtgagctgga	ccgaaaatag	cgttaccgtt	accggtccga	gccgtgatgc	atttggtatg	960
cgtcatctgc	gtgcagttga	tgtgaacatg	aacaaaatgc	cggatgttgc	catgaccctg	1020
gcagtgtgtg	cactgtttgc	agatgggtccg	accaccattc	gtgatgttgc	aagctggcgt	1080
gttaaagaaa	ccgaacgcat	gattgcaatt	tgtaccgaac	tcggtaaact	gggtgcaacc	1140
gttgagaag	gtagcgatta	ttgcgttatt	accctcccg	caaaagttaa	accggcagaa	1200
atcgatacct	atgatgatca	tcgtatggca	atggcattta	gcctggcagc	atgtgcagat	1260
gttccggtga	ccattaaaga	tccgggttgt	acacgtaaaa	cctttccgga	ttattttcag	1320
gtgctggaaa	gcatcaccaa	acactaa				1347

<210> 18

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> Brassica napus

<400> 18

atgaccagcg	aaaaagccag	cgaaattggt	ctgcagccga	ttcgtgaaat	tagcggctctg	60
attaaactgc	ctggttagcaa	aagcctgagc	aatcgtattc	tgctgctggc	agcactgagc	120
gaaggcacca	ccgttggtga	taatctgctg	aacagcgacg	atattaacta	tatgctggat	180
gccctgaaaa	aactgggtct	gaatgttgaa	cgtgatagcg	ttaataatcg	tgccgttggt	240
gaaggttggtg	gtggcatttt	tccggcaagc	ctggatagca	aatccgatat	cgaactgtat	300
ctgggtaatg	caggtattgc	aatgcgtagc	ctgaccgcag	cagttaccgc	agccggtggg	360

ES 2 716 481 T3

aatgcaagct atgttctgga tgggtgttccg cgtatgcgtg aacgtccgat tggatgatctg	420
gttgtttggtc tgaacacagct ggggtgcagat gttgaatgta ccctgggcac caattgtccg	480
cctgttcgtg ttaatgcaaa tgggtggtctg cctggtggta aagttaaact gagcggtagc	540
attagcagcc agtatctgac cgcactgctg atggcagctc cgctggcact gggatgatgtt	600
gaaatcgaga ttattgataa actgatcagc gttccgtatg ttgaaatgac cctgaaactg	660
atggaacggtt ttggtgttag cgcagaacat agcgatagct gggatcgctt ttttgttaaa	720
gggtggccaga aatataaatc tccgggtaac gcctatgttg aaggatgatgc aagcagcgca	780
tcttatttttc tggcaggcgc agcaattacc ggtgaaaccg ttaccgttga aggttgccgt	840
acaaccagcc tgcagggtga tgttaaattt gccgaagtgc tggaaaaaat gggttgtaaa	900
gtgagctgga ccgaaaatag cgttaccgtt accggtccga gccgtgatgc atttggtatg	960
cgtcatctgc gtgcagttga tgtgaacatg aaaaaaatgc cggatgttgc catgaccctg	1020
gcagttgttg cactgtttgc agatgggtccg accaccattc gtgatgttgc aagctggcgt	1080
gttaaagaaa ccgaacgcat gattgcaatt tgtaccgaac tgcgtaaact ggggtgcaacc	1140
gttgaagaag gtgagcatta ttgcgttatt acccctccgg caaaagttaa accggcagaa	1200
atcgatacct atgatgatca tcgtatggca atggcattta gcctggcagc atgtgcagat	1260
gttccgggtga ccattaaaga tccgggttgt acacgtaaaa cctttccgga ttattttcag	1320
gtgctggaaa gcatcaccaa acactaataa	1350

<210> 19

<211> 1371

<212> ADN

5 <213> Triticum aestivum

<400> 19

atggcaacca gcgttgcagc accggcagct ccgtctggtg ccgaagaagt tgttctgcag	60
ccgattcgtg aaattagcgg tgcagttcag ctgcctggta gcaaaagcct gagcaatcgt	120
attctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc	180
gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat	240
aaagttgcaa aacgtgccgt tgttgttggg tgtggtgggc gttttccggt tgaaaaagat	300
gcacaggaag aagttaaact gtttctgggt aatgccggta ccgcaatgcg tccgctgacc	360
gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatgggtg tccgcgtatg	420
cgtgaacgct cgattggtga tctggttggg ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat	480
tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gtaaagggtg tctgccgggt	540
ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca	600
gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg	660

ES 2 716 481 T3

tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttgggtg ttaccgcaga acatagcgat 720
agctgggatac gcttttatat taaaggtggc cagaaatata aatctccggg taatgcctat 780
gttgaagggtg atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc 840
accgttaccg ttgaagggtg tgggtacaacc agcctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa 900
gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt 960
ccgccgcgtc agccgtttgg tcgtaaacat ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa 1020
atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca 1080
attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgttaaa gaaaccgaac gtatgggtgc aattcgtacc 1140
gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaaggtccgg attattgcat tattacaccg 1200
ccgaaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca 1260
tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt 1320
aaaacctttc cgaattattht tgatgttctg agcacctttg tgaaaaatta a 1371

<210> 20

<211> 1371

<212> ADN

5 <213> Triticum aestivum

<400> 20

atggcaacca gcgttgcagc accggcagct ccgtctgggtg ccgaagaagt tgttctgcag 60
ccgattcgtg aaatttagcgg tgcagttcag ctgcctggta gcaaaagcct gagcaatcgt 120
attctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc 180
gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat 240
aaagttgcaa aacgtgccgt tgttgttgggt tgtggtgggtc gttttccggg tgaaaaagat 300
gcacaggaag aagttaaact gtttctgggt aatgccgcaa ccgcaatgcg tccgctgacc 360
gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatgggtg tccgcgtatg 420
cgtgaacgtc cgattgggtg tctggttgggt ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat 480
tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gtaaagggtg tctgccgggt 540
ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca 600
gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg 660
tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttgggtg ttaccgcaga acatagcgat 720
agctgggatac gcttttatat taaaggtggc cagaaatata aatctccggg taatgcctat 780
gttgaagggtg atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc 840
accgttaccg ttgaagggtg tgggtacaacc agcctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa 900
gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt 960
ccgccgcgtc agccgtttgg tcgtaaacat ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa 1020
atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca 1080
attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgttaaa gaaaccgaac gtatgggtgc aattcgtacc 1140
gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaaggtccgg attattgcat tattacaccg 1200
ccgaaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca 1260
tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt 1320
aaaacctttc cgaattattht tgatgttctg agcacctttg tgaaaaatta a 1371

10 <210> 21

ES 2 716 481 T3

<211> 1371
 <212> ADN
 <213> Triticum aestivum

<400> 21
 atggcaacca gcgttgcagc accggcagct ccgtctggtg ccgaagaagt tgttctgcag 60
 ccgattcgtg aaattagcgg tgcagttcag ctgcctggta gcaaaagcct gagcaatcgt 120
 atttctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc 180
 gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat 240
 aaagttgcaa aacgtgccgt tgttggtggt tgtggtgggc gttttccggt tgaaaaagat 300
 gcacaggaag aagttaaact gtttctgggt aatgccgcaa ccgcaatgcg tagcctgacc 360
 gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatggtgt tccgcgtatg 420
 cgtgaacgctc cgattggtga tctggttggt ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat 480
 tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gtaaagggtg tctgccgggt 540
 ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca 600
 gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg 660
 tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttggtg ttaccgcaga acatagcgat 720
 agctgggatac gcttttatat taaagggtggc cagaaatata aatctccggg taatgcctat 780
 gttgaagggtg atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc 840
 accgttaccg ttgaagggtg tggtaacaacc agcctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa 900
 gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt 960
 ccgccgcgtc agccggttgg tcgtaaacat ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa 1020
 atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca 1080
 attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgtttaa gaaaccgaac gtatggttgc aattcgtacc 1140
 gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaagggtccg attattgcat tattacaccg 1200
 5 ccggaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca 1260
 tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt 1320
 aaaacctttc cgaattattt tgatgttctg agcacctttg tgaaaaatta a 1371

<210> 22
 <211> 1371
 <212> ADN
 <213> Triticum aestivum

<400> 22

ES 2 716 481 T3

atggcaacca gcgttgacgc accggcagct ccgtctggtg ccgaagaagt tgttctgcag	60
ccgattcgtg aaattagcgg tgcagttcag ctgcctggtg gcaaaagcct gagcaatcgt	120
attctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc	180
gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat	240
aaagttgcaa aacgtgccgt tggtgttggt tgtggtggtc gttttccggt tgaaaaagat	300
gcacaggaag aagttaaact gtttctgggt aatgccggtg ttgcaatgcg tagcctgacc	360
gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatggtgt tccgcgtatg	420
cgtgaacgtc cgattggtga tctggttggt ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat	480
tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gttaaagggtg tctgccgggt	540
ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca	600
gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg	660
tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttggtg ttaccgcaga acatagcgat	720
agctgggatac gcttttatat taaagggtggc cagaaatata aatctccggg taatgcctat	780
gttgaagggtg atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc	840
accgttaccg ttgaagggtg tggtaacaacc agcctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa	900
gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt	960
ccgccgcgtc agccggttgg tcgtaaacat ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa	1020
atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca	1080
attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgtttaa gaaaccgaac gtatgggtgc aattcgtacc	1140
gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaagggtccg attattgcat tattacaccg	1200
ccggaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca	1260
tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt	1320
aaaacctttc cgaattattt tgatgttctg agcacctttg tgaaaaatta a	1371

<210> 23

<211> 1281

<212> ADN

5 <213> Streptomyces roseosporus

<400> 23

ES 2 716 481 T3

atgaccgtta ttgaaattcc gggtagcaaa agcgttaccg cacgtgcact gtttctggca	60
gcagcagcag atggcaccac caccctgctg cgtccgctgc gtagtgatga taccgaaggt	120
tttgagaag gtctgcgtaa tctgggttat gcagttgaac aggaagcaga tcgttggcgc	180
gttcagggtc gtccggcagg tccggctgca accgaagcag atgtttattg tcgtgatggt	240
gcaaccaccg cacgttttct gcctaccctg gcagccgcag ccgcaagcgg cacctatcgt	300
tttgatgcaa gcgcacagat gcgtcgtcgt ccgctggcac cgctgacccg tgcactgacc	360
gcactgggtg ttgatctgctg tcatgaaggt gcagatgggt atcatccgct gaccgttcgt	420
gcagcaggta ttgaaggtgg tgaactgacc ctggatgccg gtgaaagcag ccagtatctg	480
accgctctgc tgatgctggg tcctctgacc accaaagggtc tgcgcattga agttaccgaa	540
ctggttagcg caccgtatgt ggaaattacc ctggcaatga tgcgcgattt tgggtgtgaa	600
gttgaacgtg aaggcaatac ctttaccgtt ccgagcccga gcagccgtct gcgtagcaat	660
cgtggtgggt cgattgggtg ttatcgtgca accacctatg ccgttgaacc ggatgcaagc	720
accgcaagct atttttttgc agcagcagcc ctgaccgggtc gtgaagttac cgttccgggt	780
ctgggcacag gtgcactgca gggatgatctg cgttttgttg atgttctgctg tgaaatgggt	840
gcagaagtta gcgttggtcc ggatgccacc accgttcgta gcaccggctc tctgcgtggt	900
attaccgtta atatgcgtga tattagcgat accatgccga cactggctgc aattgcaccg	960
tatgcagatg gtccggttgt tattgaagat gttgcaata cccgtgtgaa agaattgat	1020
cgtctggaag catgtgcaga aaatctgcgt gccatgggta ttaccgtgca taccgggtccg	1080
gatcgatttg aaattcatcc gggtagaccg aaaccgaccg gtattgcaac ccatggtgat	1140
catcgatttg ttatgagctt tgcagttgca ggtctgcgta caccgggtct gacctatgat	1200
gatccgggtt gtgttcgtaa aacctttccg cgttttcatg aagtgtttgc agattttgcc	1260
catgatctgg aaggctcgta a	1281

<210> 24

<211> 1248

<212> ADN

5 <213> Streptomyces griseus

<400> 24

atgggtgcag ttaccgttat tgatattccg ggtagcaaaa gcgttaccgc acgtgcactg	60
tttctggcag cagcagcaga tggcaccacc accctgctgc gtccgctgcg tagtgatgat	120
accgaagggt ttgcagaagg tctgaaaaat ctgggttatg cagttgaaca ggaagcagat	180
cgttgccgcg ttgaaggctc tccggatggt ccggcagcac cggatgcaga tgtttattgt	240
cgtgatgggt caaccaccgc acgttttctg ccgaccctgg ttgcagcagc agccagcggc	300
acctatcggt ttgatgcaag gcgcacagat gcgtcgtcgt cgctggcacc gctgaccgt	360

ES 2 716 481 T3

gcactgaccg cactgggtgt tgatctgctg catgggtggtg aagaagggtca tcatccgctg 420
accgttcgtg cagcaggtat tgaagggtgt gatgttggtt tggatgccgg tgaaagcagc 480
cagtatctga ccgctctgct gatgctgggt cctctgaccg caaaagggtct gcgtattgaa 540
gttaccgatc tggtagcgc accgtatgtg gaaattaccc tggcaatgat gcgcgatttt 600
gggtgtgatg ttagccgtga aggtataacc ttaccgttc cgagcgggtg ttatcgtgca 660
accgcctatg ccgttgaacc ggatgcaagc accgcaagct atttttttgc agcagccgca 720
ctgaccgggtc gtgaagttac cggtccgggt ctgggtattg gtgactgca ggggtgatctg 780
cgttttgttg atgttctgct tgatatgggt gccgaagtta gcgttggtcc ggatgccacc 840
accgttcgta gcaccggctg tctgctggtt attaccgtta ccatgctgta tattagtgtat 900
accatgccga cactggcagc aattgcaccg catgccgatg gtccgggttcg tattgaagat 960
gttgcaaata cccgtgtgaa agaattgtgat cgtctggaag catgtgcaca gaatctgctg 1020
gcaatgggta ttaccgtgca taccgggtcat gattggattg aaattctgcc tggtagaccg 1080
aaaccgaccg gtattgcaac ccatgggtgat catcgtattg ttatgagctt tgcagttgca 1140
gggtctgctga caccgggtct gacctatgat gatccgggtt gtgttcgtaa aacctttccg 1200
cgttttcatg aagtgtttgc agattttgca gcaagtccgc aggcataa 1248

<210> 25

<211> 40

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 25

gatgtttatt gccgtgatgg tggaaccacc gcacgttttc 40

10 <210> 26

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 26

gaaaacgtgc ggtggttcca ccatcacggc aataaacatc 40

<210> 27

<211> 33

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 27

25 gggtagcgtg gcacgtcagg gtctgcgtat tcg 33

<210> 28

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 28

cgaatagca gaccctgacg tgccagcgga cccagcagc 39

<210> 29
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 29
 catatgaccg ttattgaaat tccggg 26

10 <210> 30
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

15 <400> 30
 gatatacctat tattaacgac ctccag 27

<210> 31
 <211> 26
 <212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 31
 catatgggtg cagttaccgt tattga 26

25 <210> 32
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 30 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 32
 gatatacctat tattatgcct gcggac 26

<210> 33
 <211> 213
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido de Tránsito al Cloroplasto

<400> 33
 atgcttgcta gacaagggtg aagtctgaga gcttctcaat gcaacgctgg acttgctaga 60
 agagtgaag ttggtgctct tgttggtcct agacctatct ctgttaacga cggtgttcct 120
 cacgtttact ctgctccact ttctgttgct agaaggctct gctctaagtc ctccattagg 180
 40 tccactagaa ggcttcaaac tactgtgtgc tct 213

<210> 34
 <211> 186
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido de Tránsito al Cloroplasto

<400> 34

ES 2 716 481 T3

	atgcaactcc tgaatcagag gcaagccctg cgtcttggtc gttcatctgc ttcaaagaac	60
	cagcaagttg ctccactggc ctctaggcct gcttcttcct tgagcgtcag cgcattccagc	120
	gtcgcacctg cacctgcttg ctctagctcct gctggagctg gaaggcgtgc tgttgctcgtg	180
	agagca	186
	<210> 35	
	<211> 198	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido de Tránsito al Cloroplasto	
	<400> 35	
	atggctcaat ctagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttccaat	60
	ctctccaaat ccaaccagaa caaatctcct ttctcagtca gcctcaagac tcaccagcag	120
	cagcgtcgtg cttaccagat atctagctgg ggattgaaga agtcaaaciaa cgggtccgtg	180
	attcgtccgg ttaaggca	198
10	<210> 36	
	<211> 198	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Péptido de Tránsito al Cloroplasto	
	<400> 36	
	atggcacaag ccagccgtat ctgccagaat ccatgtgtga tatccaatct ccccaaaagc	60
	aaccaccgta agtccccctt ctctgtctca ctcaagacgc atcagcctag agcctcttca	120
	tggggactta agaagtctgg caccatgctg aacggttcag tgattagacc cgtcaagggtg	180
	acagcttctg tttccgca	198
	<210> 37	
	<211> 225	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido de Tránsito al Cloroplasto	
	<400> 37	
	atggcacaat ctagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttcaaat	60
	ctctcaaagt ccaatcagaa caaatcacct ttctccgtct ccctcaagac acaccagcat	120
	ccaagggcat acccgataag cagctcatgg ggactcaaga agagcggaat gactctgatt	180
25	ggctctgagc ttctgtctct taaggttatg tcctctgttt ccgca	225
	<210> 38	
	<211> 207	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Péptido de Tránsito al Cloroplasto	
	<400> 38	

ES 2 716 481 T3

	atggcacaag ttagcagaat ctgtaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc	60
	tcaaagtcca gccaacgtaa gtctccccctc agcgtgtctc tgaaaactca gcagcccaga	120
	gcttcttcat ggggtttgaa gaaatctgga acgatgctta acggctcagt cattcgtccg	180
	gttaagggtga cagcctccgt ctccgct	207
	<210> 39	
	<211> 186	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido de Tránsito al Cloroplasto	
	<400> 39	
	atgataacttg gatctagccc aactctgcca cagcatcac atccagccag acctggtcct	60
	gccagaccga tttcagttaa cgacgtcgtt ccccatgtct actccgtcc tctctccgtg	120
	gctaggcgtt cttgtagcaa gtccagcatt aggtctacgc gtagattgca gaccacagtc	180
	tgctca	186
10	<210> 40	
	<211> 186	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Péptido de Tránsito al Cloroplasto	
	<400> 40	
	atggcacaga tcaacaagtc tgctaatggg gttaggaacg cttcactgat aagcaacttc	60
	tccaataccc gtcaagccaa atcccccttc tccctctcat gcggaacaag actgaagaac	120
	agcagcagag gtttgaagaa ggtggcagtt aggtcatttg gctcccgtgt caaagtgtct	180
	gcctca	186
	<210> 41	
	<211> 207	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Péptido de Tránsito al Cloroplasto	
	<400> 41	
	atgcaactgc tcaaccagag acaagccttg aggctcggga ggtcctctgc ctctaagaat	60
	cagcaagtgg caccgcttgc cagccgtccc atttctgtga acgacgtcgt gccacacgtc	120
	tacagcgcac ctctgtccgt tgctagacgc tcctgtctta agtcatcaat ccgcagcact	180
25	agaaggcttc agacgaccgt ttgttca	207
	<210> 42	
	<211> 1467	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Fusión en el marco de lectura de dgt-32 v3 y TraP14 v2	
	<400> 42	

ES 2 716 481 T3

```

atgatacttg gatctagccc aactctgcca cacgcatcac atccagccag acctggtcct      60
gccagaccga tttcagtga cgcagtcgtt ccccatgtct actccgctcc tctctccgtg      120
gctaggcggt cttgtagcaa gtccagcatt aggtctacgc gtagattgca gaccacagtc      180
tgctcaatga cggatgata gatacctggg tctaagtctg ttacagccag agcactgttc      240
ttggcagctg ctgccgatgg gacgactact cttcttagac cattgcgtag cgatgacact      300
gagggcttcg cagaaggact gaggaatctg ggctatgctg tggacaaga ggctgatagg      360
tggcgtgtcc aaggcagacc agctggacca gcagccacgg aagcagatgt ctattgcaga      420
gatggtgcca ccaccgctag gttccttccg acactggcag cagcagctgc ttccggaacc      480

--
tacagattcg acgcttcagc acagatgcgt cgtcgtcccc ttgctccatt gacaaggcca      540
cttacagcct tgggtgtgga tcttagacac gaaggagcag acggacatca tccgctcacc      600
gttcgtgcag ctggcatcga aggaggagaa ttgacgctcg acgctggcga gtccagccaa      660
tacttgacag cactgctcat gctcggacct cttacaaca agggaacttc catcgaagtt      720
acagaactcg tctctgcacc ctacgtggaa atcacctctg ctatgatgag agactttggt      780
gtggagggtg agaggaggga gaataccttc accgttccaa gccatcttc aagacttagg      840
tccaatagag gtggacccat aggaggctat agagctacta cgtatgctgt cgagccagat      900
gcctcaactg cctcttactt ctttgcagct gctgccctca ctggtcgcga ggtcacagtg      960
cctggattgg ggactggagc tttgcaagggt gatttgcgtt tcgtggatgt gctgagagaa     1020
atgggtgccg aggtgtctgt tggccggac gccacaactg tgcgtcaac tggcagattg     1080
aggggaatca ctgtgaacat gagagatatc tcagacacga tgcttacct cgcagctatt     1140
gcaccttatg ccgatggtcc agtggtgatt gaagatgttg ccaacaccg tgtgaaggag     1200
tgtgaccgtc tggaggcttg tgctgagaat ctgagggcaa tgggaatcac cgtccatacg     1260
ggtccggata ggatagaaat ccatcctgga acacctaacc cgactgggat cgccaccac     1320
ggagatcacc gcatagtcac gtcatttgcc gtcgctggcc ttcgcactcc tggcctcact     1380
tacgacgacc ctggctgctg gcgtaagacc ttccctagat ttcacgaggt gtttgccgac     1440
ttcgtcacg accttgaggg aaggtga                                     1467

```

<210> 43

5 <211> 1455

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión en el marco de lectura de dgt-33 v3 y TraP24 v2

10 <400> 43

ES 2 716 481 T3

atgcaactgc tcaaccagag acaagccttg aggctcggga ggtcctctgc ctctaagaat 60
cagcaagtgg caccgcttgc cagccgtccc atttctgtga acgacgtcgt gccacacgtc 120
tacagcgac ctctgtccgt tgctagacgc tcctgtctta agtcatcaat ccgcagcact 180
agaaggcttc agacgaccgt ttgttcaatg ggtgcagtga cagtcacga cattcctgga 240
agcaagagcg tgacagcaag ggcactcttc ttggcagcag cagccgatgg aacgacaaca 300
ctgcttcgtc ctctgaggtc agacgacacg gaggggtttg ccgaggggtct taagaatctc 360
ggttatgccg ttgagcaaga ggctgaccgt tggagggctg aaggcagacc ggatgggtcca 420
gctgctccgg atgcagatgt ctactgccgt gatgggtgaa cgactgcacg ctttcttcca 480
accctcgtcg cagcagcagc ttctggaacg tatcgtttcg acgcctcagc acagatgagg 540
agacgtccct tggctccact cactagggca ctgacagctc ttggcgtgga ttgagacat 600
gggtggagagg agggctcatca tccactgact gtcagagctg ctggcataga aggtggcgat 660
gttgtccttg acgctggtga atcttctcag tatctcacag cccttcttat gttgggtccg 720
ttgactgcca aaggctcttag aatcgaagtc actgatctcg tgagcgctcc ttacgttgaa 780
atcactctgg ccatgatgag agatttcgga gttgatgtta gcagagaagg aaacactttc 840
accgtgccgt ccggaggcta tagagctaca gcctacgctg tggagccaga cgcaagcacg 900
gcttcttact tctttgcagc agctgccctc actggacgag aggtgacggg ccctgggctg 960
ggaattggtg ctcttcaagg agaccttcgt tttgtggacg tgctgctga tatgggagca 1020
gaggtgtctg ttggaccaga tgccacgaca gtgcgtcaa ctggcagact ccgtggcatt 1080
acagttacta tgagagacat ttcagacacg atgccaacac tcgctgctat tgcacctcac 1140
gctgatggac ccgtccgtat tgaggacgtg gcaaacactc gtgtcaagga atgtgatagg 1200
cttgaggcat gtgctcaaaa ccttagagct atgggaatca cgggtgcatac tgggcacgat 1260
tggattgaga ttctccctgg gactccaaag ccaacgggaa tagctacgca cggagatcac 1320
agaatcgta tgctcttcgc agtggctggt ttgttgacct ctgggctgac atacgatgat 1380
cctggctgag tccgcaagac ttttccaagg ttccacgaag ttttcgctga ctttgctgca 1440
tcacccaag cctga 1455

- 5 <210> 44
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> secuencia de cebador oligonucleotídico
- 10 <400> 44
agccacatcc cagtaacga 19
- <210> 45
<211> 17
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> secuencia de cebador oligonucleotídico
- <400> 45
cctccctctt tgacgcc 17
- 20 <210> 46
<211> 20
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de la sonda oligonucleotídica

<400> 46

5 cagcccaatg aggcacgc 20

<210> 47

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 47

ctcaaggag attgggatt tgt 23

<210> 48

15 <211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

20 <400> 48

gagggtcggc atcgat 17

<210> 49

<211> 25

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de la sonda oligonucleotídica

<400> 49

agagaagttt cgacggattt cgggc 25

30 <210> 50

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 50

gaggattagg gttcaacgg ag 22

<210> 51

<211> 21

40 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 51

45 gagaattgag ctgagacgag g 21

<210> 52

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 52
ctgcaggatca acggatcagg atat 24

5 <210> 53
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

10 <400> 53
tgggctgaat tgaagacatg ctcc 24

<210> 54
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 54
cgtccacaaa gctgaatgtg 20

20 <210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 55
cgaagtcatg gaagccactt 20

<210> 56
<211> 23
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 56
35 ctcaaggag atttgggatt tgt 23

<210> 57
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
40 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 57
gagggtcggc atcgat 17

<210> 58
45 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

50 <400> 58

tggtcgggtc cctctaccaa 20

<210> 59
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de la sonda oligonucleotídica

<400> 59
 cacagaaccg tcgcttcagc aaca 24

10 <210> 60
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 15 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 60
 caacatccat caccttgact ga 22

<210> 61
 <211> 26
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de la sonda oligonucleotídica

<400> 61
 25 cgagcagacc gccgtgtact tctacc 26

<210> 62
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 62
 tggcggacga cgacttgt 18

<210> 63
 35 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

40 <400> 63
 aaagtttga ggctgccgt 19

<210> 64
 <211> 18
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 64
 ttcagcaccc gtcagaat 18

50 <210> 65

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> secuencia de la sonda oligonucleotídica

 <400> 65
 tgccgagaac ttgaggaggt 20

 <210> 66
 <211> 17
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 66
 15 tggtcgcat agcttgt 17

 <210> 67
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Streptomyces griseus

 20 <400> 67
 Asp Arg Trp Arg Val Glu Gly Arg Pro Asp Gly Pro Ala Ala Pro Asp
 1 5 10 15

 Ala Asp Val Tyr Cys Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro
 20 25 30

 Thr Leu Val Ala Ala Ala Ala Ser Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser
 35 40 45

 Ala Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu Ala Pro Leu Thr Arg Ala Leu Thr
 50 55 60

 Ala Leu Gly Val Asp Leu Arg His
 65 70

 <210> 68
 <211> 72
 <212> PRT
 25 <213> Streptomyces roseosporus

 <400> 68
 Asp Arg Trp Arg Val Gln Gly Arg Pro Ala Gly Pro Ala Ala Thr Glu
 1 5 10 15

 Ala Asp Val Tyr Cys Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro
 20 25 30

 Thr Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser
 35 40 45

 Ala Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu Ala Pro Leu Thr Arg Ala Leu Thr
 50 55 60

 Ala Leu Gly Val Asp Leu Arg His
 65 70

 <210> 69
 <211> 71

ES 2 716 481 T3

<212> PRT

<213> Streptomyces svaceus

<400> 69

Asp Thr Trp Gln Val Asp Gly Arg Pro Gln Gly Pro Ala Val Ala Glu
1 5 10 15

Ala Asp Val Tyr Cys Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro
20 25 30

Thr Leu Ala Ala Ala Gly His Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser Pro

5 35 40 45

Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu Leu Pro Leu Ser Arg Ala Leu Arg Asp
50 55 60

Leu Gly Val Asp Leu Arg His
65 70

<210> 70

<211> 70

<212> PRT

10 <213> desconocida

<220>

<223> origen desconocido, descrita como SEQ ID NO:29 en PAT EEUU NO 7834249

<400> 70

Asp Asp Trp Val Val Glu Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala
1 5 10 15

Asp Ile Trp Cys Glu Asp Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro
20 25 30

Phe Val Ala Ala Gly Gln Gly Lys Phe Thr Phe Asp Gly Ser Glu Gln
35 40 45

Leu Arg Arg Arg Pro Leu Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu
50 55 60

Gly Ala Arg Val Ser Ser
65 70

15 <210> 71

<211> 72

<212> PRT

<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 71

Asp Thr Trp Ile Ile Asp Gly Val Gly Asn Gly Gly Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

Glu Ala Pro Leu Asp Phe Gly Asn Ala Ala Thr Gly Cys Arg Leu Thr
20 25 30

Met Gly Leu Val Gly Val Tyr Asp Phe Asp Ser Thr Phe Ile Gly Asp
35 40 45

Ala Ser Leu Thr Lys Arg Pro Met Gly Arg Val Leu Asn Pro Leu Arg
50 55 60

20

ES 2 716 481 T3

Glu Met Gly Val Gln Val Lys Ser
65 70

<210> 72

<211> 80

<212> PRT

5 <213> Brassica napus

<400> 72

Val Asn Asn Arg Ala Val Val Glu Gly Cys Gly Gly Ile Phe Pro Ala
1 5 10 15

Ser Leu Asp Ser Lys Ser Asp Ile Glu Leu Tyr Leu Gly Asn Ala Gly
20 25 30

Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn
35 40 45

Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile
50 55 60

Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Glu Cys
65 70 75 80

<210> 73

<211> 80

<212> PRT

10 <213> Glycine max

<400> 73

Thr Thr Lys Gln Ala Ile Val Glu Gly Cys Gly Gly Leu Phe Pro Thr
1 5 10 15

Ser Lys Glu Ser Lys Asp Glu Ile Asn Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly
20 25 30

Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Gly Asn
35 40 45

Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile
50 55 60

Gly Asp Leu Val Ala Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys
65 70 75 80

<210> 74

<211> 80

<212> PRT

15 <213> Triticum aestivum

<400> 74

ES 2 716 481 T3

Val Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys Gly Gly Arg Phe Pro Val
1 5 10 15

Glu Lys Asp Ala Gln Glu Glu Val Lys Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly
20 25 30

Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Gly Asn
35 40 45

Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile
50 55 60

Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Gln Gln Leu Gly Ala Asp Ala Asp Cys
65 70 75 80

<210> 75

<211> 74

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 75

Asp Arg Thr Arg Cys Glu Ile Ile Gly Asn Gly Gly Pro Leu His Ala
1 5 10 15

Asp Gly Ala Leu Glu Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg
20 25 30

Pro Leu Ala Ala Ala Leu Cys Leu Gly Ser Asn Asp Ile Val Leu Thr
35 40 45

Gly Glu Pro Arg Met Lys Glu Arg Pro Ile Gly His Leu Val Asp Ala
50 55 60

Leu Arg Leu Gly Gly Ala Lys Ile Thr Tyr
65 70

<210> 76

<211> 516

10 <212> PRT

<213> Brassica napus

<400> 76

Met Ala Gln Ser Ser Arg Ile Cys His Gly Val Gln Asn Pro Cys Val
1 5 10 15

Ile Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Asn Gln Asn Lys Ser Pro Phe Ser

ES 2 716 481 T3

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

ES 2 716 481 T3

Ile Asp Lys Leu Ile Ser Val Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Lys Leu
275 280 285
Met Glu Arg Phe Gly Val Ser Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg
290 300
Phe Phe Val Lys Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Gly Asn Ala Tyr
305 310 315 320
Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala
325 330 335
Ile Thr Gly Glu Thr Val Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu
340 345 350
Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Lys Met Gly Cys Lys
355 360 365
Val Ser Trp Thr Glu Asn Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Ser Arg Asp
370 375 380
Ala Phe Gly Met Arg His Leu Arg Ala Val Asp Val Asn Met Asn Lys
385 390 395 400
Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp
405 410 415
Gly Pro Thr Thr Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr
420 425 430
Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys Thr Glu Leu Arg Lys Leu Gly Ala Thr
435 440 445
Val Glu Glu Gly Ser Asp Tyr Cys Val Ile Thr Pro Pro Ala Lys Val
450 455 460
Lys Pro Ala Glu Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala
465 470 475 480
Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Asp Val Pro Val Thr Ile Lys Asp Pro
485 490 495
Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asp Tyr Phe Gln Val Leu Glu Ser
500 505 510
Ile Thr Lys His
515

<210> 77

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Glycine max

<400> 77

ES 2 716 481 T3

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

ES 2 716 481 T3

Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Ser Val Glu His Ser Gly Asn
 225 230 235 240
 Trp Asp Arg Phe Leu Val His Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Gly
 245 250 255
 Asn Ala Phe Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Leu Leu Ala
 260 265 270
 Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Ile Thr Val Asn Gly Cys Gly Thr
 275 280 285
 Ser Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Lys Met
 290 295 300
 Gly Ala Lys Val Thr Trp Ser Glu Asn Ser Val Thr Val Ser Gly Pro
 305 310 315 320
 Pro Arg Asp Phe Ser Gly Arg Lys Val Leu Arg Gly Ile Asp Val Asn
 325 330 335
 Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala Leu
 340 345 350
 Phe Ala Asn Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg Val
 355 360 365
 Lys Glu Thr Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys Thr Glu Leu Arg Lys Leu
 370 375 380
 Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys Val Ile Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg Met
 405 410 415
 Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Gly Asp Val Pro Val Thr Ile
 420 425 430
 Lys Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asp Tyr Phe Glu Val
 435 440 445
 Leu Glu Arg Leu Thr Lys His
 450 455

<210> 78

<211> 456

<212> PRT

5 <213> Triticum aestivum

<400> 78

ES 2 716 481 T3

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

ES 2 716 481 T3

Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro
 245 250 255
 Gly Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe Leu
 260 265 270
 Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val Glu Gly Cys Gly
 275 280 285
 Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Met
 290 295 300
 Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Asp Thr Ser Val Thr Val Thr Gly
 305 310 315 320
 Pro Pro Arg Gln Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys Ala Val Asp Val
 325 330 335
 Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala
 340 345 350
 Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg
 355 360 365
 Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr Glu Leu Thr Lys
 370 375 380
 Leu Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys Ile Ile Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Glu Lys Leu Asn Ile Thr Ala Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg
 405 410 415
 Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu Val Pro Val Thr
 420 425 430
 Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asn Tyr Phe Asp
 435 440 445
 Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
 450 455

<210> 79

<211> 1464

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión en el marco de lectura de dgt-28 v5 y TraP4 v2

<400> 79

ES 2 716 481 T3

atgcttgcta gacaaggtgg aagtctgaga gcttctcaat gcaacgctgg acttgctaga	60
agagttgaag ttggtgctct tgttggtcct agacctatct ctgttaacga cgttggtcct	120
cacgtttact ctgctccact ttctgttgct agaaggctt gctctaagtc ctccattagg	180
tccactagaa ggcttcaaac tactgtgtgc tctgctgcaa gagggatgcc agccttgtct	240
ttacctggat caaagagtat cacagctagg gcactctttc ttgctgctgc tgcgatggg	300
gttactactt tggtagggcc attgagaagt gacgacacag aaggattcgc tgaggggtta	360
gttcgtttag gctatcgtgt agggaggaca cccgatactt ggcaagtcga tggcagacca	420
caaggaccag cagtggctga ggctgacgtc tactgtagag acggagcaac caccgctaga	480
ttcttgccaa ccttagcagc tgctgggtcac ggaacataca gatttgatgc ttcaccacag	540
atgaggagac gtcctctttt gcccttaagc agagccttga gggatttggg tgcgatctt	600
agacacgaag aagctgaagg tcatcacct ctgactgtcc gtgctgctgg ggttgaagga	660
ggagaggtta ctttgatgc tggtagtca agtcagtatc tctgctcctt gttgctcctt	720
ggtccccta caagacaagg actgaggata agggttactg atttggtgtc agcaccatac	780
gtggagatta cgcttgcaat gatgagggtt ttcggagttg aagtggcaag ggagggagat	840
gtgttcgttg ttccacctgg tggatatcgt gcaactacgt atgctataga acccgacgca	900
agtactgctt cttacttctt cgcagctgct gctttgactc ctggagctga agtgactgta	960
cctgggttag gcacgggagc acttcaagga gatttgggat ttgtagatgt ctttaaggaga	1020
atgggagccg aggtgtccgt aggagctgat gcaaccactg ttagaggaaac tggatgaattg	1080
cgtggccta cagccaacat gagagacata agtgatacga tgccgaccct cgctgcaata	1140
gcacccttg ctagtgctcc agttagaatc gaggatgttg ccaacactcg tgtcaaagaa	1200
tgtgacagac ttgaggcttg tgcagagaac cttaggaggt tgggagtaag ggttgcaacg	1260
ggtccggact ggattgagat acaccctggg ccagctactg gtgctcaagt cacaagctat	1320
ggtgatcaca gaattgtgat gtcatttgca gtgactggac ttcgtgtgcc tgggatcagc	1380
ttcgacgacc ctggctgtgt tcgtaagact tttcctgggt ttcacgaggc tttcgagaa	1440
ttgaggcgtg gcattgggag ctga	1464

<210> 80

<211> 1434

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión en el marco de lectura de dgt-28 v5 y TraP5 v2

<400> 80

ES 2 716 481 T3

atgcaactcc tgaatcagag gcaagccctg cgtcttggtc gttcatctgc ttcaaagaac	60
cagcaagttg ctccactggc ctctaggcct gcttcttcct tgagcgtcag cgcattccagc	120
gtcgcacctg cacctgcttg ctccagctcct gctggagctg gaaggcgtgc tgttgctctg	180
agagcagcaa gagggatgcc agccttgtct ttacctggat caaagagtat cacagctagg	240
gcactctttc ttgctgctgc tgcctgatggg gttactactt tggtagggcc attgagaagt	300
gacgacacag aaggattcgc tgaggggtta gttcgtttag gctatcgtgt agggaggaca	360
cccagatactt ggcaagtcga tggcagacca caaggaccag cagtggctga ggctgacgtc	420
tactgtagag acggagcaac caccgctaga ttcttgccaa ccttagcagc tgctgggtcac	480
ggaacataca gatttgatgc ttcaccacag atgaggagac gtcctctttt gcccttaagc	540
agagccttga gggatttggtg tgcctgatctt agacacgaag aagctgaagg tcatcacctt	600
ctgactgtcc gtgctgctgg ggttgaagga ggagaggtta ctttgatgc tggctcagtca	660
agtcagtatc tccactgcctt gttgctcctt ggtccctta caagacaagg actgaggata	720
agggttactg atttggtgtc agcaccatac gtggagatta cgcttgcaat gatgagggt	780
ttcggagttg aagtggcaag ggagggagat gtgttcgttg ttccacctgg tggatatcgt	840
gcaactacgt atgctataga acccgacgca agtactgctt cttacttctt cgcagctgct	900
gctttgactc ctggagctga agtgactgta cctgggttag gcacgggagc acttcaagga	960
gatttgggat ttgtagatgt cttaaggaga atgggagccg aggtgtccgt agggagctgat	1020
gcaaccactg ttagaggaac tgggtgaattg cgtggcctta cagccaacat gagagacata	1080
agtgatacga tgccgaccct cgttgcaata gcaccctttg ctagtgtctc agttagaatc	1140
gaggatgttg ccaacactcg tgtcaaagaa tgtgacagac ttgaggcttg tgcagagaac	1200
cttaggaggt tgggagtaag ggttgcaacg ggtccggact ggattgagat acaccctggt	1260
ccagctactg gtgctcaagt cacaagctat ggtgatcaca gaattgtgat gtcatttgca	1320
gtgactggac ttcgtgtgcc tgggatcagc ttcgacgacc ctggctgtgt tcgtaagact	1380
tttcctgggt ttcacgaggc tttcgagaa ttgaggcgtg gcattgggag ctga	1434

<210> 81

<211> 1446

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión en el marco de lectura de dgt-28 v5 y TraP8 v2

<400> 81

atggctcaat ctgacagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttccaat	60
---	----

ctctccaaat ccaaccagaa caaatctcct ttctcagtca gcctcaagac tcaccagcag	120
---	-----

10

ES 2 716 481 T3

cagcgtcgtg cttaccagat atctagctgg ggattgaaga agtcaaaca cgggtccgtg 180
 attcgtccgg ttaaggcagc aagagggatg ccagccttgt ctttacctgg atcaaagagt 240
 atcacagcta gggcactctt tcttgctgct gctgctgatg gggttactac tttggtgagg 300
 ccattgagaa gtgacgacac agaaggattc gctgaggggt tagttcgttt aggctatcgt 360
 gtagggagga caccgatac ttggcaagtc gatggcagac cacaaggacc agcagtggct 420
 gaggctgacg tctactgtag agacggagca accaccgcta gattcctgcc aaccttagca 480
 gctgctggct acggaacata cagatttgat gcttcaccac agatgaggag acgtcctctt 540
 ttgcccttaa gcagagcctt gagggtttg ggtgtcgtac ttagacacga agaagctgaa 600
 ggtcatcacc ctctgactgt ccgtgctgct ggggttgaag gaggagaggt tactttggat 660
 gctggtcagt caagtcagta tctcactgcc ttgttgctcc ttggtcccct tacaagacaa 720
 ggactgagga taagggttac tgatttggtg tcagcaccat acgtggagat tacgcttgca 780
 atgatgaggg ctttcggagt tgaagtggca agggagggag atgtgttcgt tgttccacct 840
 ggtggatata gtgcaactac gtatgctata gaaccgcagc caagtactgc ttcttacttc 900
 ttcgcagctg ctgctttgac tcctggagct gaagtactg tacctgggtt aggcacggga 960
 gcacttcaag gagatttggg attttagat gtcttaagga gaatgggagc cgagggtgcc 1020
 gtaggagctg atgcaaccac tgtagagga actggtgaat tgcgtggcct tacagccaac 1080
 atgagagaca taagtatac gatgccgacc ctgcgtgcaa tagcaccctt tgctagtgtc 1140
 ccagttagaa tcgaggatgt tgccaacact cgtgtcaaag aatgtgacag acttgaggct 1200
 tgtgcagaga accttaggag gttgggagta aggggtgcaa cgggtccgga ctggattgag 1260
 atacaccctg gtccagctac tgggtgctca gtcacaagct atggtgatca cagaattgtg 1320
 atgtcatttg cagtactgg acttcgtgtg cctgggatca gcttcgacga ccctggctgt 1380
 gttcgtgaaga cttttcctgg gtttcacgag gctttcgcag aattgaggcg tggcattggg 1440
 agctga 1446

<210> 82

<211> 1446

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión en el marco de lectura de dgt-28 v5 y TraP9 v2

<400> 82

atggcacaag ccagccgtat ctgccagaat ccatgtgtga tatccaatct ccccaaaagc 60
 aaccaccgta agtccccctt ctctgtctca ctcaagacgc atcagcctag agcctcttca 120
 tggggactta agaagtctgg caccatgctg aacggttcag tgattagacc cgtcaagggtg 180
 acagcttctg tttccgcagc aagagggatg ccagccttgt ctttacctgg atcaaagagt 240

10

ES 2 716 481 T3

atcacagcta	gggcactctt	tcttgctgct	gctgctgatg	gggttactac	tttggtgagg	300
ccattgagaa	gtgacgacac	agaaggattc	gctgaggggt	tagttcgttt	aggctatcgt	360
gtagggagga	cacccgatac	ttggcaagtc	gatggcagac	cacaaggacc	agcagtggct	420
gaggctgacg	tctactgtag	agacggagca	accaccgcta	gattcttgcc	aaccttagca	480
gctgctggtc	acggaacata	cagatttgat	gcttcaccac	agatgaggag	acgtcctctt	540
ttgcccttaa	gcagagcctt	gagggatttg	ggtgtcgatc	ttagacacga	agaagctgaa	600
ggtcatcacc	ctctgactgt	ccgtgctgct	ggggttgaag	gaggagaggt	tactttggat	660
gctggtcagt	caagtcagta	tctcactgcc	ttgttgctcc	ttggtcccct	tacaagacaa	720
ggactgagga	taagggttac	tgatttggtg	tcagcaccat	acgtggagat	tacgcttgca	780
atgatgaggg	ctttcggagt	tgaagtggca	agggagggag	atgtgttcgt	tgttccacct	840
ggtggatata	gtgcaactac	gtatgctata	gaacccgacg	caagtactgc	ttcttacttc	900
ttcgcagctg	ctgctttgac	tcctggagct	gaagtgactg	tacctggggt	aggcacggga	960
gcacttcaag	gagatttggg	atltttagat	gtcttaagga	gaatgggagc	cgagggtgcc	1020
gtaggagctg	atgcaaccac	tgtagagga	actggtgaat	tcgtggcct	tacagccaac	1080
atgagagaca	taagtatac	gatgccgacc	ctcgtgcaa	tagcaccctt	tgctagtgtt	1140
ccagttagaa	tcgaggatgt	tgccaacact	cgtgtcaaag	aatgtgacag	acttgaggct	1200
tgtgcagaga	accttaggag	gttgggagta	agggttgcaa	cgggtccgga	ctggattgag	1260
atacaccttg	gtccagctac	tggtgctcaa	gtcacaagct	atggtgatca	cagaattgtg	1320
atgtcatttg	cagtgactgg	acttcgtgtg	cctgggatca	gcttcgacga	ccctggctgt	1380
gttcgtaaga	cttttcctgg	gtttcacgag	gctttcgag	aattgaggcg	tggcattggg	1440
agctga						1446

<210> 83

<211> 1473

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión en el marco de lectura de dgt-28 v5 y TraP12 v2

<400> 83

atggcacaat	ctagcagaat	ctgccacggt	gtgcagaacc	catgtgtgat	catttcaaat	60
ctctcaaagt	ccaatcagaa	caaatcacct	ttctccgtct	ccctcaagac	acaccagcat	120
ccaagggcat	acccgataag	cagctcatgg	ggactcaaga	agagcggaat	gactctgatt	180
ggctctgagc	ttcgtcctct	taaggttatg	tcctctgttt	ccgcagcaag	agggatgcc	240
gccttgctct	tacctggatc	aaagagtatc	acagctaggg	cactctttct	tgctgctgct	300

10

ES 2 716 481 T3

gctgatgggg ttactacttt ggtgaggcca ttgagaagtg acgacacaga aggattcgct 360
gaggggttag ttcgttttag ctatcgtgta gggaggacac ccgatacttg gcaagtcgat 420
ggcagaccac aaggaccagc agtggctgag gctgacgtct actgtagaga cggagcaacc 480
accgctagat tcttgccaac cttagcagct gctggtcacg gaacatacag atttgatgct 540
tcaccacaga tgaggagacg tcctcttttg cccttaagca gagccttgag ggatttgggt 600
gtcgtatctta gacacgaaga agctgaaggt catcacccctc tgactgtccg tgctgctggg 660
gttgaaggag gagaggttac tttggatgct ggtcagtcaa gtcagtatct cactgccttg 720
ttgctccttg gtcccccttac aagacaagga ctgaggataa gggttactga tttggtgtca 780
gcaccatac gggagattac gcttgcaatg atgagggctt tcggagttga agtggcaagg 840
gagggagatg tggtcgttgt tccacctggt ggatatactg caactacgta tgctatagaa 900
cccgacgcaa gtactgcttc ttacttcttc gcagctgctg ctttgactcc tggagctgaa 960
gtgactgtac ctgggttagg cacgggagca cttcaaggag atttgggatt tgtagatgtc 1020
ttaaggagaa tgggagccga ggtgtccgta ggagctgatg caaccactgt tagaggaact 1080
ggtgaattgc gtggccttac agccaacatg agagacataa gtgatacgat gccgaccctc 1140
gctgcaatag caccctttgc tagtgctcca gttagaatcg aggatgttgc caacactcgt 1200
gtcaaagaat gtgacagact tgaggcttgt gcagagaacc ttaggagggtt gggagtaagg 1260
gttgcaacgg gtccggactg gattgagata caccctggtc cagctactgg tgctcaagtc 1320
acaagctatg gtgatcacag aattgtgatg tcatttgtag tgactggact tcgtgtgcct 1380
gggatcagct tcgacgacct tggctgtgtt cgtaagactt ttcctgggtt tcacgaggct 1440
ttcgcagaat tgaggcgtgg cattgggagc tga 1473

<210> 84

<211> 1455

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión en el marco de lectura de dgt-28 v5 y TraP13 v2

<400> 84

atggcacaag ttagcagaat ctgtaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc 60
tcaaagtcca gccaacgtaa gtctcccctc agcgtgtctc tgaaaactca gcagcccaga 120
gcttcttcat ggggtttgaa gaaatctgga acgatgctta acggctcagt cattcgtccg 180
gttaagggtga cagcctccgt ctccgctgct agagggatgc cagccttgctc ttacactgga 240
tcaaagagta tcacagctag ggcactcttt cttgctgctg ctgctgatgg gggttactact 300
ttggtgaggg cattgagaag tgacgacaca gaaggattcg ctgagggggtt agttcgttta 360
ggctatcgtg tagggaggac acccgatact tggcaagtcg atggcagacc acaaggacca 420

10

gcagtggctg aggctgacgt ctactgtaga gacggagcaa ccaccgctag attcttgcca 480
accttagcag ctgctgggtca cggaacatac agatttgatg cttcaccaca gatgaggaga 540
cgtcctcttt tgcccttaag cagagccttg agggatttgg gtgtcgatct tagacacgaa 600
gaagctgaag gtcacacccc tctgactgtc cgtgctgctg gggttgaagg aggagaggtt 660
actttggatg ctggtcagtc aagtcagtat ctcactgcct tgttgctcct tggccccctt 720
acaagacaag gactgaggat aagggttact gatttgggtg cagcaccata cgtggagatt 780
acgcttgcaa tgatgagggc tttcggagtt gaagtggcaa gggagggaga tgtgttcggt 840
gttcacactg gtggatatcg tgcaactacg tatgctatag aacccgacgc aagtactgct 900
tcttacttct tcgcagctgc tgctttgact cctggagctg aagtactgt acctgggtta 960
ggcacgggag cacttcaagg agatttggga tttgtagatg tcttaaggag aatgggagcc 1020
gagggtgtccg taggagctga tgcaaccact gttagaggaa ctggtgaatt gcgtggcctt 1080
acagccaaca tgagagacat aagtatacgc atgccgaccc tcgctgcaat agcacccttt 1140
gctagtgtc cagttagaat cgaggatgtt gccaacactc gtgtcaaaga atgtgacaga 1200
cttgaggctt gtgcagagaa ccttaggagg ttgggagtaa gggttgcaac ggggccggac 1260
tggattgaga tacaccctgg tccagctact ggtgctcaag tcacaagcta tggatgatcac 1320
agaattgtga tgtcatttgc agtgactgga cttcgtgtgc ctgggatcag cttcgacgac 1380
cctggctgtg ttcgtaagac ttttcctggg tttcacgagg ctttcgcaga attgaggcgt 1440
ggcattggga gctga 1455

<210> 85

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 85

gcgaagatcc aggacaagga 20

10 <210> 86

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 86

ctgcttaccg gcaaagatga g 21

<210> 87

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de la sonda oligonucleotídica

<400> 87

25 ttcccccgga ccagcagcgt 20

<210> 88

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 88
 ccgacgagaa agaccagcaa 20

 5 <210> 89
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 10 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 89
 ttaagttgtc gatcgggact gt 22

 <210> 90
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de la sonda oligonucleotídica

 <400> 90
 20 tgagcctctc gtcgccgatc acat 24

 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 91
 attttccatt cacttgcccc 20

 <210> 92
 30 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 35 <400> 92
 tgctatctgg ctgagctgc 19

 <210> 93
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de la sonda oligonucleotídica

 <400> 93
 atggtggaag ggcggttggtg a 21

 45 <210> 94
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 94
 ctcccgcgca ccgatctg 18

 <210> 95
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 95
 10 cccgcccctc tcctctttc 19

 <210> 96
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> secuencia de la sonda oligonucleotídica

 <400> 96
 aagccgcctc tcgcccacc a 21

 <210> 97
 20 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 25 <400> 97
 ggtttggtga atccctctgt tgg 24

 <210> 98
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 98
 gtggatcatga cagtatgata acagg 25

 35 <210> 99
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 99
 gggctctgcc aatgaagcga 20

 <210> 100
 <211> 26
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 100
 50 tctcgcttct ctcataacac atcgtg 26

<210> 101
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 <400> 101
 gacctctctc accctcctcc tc 22
 10 <210> 102
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico
 15 <400> 102
 ccaaataata agtgagagag gggcat 26
 <210> 103
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 <400> 103
 tagttcccct gtcgtgtgca aa 22
 25 <210> 104
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 <400> 104
 caacagcagc ctaccaatc ac 22
 <210> 105
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 <400> 105
 40 caagaacggg gtcctttt taag 24
 <210> 106
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 <400> 106
 agcccttct ctgcatcctt a 21
 50 <210> 107
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 107

5 ggctgtgttg cacacaaata gaga 24

<210> 108

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 108

cagcagcacg gtagtagat tgt 23

<210> 109

15 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

20 <400> 109

ccgataagac ggcaactgat taaa 24

<210> 110

<211> 23

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 110

aggctggctt ctagtgaag gag 23

30 <210> 111

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 111

gggtttccgg ctggagacg 19

<210> 112

<211> 28

40 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 112

45 ccaaaagcaa tttcgttat aagatgcc 28

<210> 113

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 <400> 113
 ccagataatc tgtgggctcc tg 22
 5 <210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 10 <400> 114
 gcagcagctt gccttaagca 20
 <210> 115
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 <400> 115
 tgctgtttc tgggtcatc ataggtt 27
 20 <210> 116
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 <400> 116
 catttggtg gttccacgt acg 23
 <210> 117
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 <400> 117
 35 gagcgcggct aaagtc aaa ac 22
 <210> 118
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 <400> 118
 ccgattaca tggactgat ggagt 25
 <210> 119
 45 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico
 50 <400> 119

ggtttgtga atccctctgt tgg 24

<210> 120
<211> 32
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 120
gccgcctcca gtgagtgtg ctgcttgt ag 32

10 <210> 121
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 121
gggtctgcc aatgaagcga 20

<210> 122
<211> 37
20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 122
25 gccgcctcca taatgtgtga gtagttcca gataagg 37

<210> 123
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 123
gccgcctcca gtgagtgtg ctgcttgt ag 32

<210> 124
35 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 124
40 ccaaataata agtgagagag gggcat 26

<210> 125
<211> 37
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 125
gccgcctcca taatgtgtga gtagttcca gataagg 37

50 <210> 126

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 126
 caacagcagc ctcaccaatc ac 22

 <210> 127
 <211> 37
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 127
 15 gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg 37

 <210> 128
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 128
 agcccttct ctgcatcctt a 21

 <210> 129
 25 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

 30 <400> 129
 gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg 37

 <210> 130
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 130
 cagcagcacg gtaggtagat tgt 23

 40 <210> 131
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 45 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 131
 gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag 32

 <210> 132
 <211> 23
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 132
 aggctggctt ctagtgaag gag 23

 5 <210> 133
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 10 <223> Secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 133
 gccgcctcca taatgtgtga gtagtccca gataagg 37

 <210> 134
 <211> 28
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 134
 20 ccaaaagcaa tttcgttat aagatgcc 28

 <210> 135
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 135
 gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag 32

 <210> 136
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 35 <400> 136
 gcagcagctt gccttaagca 20

 <210> 137
 <211> 37
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 137
 gccgcctcca taatgtgtga gtagtccca gataagg 37

 45 <210> 138
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

<400> 138
 catttgttg gttccacgt acg 23

 <210> 139
 <211> 32
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 139
 10 gccgcctcca gtgagtgtg ctgcttgt ag 32

 <210> 140
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> secuencia de cebador oligonucleotídico

 <400> 140
 ccgatttaca tggactgat ggagt 25

 <210> 141
 20 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia polipeptídica

 25 <400> 141
 Leu Gly Asn Ala Ala Thr
 1 5

 <210> 142
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia polipeptídica

 <220>
 <221> CARACT_MISC
 35 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Ala, Ser, o Thr

 <400> 142
 Ala Leu Leu Met Xaa Ala Pro Leu Thr
 1 5

 <210> 143
 40 <211> 1431
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> construcción de DGT-31 y TRAP23

 45 <400> 143
 atggcacaga tcaacaagtc tgctaattggg gttaggaacg cttcactgat aagcaacttc 60
 tccaataccc gtcaagccaa atcccccttc tccctctcat gcggaacaag actgaagaac 120

ES 2 716 481 T3

agcagcagag gtttgaagaa ggtggcagtt aggctcattg gctcccgtgt caaagtgtct 180
gcctcaatga ctgtgattga catccctggc tcaaagtcag ttactgccag agcattgttc 240
ctcgagcag ctgctgatgg cactacaact cttttgagac ctcttcacag cgatgacacg 300
gaaggcttca ctgagggctc cactcgtttg ggatacgagc tggttagaga acccgatagg 360
tggcacatag aaggacgtcc ctccgggtcca gcagcagcag atgcagaagt tctactgtagg 420
gacggtgcta caactgctcg ctttcttcca acccttgagc ctgctgctgc ctccggaacg 480
tatcgtttcg acgcatcagc tcagatgagg cgtagacccc tcgctcccct cacggaagct 540
cttagaacac ttggagtggg ctttaggcat gatggagctg aaggccacca ccccttgaca 600
attcaagcct ctggtgttaa gggaggagga cttacgctcg acgctggtga gtcattctcag 660
tacttgacag ctctgctcat gcttggctct ctgaccgagc agggactgag aatagaagtt 720
acggagcttg tctctgctcc ttatgtggag atcaccttg caatgatgag aggctttggt 780
gtggagggtt ttagggaggg gaatactttc actgtgcctc ctggagggtta cagagctaca 840
acttatgcca tagaaccgga cgcaagcaca gcttctact tctttgcagc agcagccctc 900
actgggaggg aagtgcggt gcctggcttg ggcactggag cacttcaagg tgatcttagg 960
ttcacggagg tcctcagaag gatggacgct gatgttcgca caacgtccga ctctacaaca 1020
gtgcgctcag atggtcgcct tgctgggttg actgtcaaca tgagggacat aagcgacaca 1080
atgccaacac tggcagctat agctccgtac gcaagctcac cagttaggat cgaggatgtc 1140
gcaaacaccc gtgtgaagga atgtgatagg ctggaggctt gcgctcagaa tctccgctca 1200
atgggcatca ccgttcgcac tggaccagat tggattgaga tccatcctgg gactcctaga 1260
ccgaccgaga tagccacaca cggtgatcat agaatcgta tgcattttgc cgtggctgga 1320
cttagaaccc ctgggatgtc ttacgatgac cctggctgag ttcgcaagac ttttctcgt 1380
tttcatgaag agtttgagc cttcgtggag cgctcatccg ctggagagtg a 1431

<210> 144

<211> 1245

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótido DGT-31 v3

<400> 144

atgactgtga ttgacatccc tggctcaaag tcagttactg ccagagcatt gttcctcgca 60
gcagctgctg atggcactac aactcttttg agacctcttc acagcgatga cacggaaggc 120
ttcactgagg gtctcactcg tttgggatac gcagtgggtta gagaaccgga taggtggcac 180
atagaaggac gtccctccgg tccagcagca gcagatgcag aagttcactg tagggacggt 240
gctacaactg ctgcttttct tccaaccctt gcagctgctg ctgcctccgg aacgtatcgt 300

10

ES 2 716 481 T3

```

ttcgacgcat cagctcagat gaggcgtaga cccctcgctc ccctcacgga agctcttaga 360
acacttggag tggaccttag gcatgatgga gctgaaggcc accacccctt gacaattcaa 420
gcctctggtg ttaaggggtg aggacttacg ctcgacgctg gtgagtcac tcagtacttg 480
acagctctgc tcctgcttg tcctctgacc gcagagggac tgagaataga agttacggag 540
cttgctcttg ctcccttatgt ggagatcacc cttgcaatga tgagaggctt tgggtgtggag 600
gttgtaggg aggggaatac tttcactgtg cctcctggag gttacagagc tacaacttat 660
gccatagaac cggacgcaag cacagcttcc tacttctttg cagcagcagc cctcactggg 720
aggggaagtga cggtccttg cttgggcact ggagcacttc aaggatgatct taggttcacg 780
gaggtcctca gaaggatgga cgctgatgtt cgcacaacgt ccgactctac aacagtgcgc 840
tcagatgggtc gccttgctgg gttgactgtc aacatgaggg acataagcga cacaatgcc 900
acactggcag ctatagctcc gtacgcaagc tcaccagtta ggatcgagga tgtcgcaaac 960
acccgtgtga agaatgtga taggctggag gcttgcgctc agaattctccg ctcaatgggc 1020
atcaccgttc gactggacc agattggatt gagatccatc ctgggactcc tagaccgacc 1080
gagatagcca cacacggtga tcatagaatc gtcatgtcat ttgccgtggc tggacttaga 1140
acccctggga tgtcttacga tgaccctggc tgcgttcgca agacttttcc tcgttttcat 1200
gaagagtttg cagccttcgt ggagcgctca tccgctggag agtga 1245

```

<210> 145

<211> 414

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> proteína DGT-31

<400> 145

Met Thr Val Ile Asp Ile Pro Gly Ser Lys Ser Val Thr Ala Arg Ala
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ala Ala Ala Ala Asp Gly Thr Thr Thr Leu Leu Arg Pro
20 25 30

Leu His Ser Asp Asp Thr Glu Gly Phe Thr Glu Gly Leu Thr Arg Leu
35 40 45

Gly Tyr Ala Val Val Arg Glu Pro Asp Arg Trp His Ile Glu Gly Arg
50 55 60

Pro Ser Gly Pro Ala Ala Asp Ala Glu Val His Cys Arg Asp Gly
65 70 75 80

10

ES 2 716 481 T3

Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro Thr Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ser
85 90 95

Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser Ala Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110

Ala Pro Leu Thr Glu Ala Leu Arg Thr Leu Gly Val Asp Leu Arg His
115 120 125

Asp Gly Ala Glu Gly His His Pro Leu Thr Ile Gln Ala Ser Gly Val
130 135 140

Lys Gly Gly Gly Leu Thr Leu Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Tyr Leu
145 150 155 160

Thr Ala Leu Leu Met Leu Gly Pro Leu Thr Ala Glu Gly Leu Arg Ile
165 170 175

Glu Val Thr Glu Leu Val Ser Ala Pro Tyr Val Glu Ile Thr Leu Ala
180 185 190

Met Met Arg Gly Phe Gly Val Glu Val Val Arg Glu Gly Asn Thr Phe
195 200 205

Thr Val Pro Pro Gly Gly Tyr Arg Ala Thr Thr Tyr Ala Ile Glu Pro
210 215 220

Asp Ala Ser Thr Ala Ser Tyr Phe Phe Ala Ala Ala Ala Leu Thr Gly
225 230 235 240

Arg Glu Val Thr Val Pro Gly Leu Gly Thr Gly Ala Leu Gln Gly Asp
245 250 255

Leu Arg Phe Thr Glu Val Leu Arg Arg Met Asp Ala Asp Val Arg Thr
260 265 270

Thr Ser Asp Ser Thr Thr Val Arg Ser Asp Gly Arg Leu Ala Gly Leu
275 280 285

Thr Val Asn Met Arg Asp Ile Ser Asp Thr Met Pro Thr Leu Ala Ala
290 295 300

Ile Ala Pro Tyr Ala Ser Ser Pro Val Arg Ile Glu Asp Val Ala Asn
305 310 315 320

Thr Arg Val Lys Glu Cys Asp Arg Leu Glu Ala Cys Ala Gln Asn Leu
325 330 335

ES 2 716 481 T3

Arg Ser Met Gly Ile Thr Val Arg Thr Gly Pro Asp Trp Ile Glu Ile
340 345 350

His Pro Gly Thr Pro Arg Pro Thr Glu Ile Ala Thr His Gly Asp His
355 360 365

Arg Ile Val Met Ser Phe Ala Val Ala Gly Leu Arg Thr Pro Gly Met
370 375 380

Ser Tyr Asp Asp Pro Gly Cys Val Arg Lys Thr Phe Pro Arg Phe His
385 390 395 400

Glu Glu Phe Ala Ala Phe Val Glu Arg Ser Ser Ala Gly Glu
405 410

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfatasa sintasa (EPSPS) que confiere tolerancia al glifosato a una planta, en donde la EPSPS es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 y cuando se alinea con la SEC ID NO: 1 comprende una alanina en la posición correspondiente a la posición 84 de la SEC ID NO: 1, en donde el polinucleótido es una secuencia sintética que ha sido diseñada para la expresión en una planta seleccionada entre el grupo que consiste en:
 - un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 3; y
 - un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con otro ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 3 en condiciones de rigor alto, en donde el polinucleótido está unido operativamente a un promotor, en donde preferiblemente el promotor está dirigiendo la expresión de un gen.
2. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en donde la molécula es un vector que cumple al menos uno de los siguientes aspectos:
 - i) comprende un polinucleótido adicional que codifica un polipéptido heterólogo, y
 - ii) el promotor es el promotor AtUbi10.
3. Una célula hospedadora transgénica para la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde preferiblemente la célula hospedadora es una célula vegetal, en donde preferiblemente la célula vegetal no es regenerable para producir una planta.
4. Una planta transgénica tolerante al glifosato, parte de la planta, órgano de la planta, semilla de la planta o célula vegetal que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 1.
5. La planta transgénica tolerante al glifosato, la parte de la planta, el órgano de la planta, la semilla de la planta o la célula vegetal de la reivindicación 4, que cumple uno de los siguientes aspectos:
 - i) el ácido nucleico no codifica LGNAAT (SEC ID NO: 141) y no codifica ALLMXAPLT, en donde X se selecciona entre el grupo que consiste en alanina, serina y treonina (SEC ID NO: 142),
 - ii) la EPSPS codificada por dicho ácido nucleico, cuando está alineada con la SEC ID NO: 1, comprende una treonina en la posición correspondiente a la posición 172 de SEQ ID NO: 1,
 - iii) el genoma de dicha planta, parte de la planta, órgano de la planta, semilla de la planta o célula vegetal comprende una molécula de ácido nucleico que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 3.
6. La planta tolerante al glifosato, parte de la planta, órgano de la planta, semilla de la planta o célula vegetal según la reivindicación 4, que es una planta.
7. La planta transgénica tolerante al glifosato, parte de la planta, órgano de la planta, semilla de la planta o célula vegetal de la reivindicación 4, que comprende un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo, en donde el segundo polinucleótido comprende preferiblemente *aad-1* o *aad-12*.
8. La planta transgénica tolerante al glifosato según la reivindicación 6, en la que el polinucleótido que codifica la EPSPS está establemente integrado en su genoma.
9. La planta transgénica tolerante al glifosato según la reivindicación 8, en la que la planta cumple al menos uno de los siguientes aspectos:
 - i) la planta es una planta de soja,
 - ii) la planta es una planta de maíz,
 - iii) la planta se selecciona entre el grupo que consiste en trigo, maíz, soja, tabaco, brachiaria, arroz, mijo, cebada, tomate, manzana, pera, fresa, naranja, alfalfa, algodón, zanahoria, patata, remolacha azucarera, ñame, lechuga, espinaca, petunia, rosa, crisantemo, césped, pino, abeto, plantas hiperacumuladoras de metales pesados, girasol, cártamo, colza, y *Arabidopsis*, y
 - iv) la planta es una especie seleccionada entre el grupo que consiste en los géneros *Asparagus*, *Promed.na*, *Brachiaria*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Erigeron*, *Glycine*, *Gossypium*, *Hordeum*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Lolium*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Nicotiana*, *Orychophragmus*, *Oryza*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Secale*, *Solanum*, *Sorghum*, *Triticum*, *Vitis*, *Vigna* y *Zea*.

- 10.** La planta transgénica tolerante al glifosato, parte de la planta, órgano de la planta, semilla de la planta o célula vegetal según la reivindicación 4, que es una parte de la planta u órgano de la planta que no es regenerable para producir una planta.
- 11.** Un cultivo de tejido de células de plantas regenerables tolerantes al glifosato que comprenden la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en donde preferiblemente las células regenerables se producen a partir de un tipo de tejido seleccionado entre el grupo que consiste en hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocotilos, células meristemáticas, raíces, puntas de las raíces, anteras, flores, tallos y vainas.
- 12.** Un protoplasto tolerante al glifosato que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1.
- 13.** Un método de generar una planta, parte de la planta, órgano de la planta, semilla de la planta o célula vegetal resistente al glifosato, comprendiendo el método:
- transformar la planta, parte de la planta, órgano de la planta, semilla de la planta o célula vegetal con la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en donde preferiblemente se transforma una célula vegetal que no es regenerable para producir una planta.
- 14.** El método según la reivindicación 13, en el que se satisface al menos una de las siguientes condiciones:
- i) el polipéptido no comprende LGNAAT (SEC ID NO: 141) y/o no comprende ALLMXAPLT, en donde X se selecciona entre el grupo que consiste en alanina, serina y treonina (SEC ID NO: 142),
- ii) el polipéptido, cuando está alineado con la SEC ID NO: 1, comprende una treonina en la posición correspondiente a posición 172 de la SEC ID NO: 1,
- iii) la molécula de ácido nucleico tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 3, y
- iv) la molécula de ácido nucleico comprende la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 3.
- 15.** El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que se transforma una parte de la planta, órgano de la planta, semilla de la planta o célula vegetal, comprendiendo el método además:
- regenerar una planta transgénica tolerante al glifosato, a partir de la parte de la planta transformada, órgano de la planta, semilla de la planta o célula vegetal, en donde la molécula de ácido nucleico comprende preferiblemente un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo expresable en la planta, en donde preferiblemente el polinucleótido es *aad-1* o *aad-12*.

```

      *
      *
SEQ ID NO: 67 DGT-33 (60) --DRAVVEGRPD--SPRA--PDAD-----VYRDGATTARFETLAAALSGTYREDDASQMRRRPAPITRALTALGCDIRH
SEQ ID NO: 68 DGT-32 (57) --DRAVCGRPA--SPRA--TEAL-----VYRDGATTARFETLAAALSGTYREDDASQMRRRPAPITRALTALGCDIRH
SEQ ID NO: 145 DGT-31 (60) --DRAHVEGRPS--SPRA--ADAA-----HCRDGATTARFETLAAALSGTYREDDASQMRRRPAPITRALTALGCDIRH
SEQ ID NO: 69 DGT-28 (60) --DTQVDEGRPQ--SPRA--VAEAL-----VYRDGATTARFETLAAALSGTYREDDASQMRRRPAPITRALTALGCDIRH
SEQ ID NO: 70 grg-23 (59) --DTWVEGLIQ--APNL--DAD-----WCEDEAGIVARFETLAAALSGTYREDDASQMRRRPAPITRALTALGCDIRH
SEQ ID NO: 71 CP4 Agro (75) --DTWIDGVNGGLL--PEEP-----DTFGNAAACCRITMGLVYDFDSTIHDASLITKRMGRINPLRENGQVWS
SEQ ID NO: 72 DGT-3 (74) VNNRAVVEGCGGIFPAALDSKSDIELYVGNAGTAMRPLTAATTAAGNAGYVLDGVVERREREGDLVAVLKQIGAEVDC
SEQ ID NO: 73 DGT-1 (81) TTKQAVVEGCGGLFETKESKDEINLFLGNAGTAMRPLTAATTAAGNAGYVLDGVVERREREGDLVAVLKQIGAEVDC
SEQ ID NO: 74 DGT-7 (82) VAKRAVVEGCGGRFVEKEEQEEVKLFEGNAGTAMRPLTAATTAAGNAGYVLDGVVERREREGDLVAVLKQIGAEVDC
SEQ ID NO: 75 aroA (69) --DSTRCEIINGGGLHAG--ALELFLGNAGTAMRPLAAACLSN--DIVLTSEERMRERPGHIVDPIRLGGAKTIL

```

FIG. 1

DRWHIEGRPSGAAADAEVHCRDGAATTARFLPTLAAAAAGTYRFDASAQMRRLPLALTEALRTLGVDLRHD

SEQ ID NO:76	DGT-3	(1)	MAQSSRICHVQNPVCIISNLKSNQKSPFSVSLKTHQPRASSWGLKSGTLMNGSVIRP	80
SEQ ID NO:77	DGT-1	(1)	-----MAVAAEKPESTSPFIVLE	
SEQ ID NO:78	DGT-7	(1)	-----MATSVAAIPPAEESGAEVVLQ	
			160	
DGT-3	(81)		PIREISGILKEPSSKSLNRIILLALSEGTTWVNLLISGDTNNKLMALIKLGENWERSVNNPAAVVGCGGPPASLD	
DGT-1	(20)		PIRIFSGITLPGSKSLNRIILLALSEGTTWVNLLISGDTNNKLMALIKLGLRVEDKTTQALVGGCGGFFTSKS	
DGT-7	(21)		PIREISGALPGSKSLNRIILLALSEGTTWVNLLISGDTNNKLMALIKLGLRVEDKTTQALVGGCGGFFTSKS	
			161	
DGT-3	(161)		SKSTIELKGNAGTAMRPLTAATAAGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVAGLKOIGALVECTLTGNCPPVRVANGGILPG	
DGT-1	(100)		SKSTIELKGNAGTAMRPLTAATAAGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVAGLKOIGALVECTLTGNCPPVRVANGGILPG	
DGT-7	(101)		SKSTIELKGNAGTAMRPLTAATAAGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVAGLKOIGALVECTLTGNCPPVRVANGGILPG	
			241	
DGT-3	(241)		GKVKLSGSSSQYLIALIMAAFLALDVEIEIIDKLISVPVEMTKLMERFGVSEHSDSWDRFVKGQKYKSPGNAY	
DGT-1	(180)		GKVKLSGSSSQYLIALIMAAFLALDVEIEIIDKLISVPVEMTKLMERFGVSEHSDSWDRFVKGQKYKSPGNAY	
DGT-7	(181)		GKVKLSGSSSQYLIALIMAAFLALDVEIEIIDKLISVPVEMTKLMERFGVSEHSDSWDRFVKGQKYKSPGNAY	
			321	
DGT-3	(321)		VEGDASSASYELAGAAITGCTVIVGGCGTSLQGDVKFAEVLEKMGCKVSNENSVTVTGPSRDAEGMHLRAVDVNNK	
DGT-1	(260)		VEGDASSASYELAGAAITGCTVIVGGCGTSLQGDVKFAEVLEKMGCKVSNENSVTVTGPSRDAEGMHLRAVDVNNK	
DGT-7	(261)		VEGDASSASYELAGAAITGCTVIVGGCGTSLQGDVKFAEVLEKMGCKVSNENSVTVTGPSRDAEGMHLRAVDVNNK	
			401	
DGT-3	(401)		MPDVAMTLAVVALFADGGPTTIRDVASNRVKETERMIAITELSKIGATVEESDYCMITPPAKIKPAEIDTYDDHRNRMA	
DGT-1	(340)		MPDVAMTLAVVALFADGGPTTIRDVASNRVKETERMIAITELSKIGATVEESDYCMITPPAKIKPAEIDTYDDHRNRMA	
DGT-7	(341)		MPDVAMTLAVVALFADGGPTTIRDVASNRVKETERMIAITELSKIGATVEESDYCMITPPAKIKPAEIDTYDDHRNRMA	
			481	
DGT-3	(481)		FSLAAGADVPVTIIDPGCTRKTFPPYFQVIESITKH	516
DGT-1	(420)		FSLAAGADVPVTIIDPGCTRKTFPPYFVLERITKH	
DGT-7	(421)		FSLAAGADVPVTIIDPGCTRKTFPPYFVLSFVKV	

FIG. 2

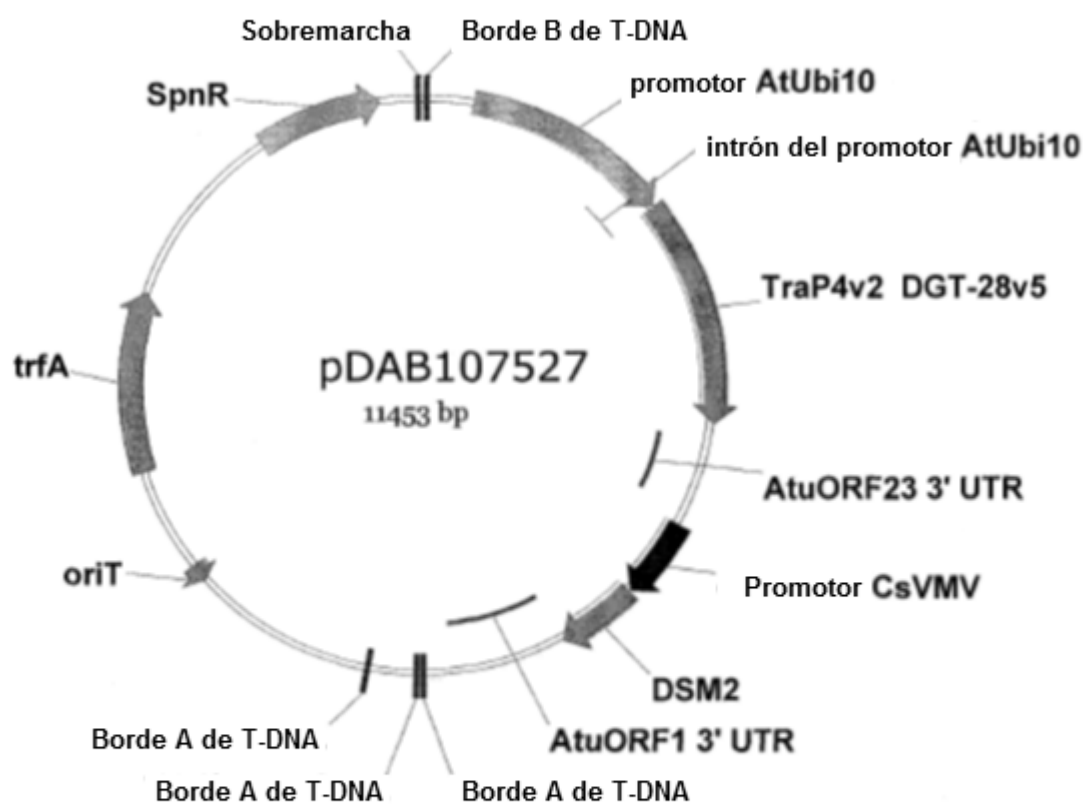


FIG.3

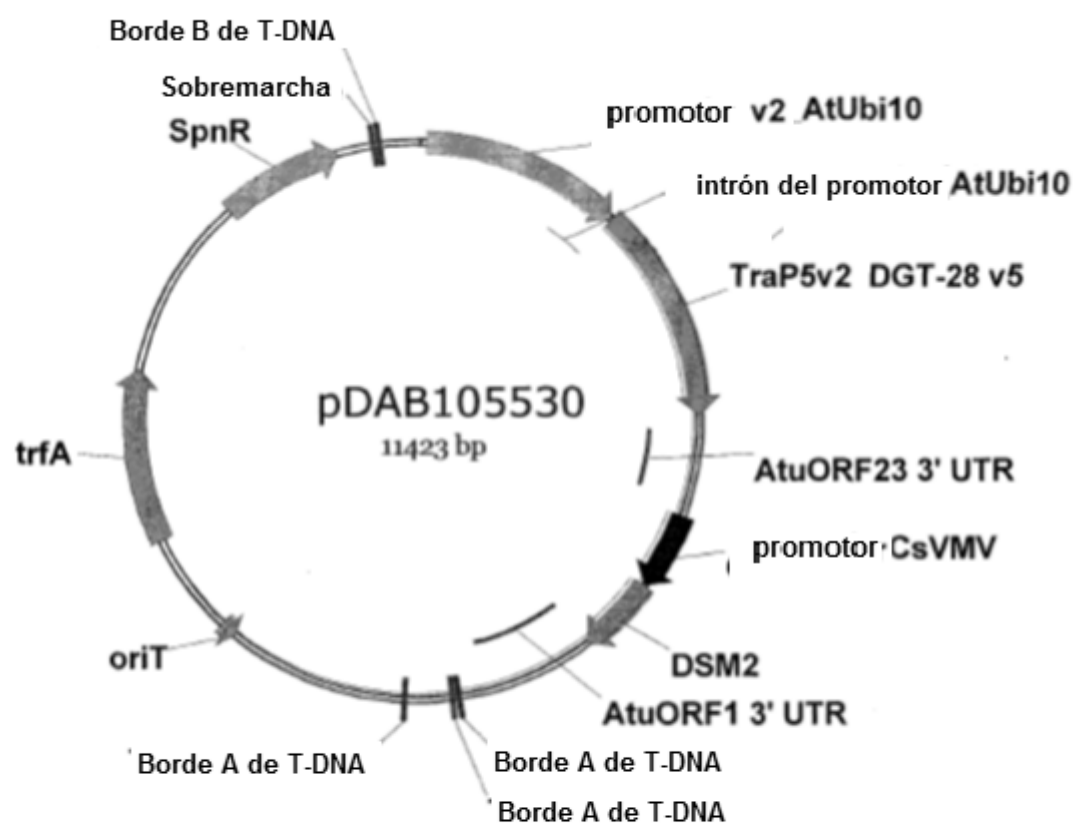


FIG.4

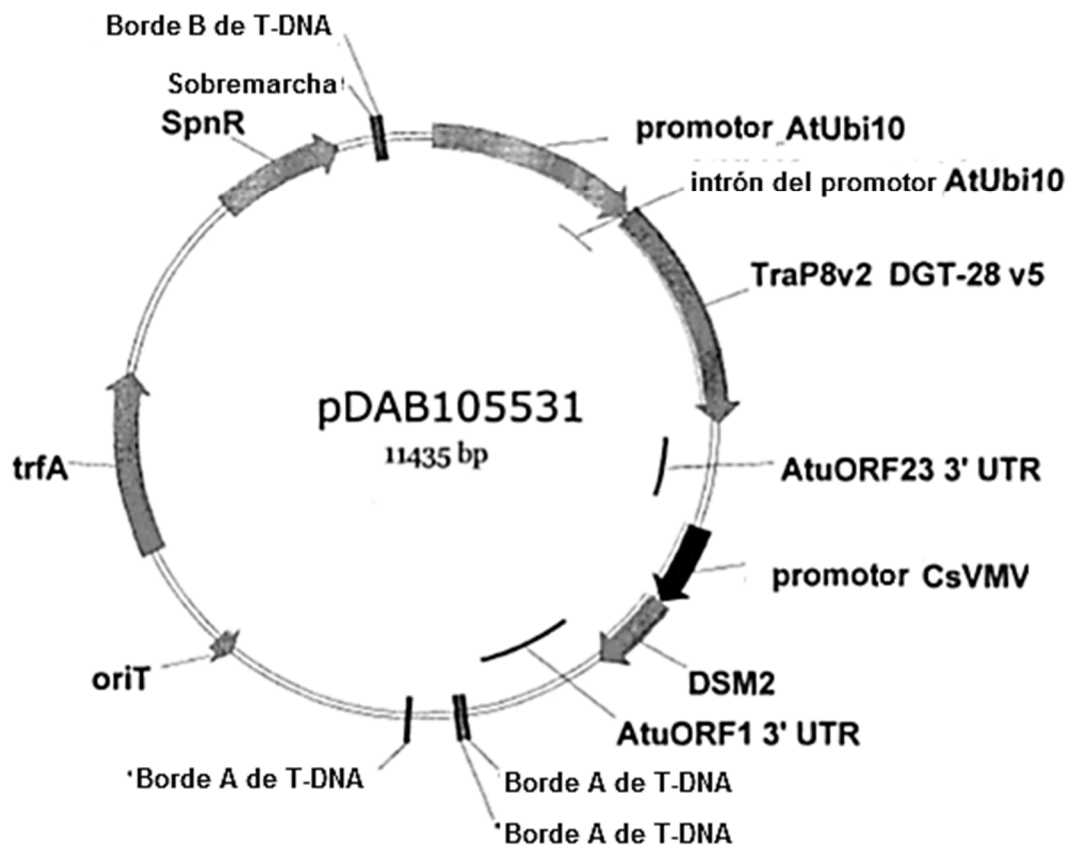


FIG.5

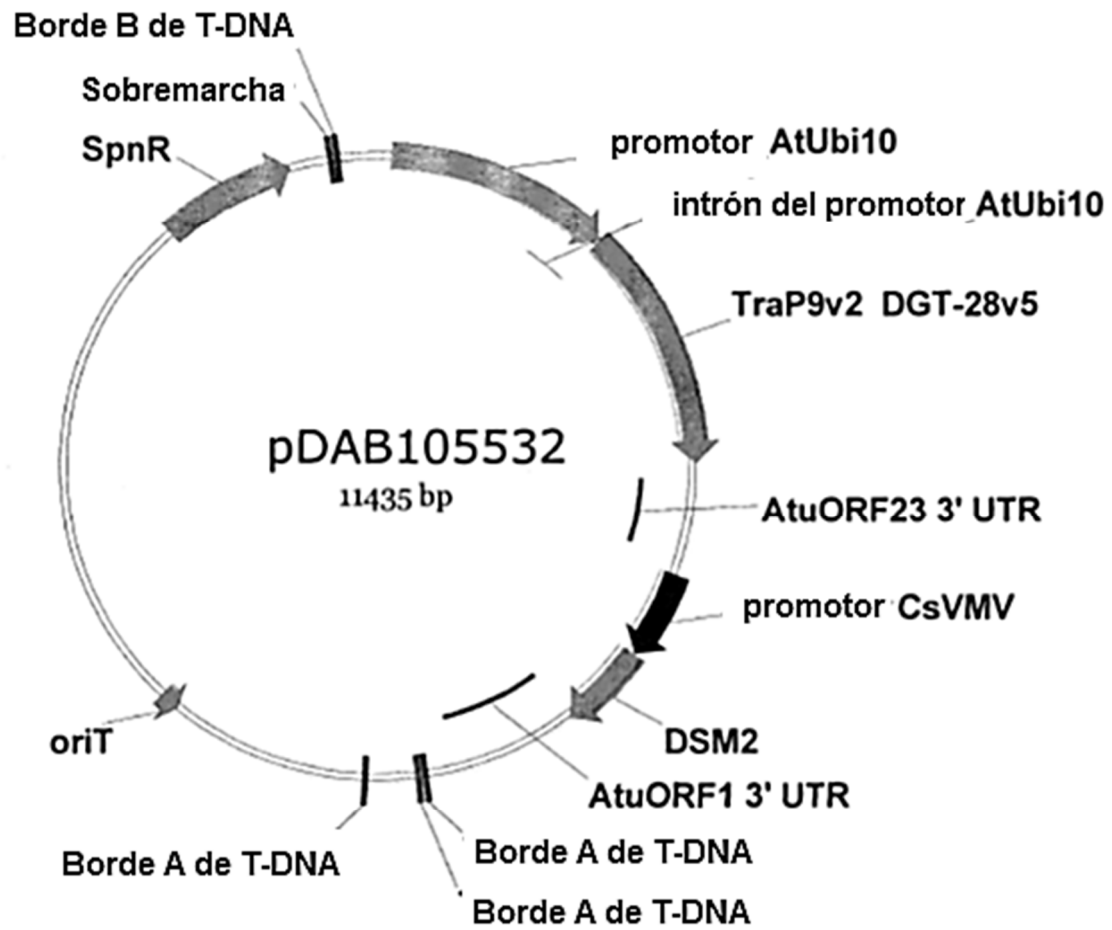


FIG.6

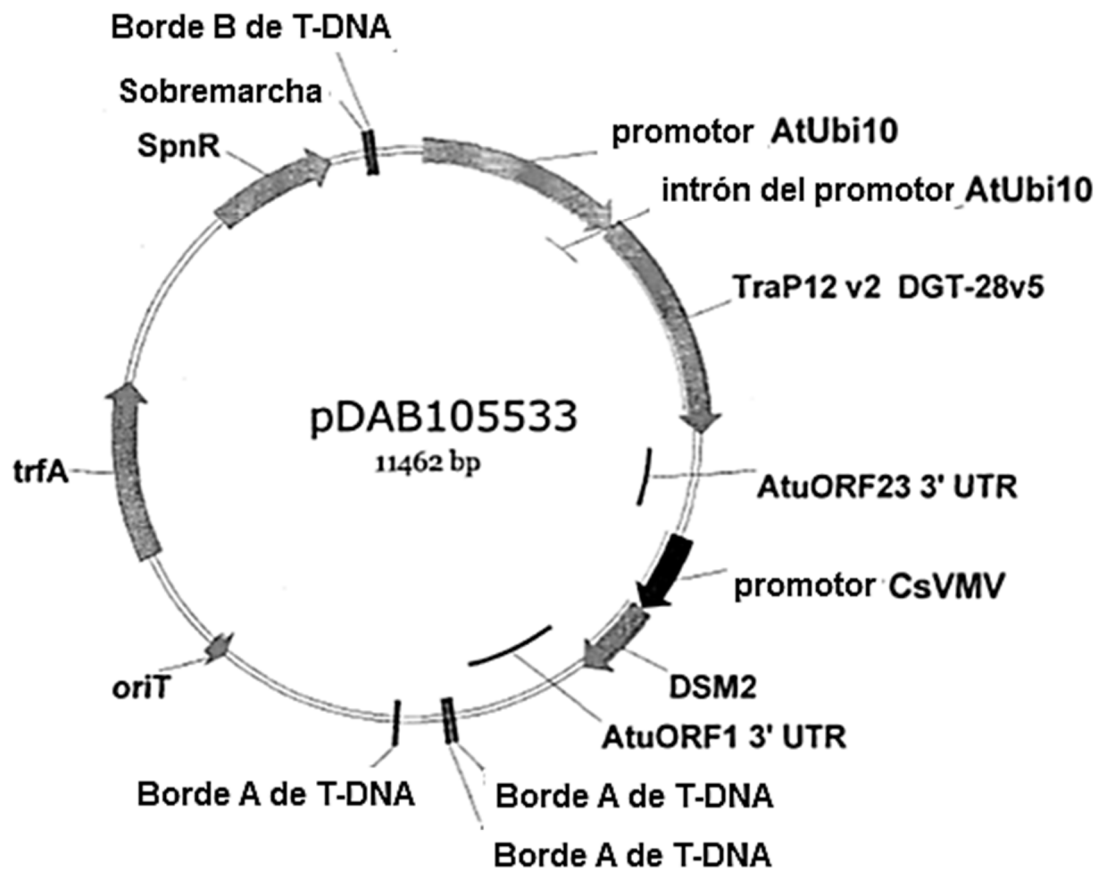


FIG.7

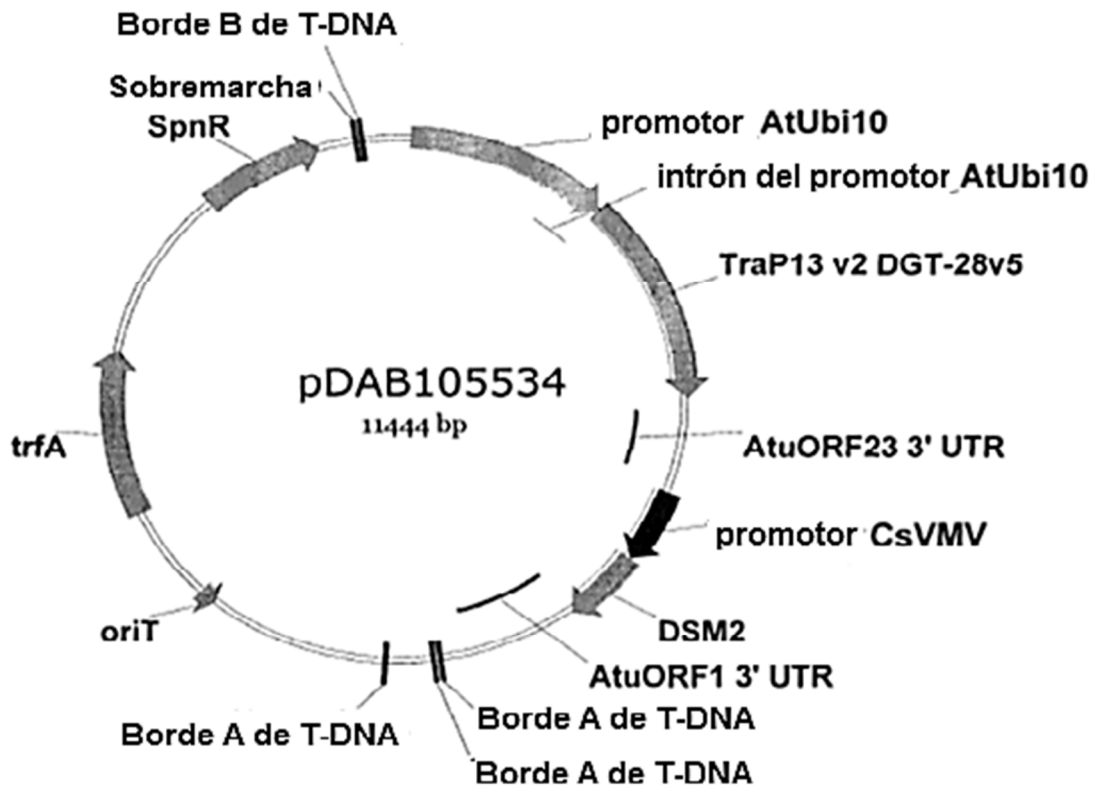


FIG.8

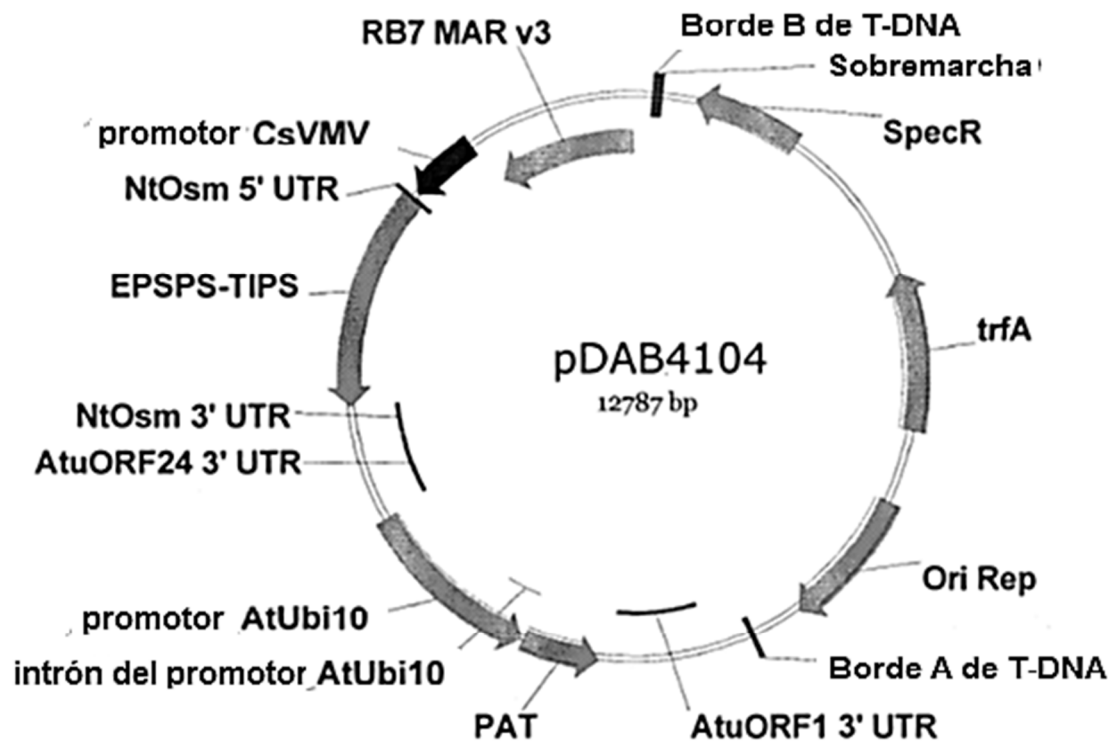


FIG.9

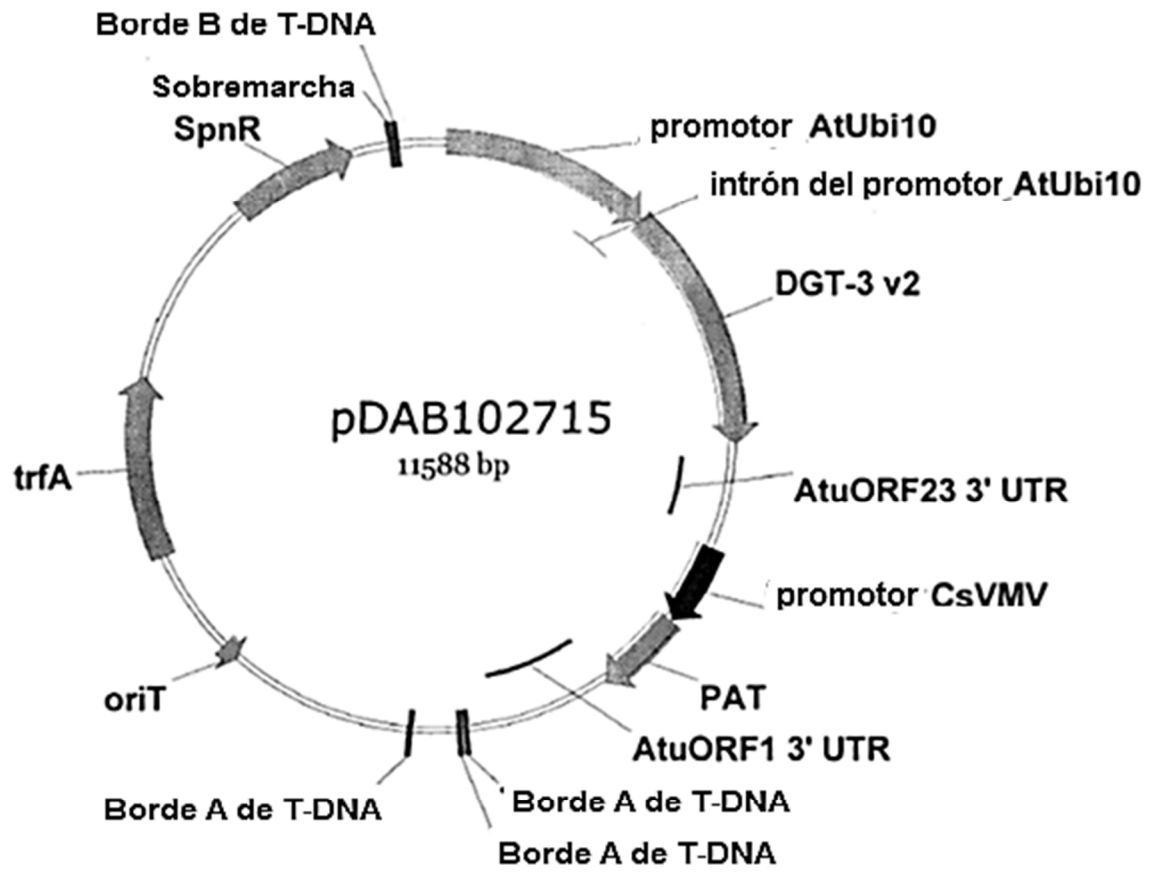


FIG. 10

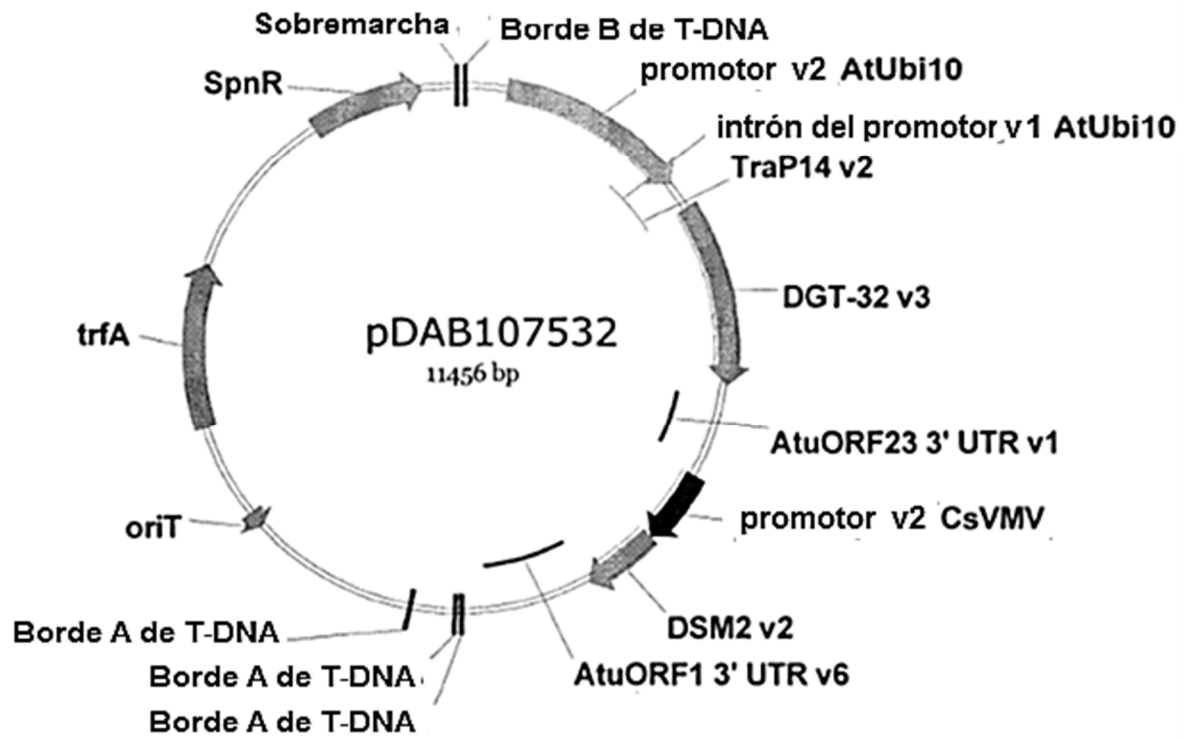


FIG. 11

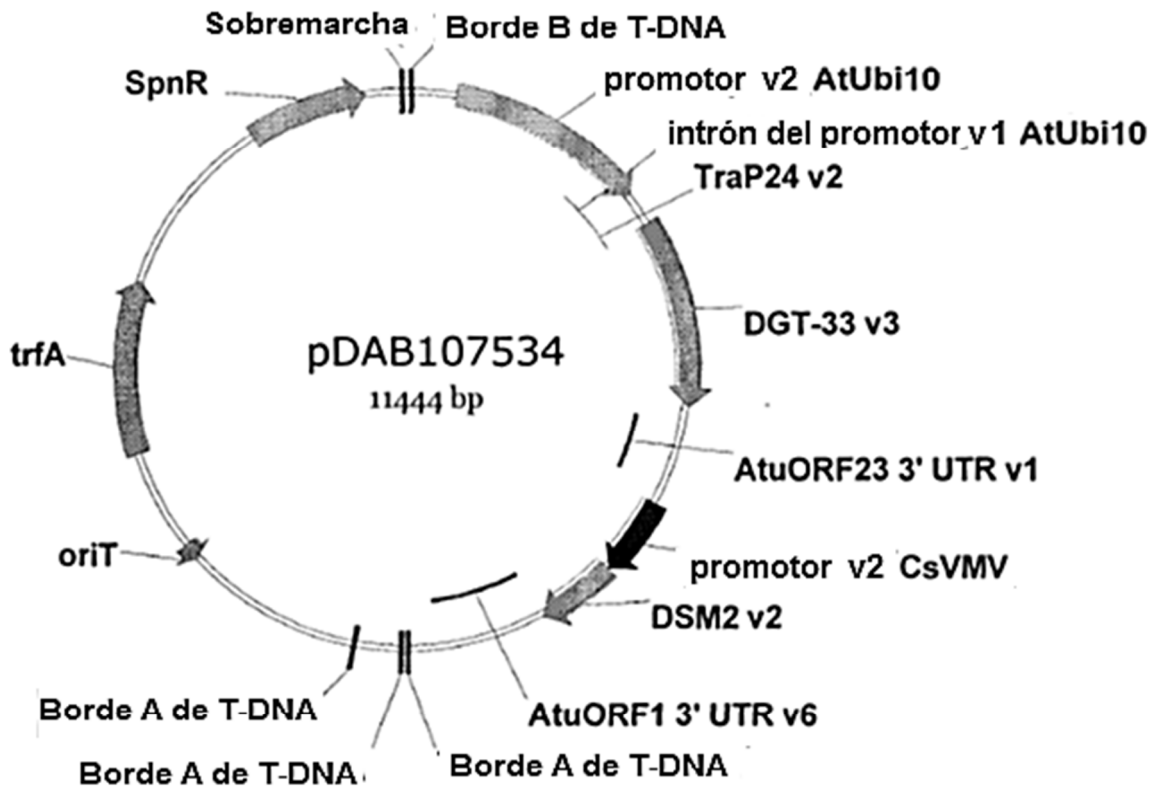


FIG. 12

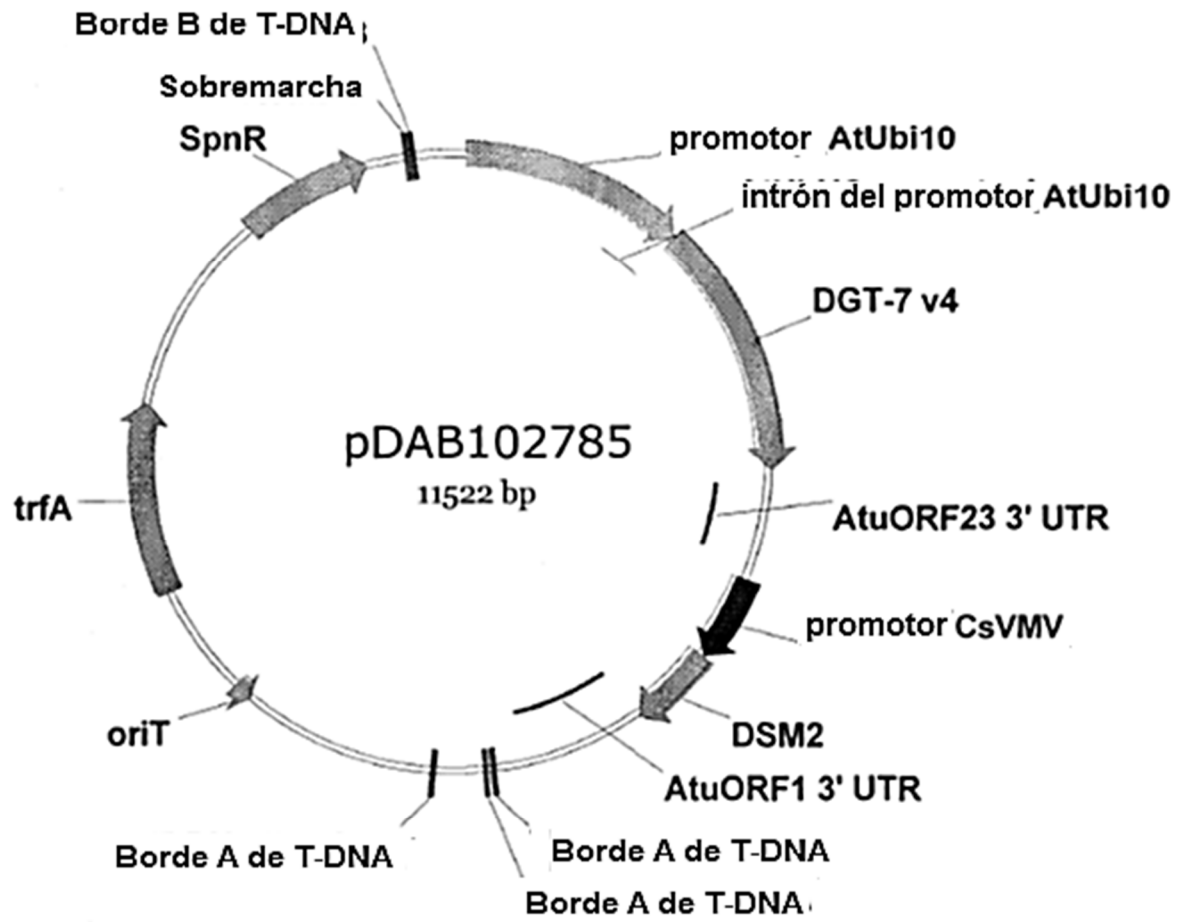


FIG. 13

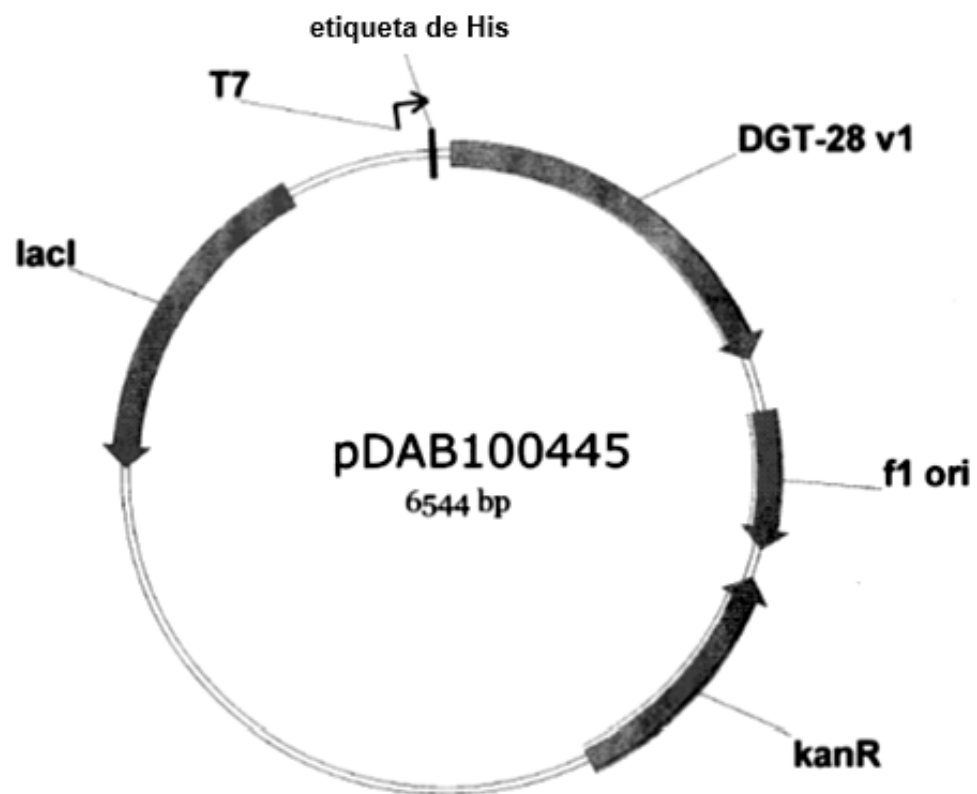


FIG. 14

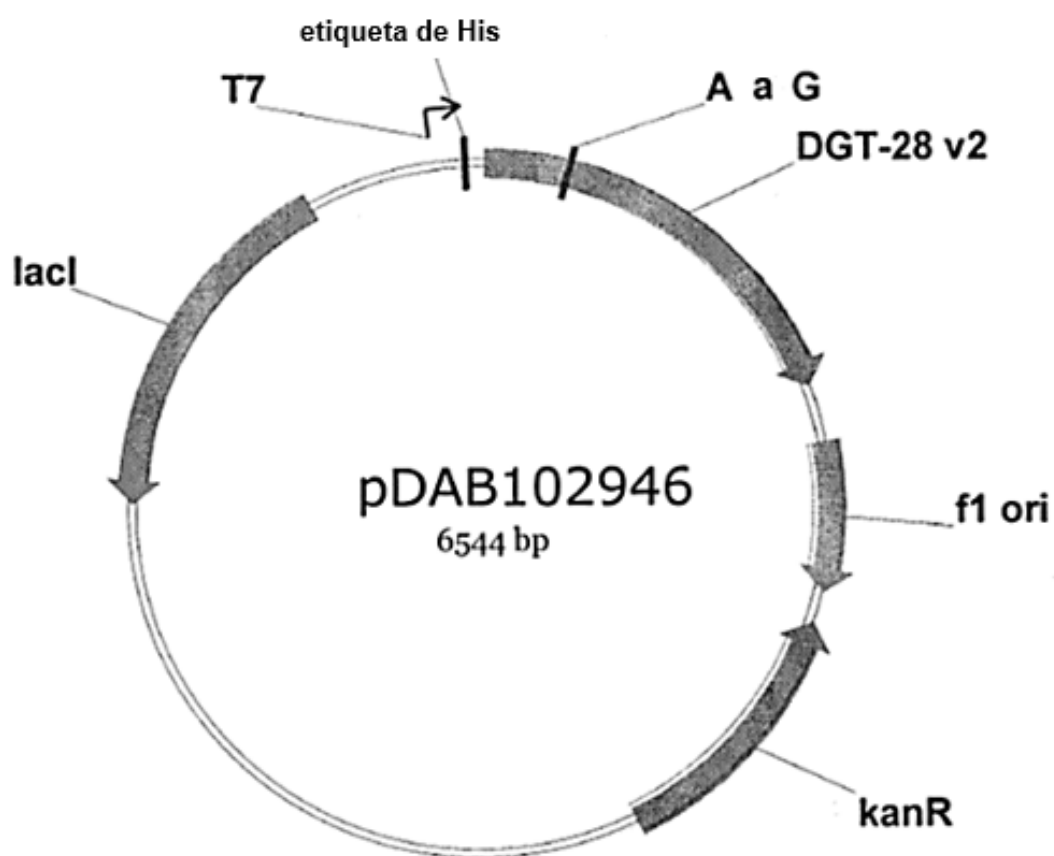


FIG. 15



FIG. 16

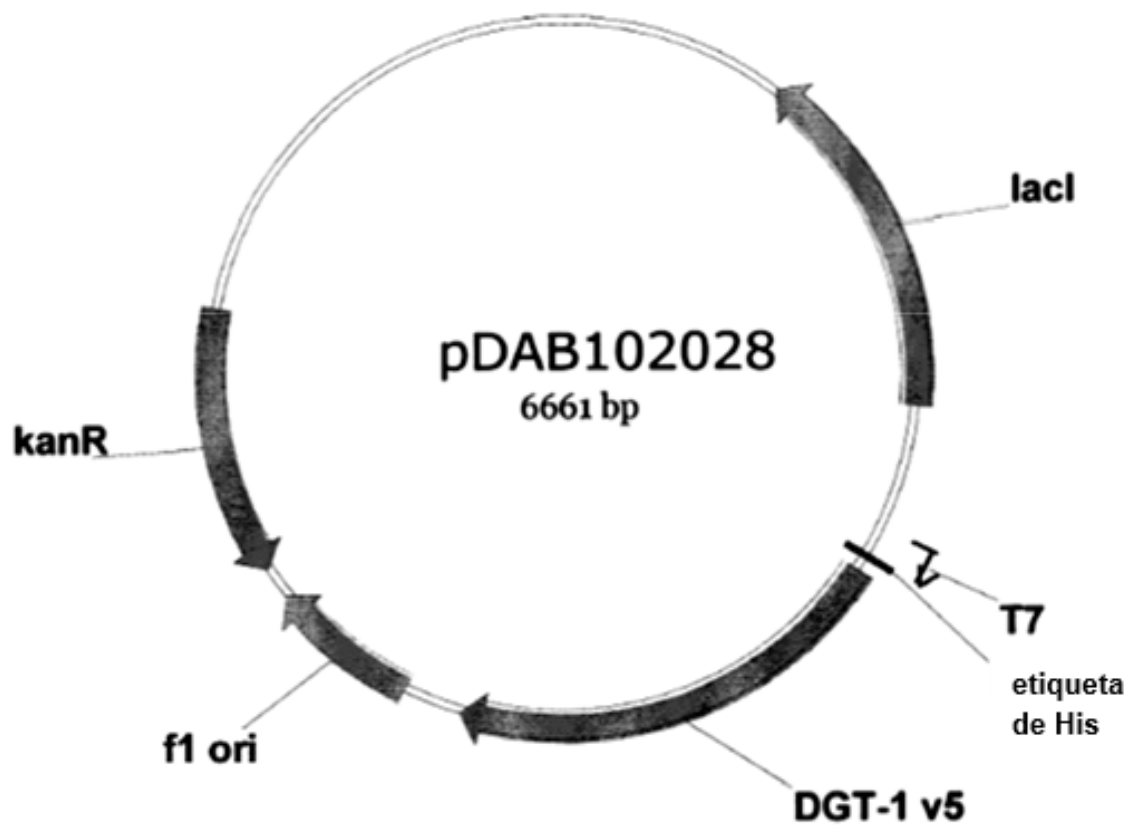


FIG. 17



FIG. 18



FIG. 19

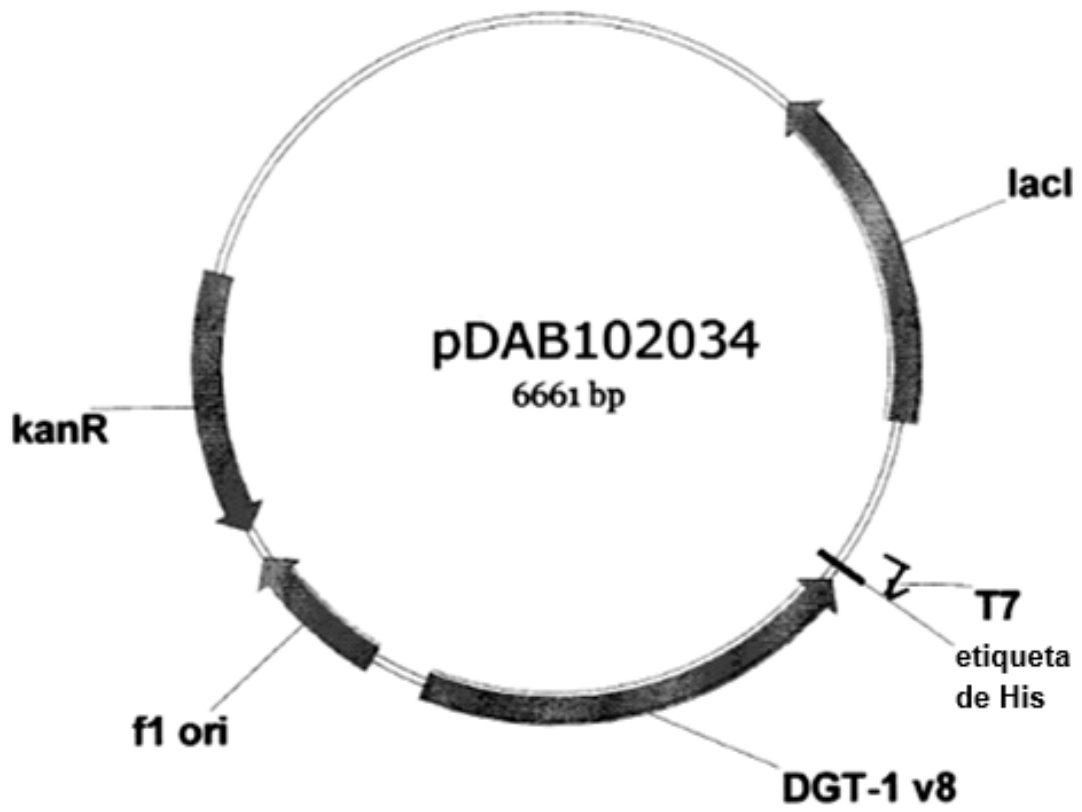


FIG. 20

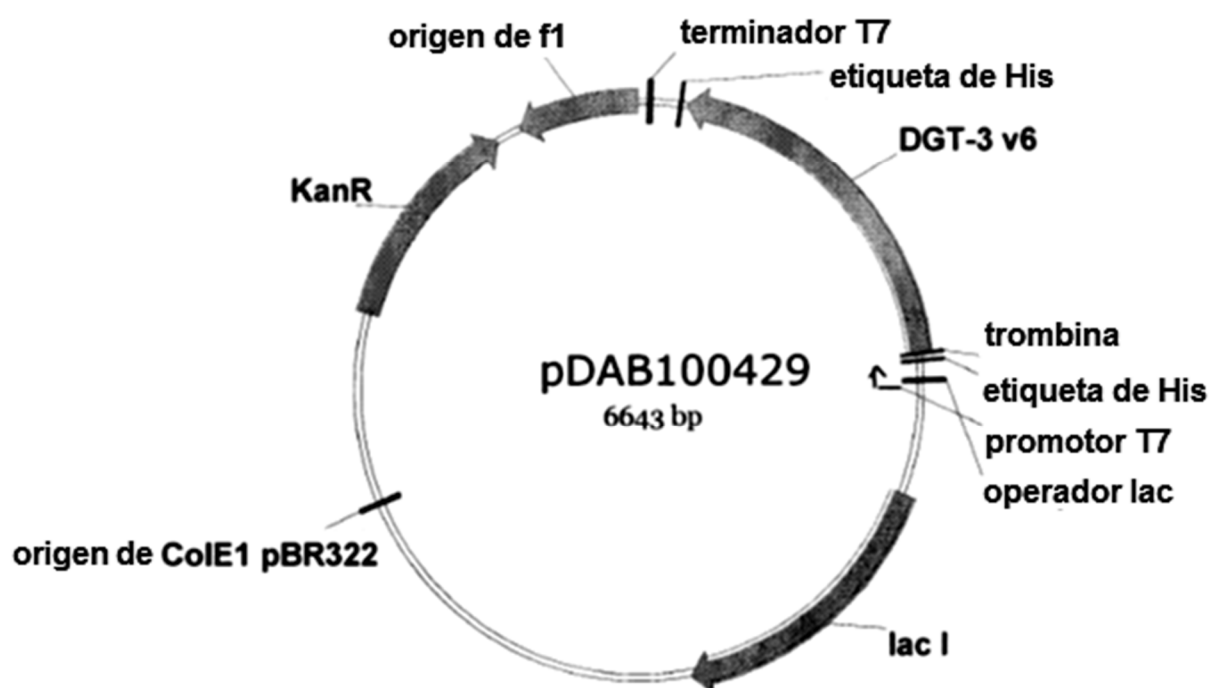


FIG. 21

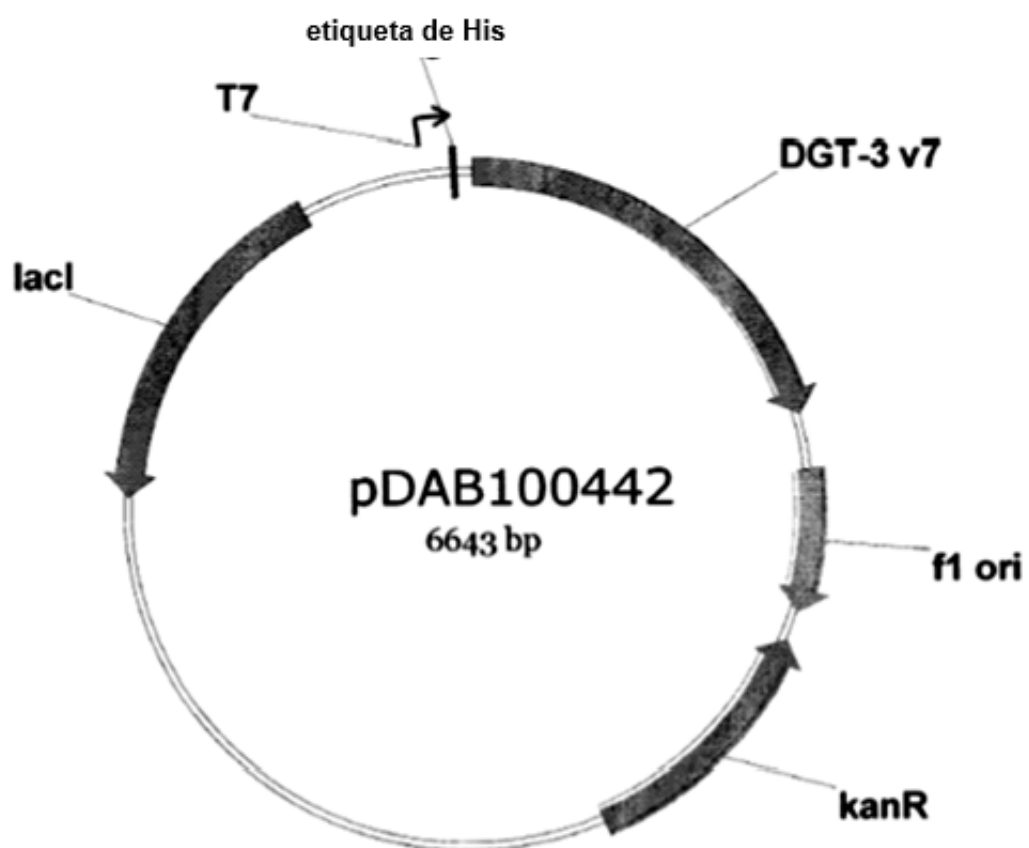


FIG. 22

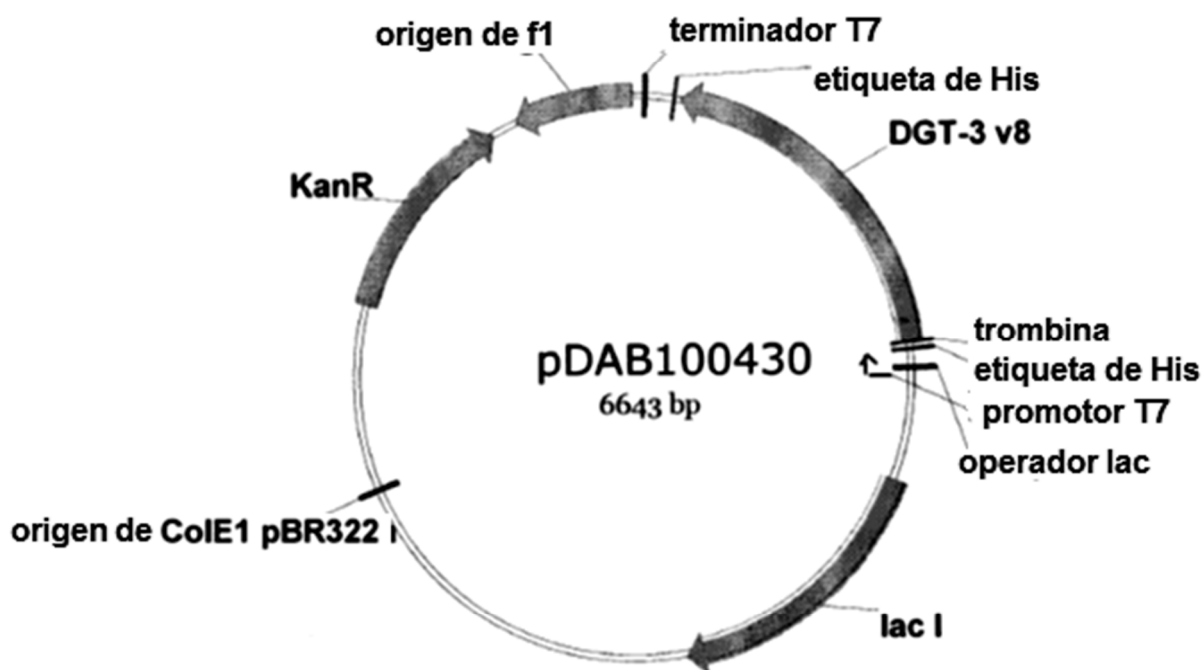


FIG. 23

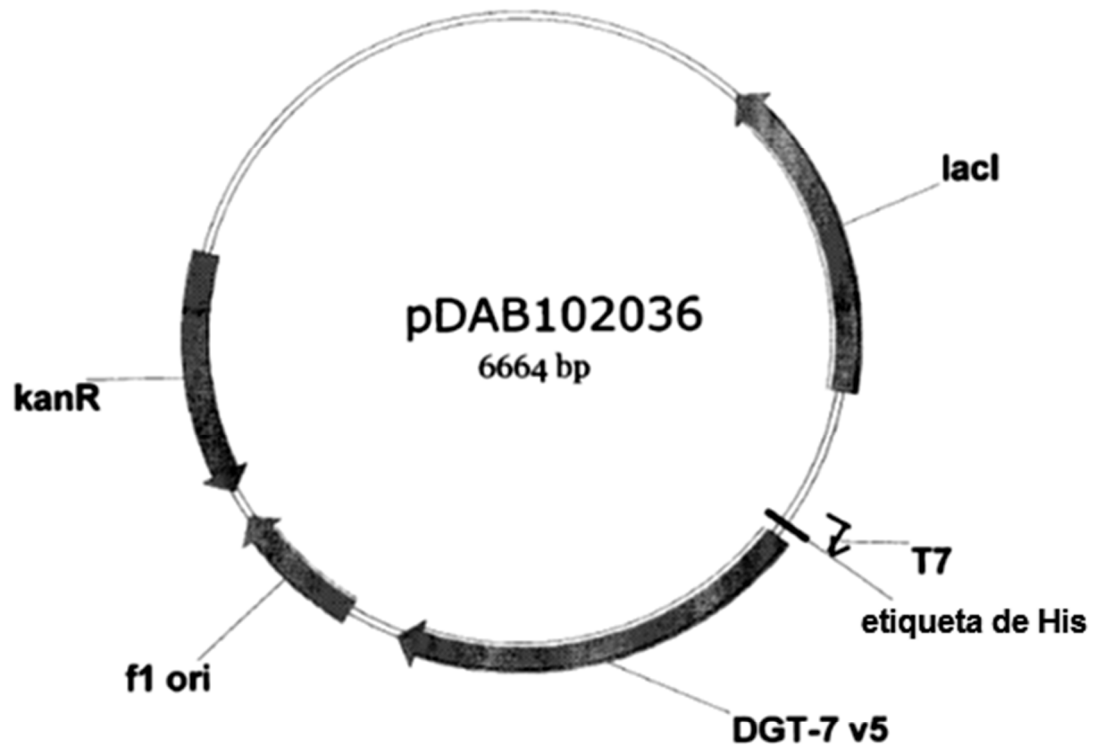


FIG. 24

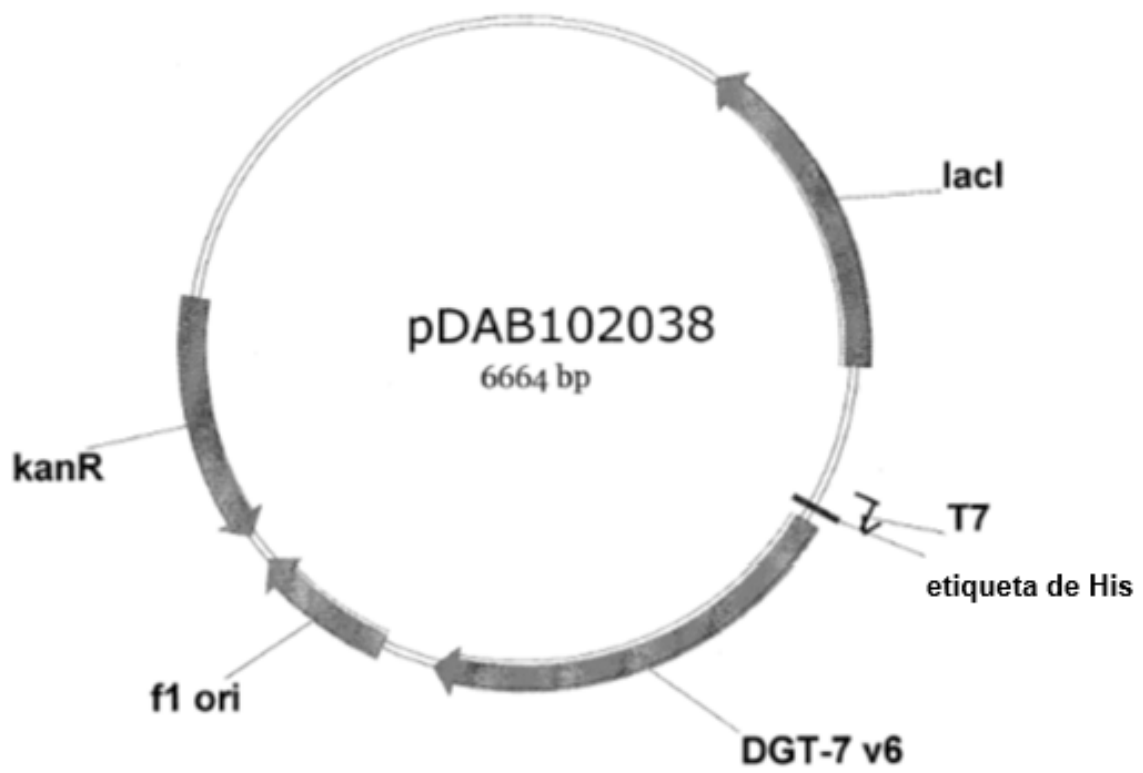


FIG. 25

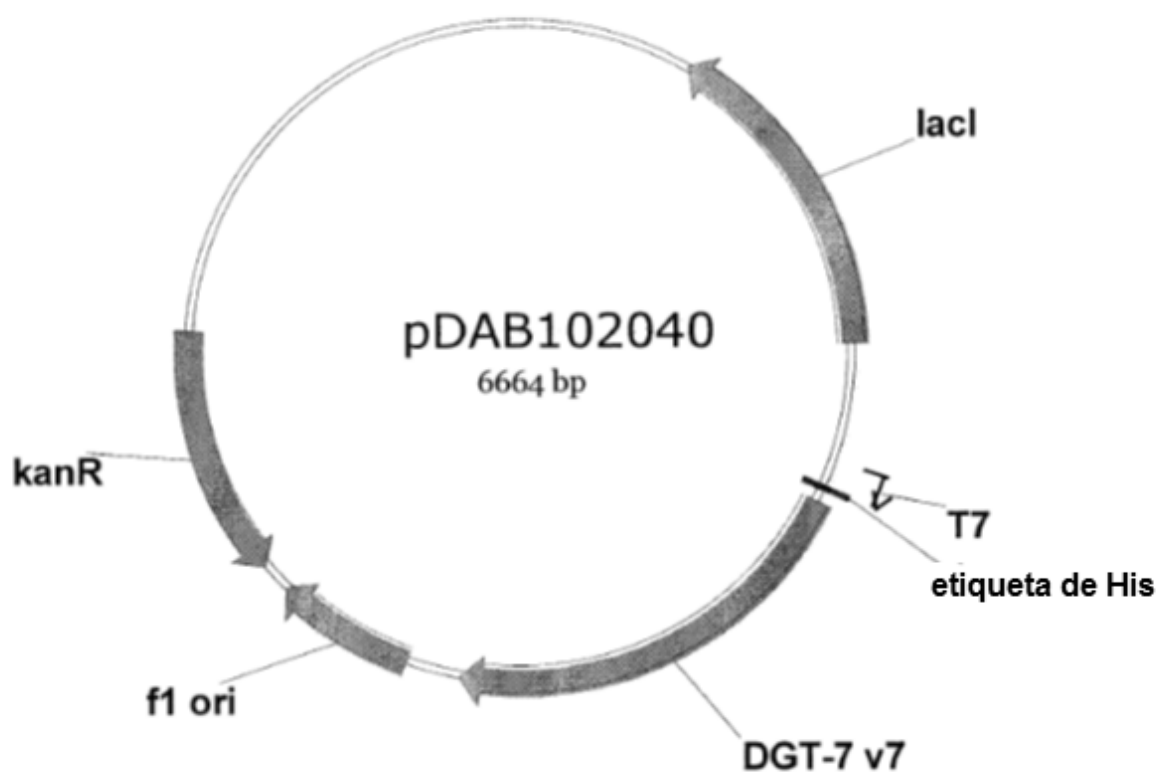


FIG. 26

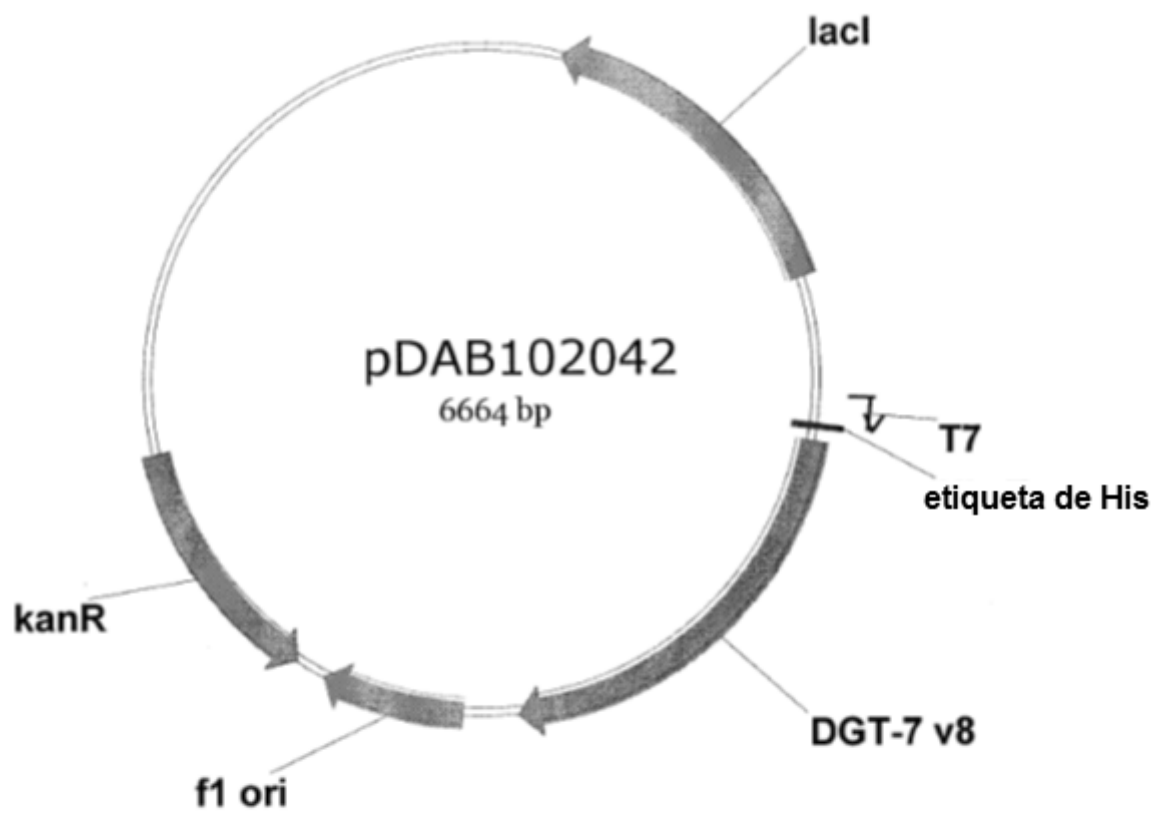


FIG. 27



FIG. 28



FIG. 29



FIG. 30

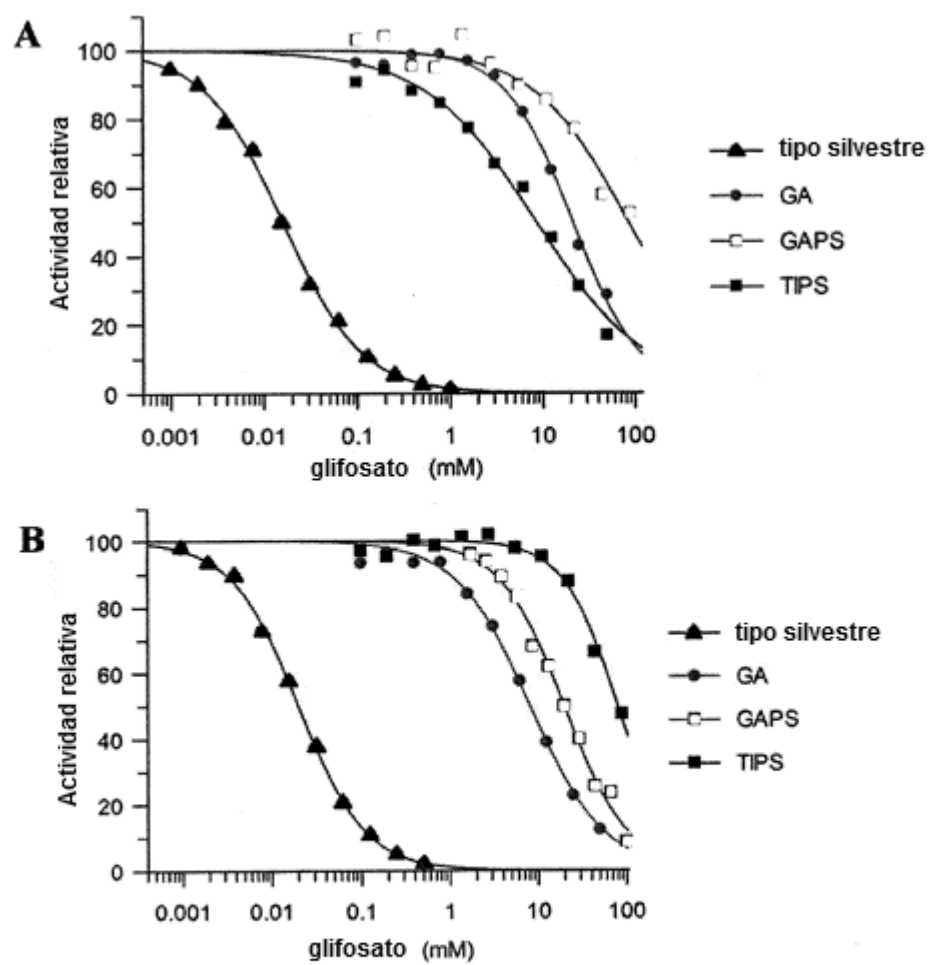


FIG. 31

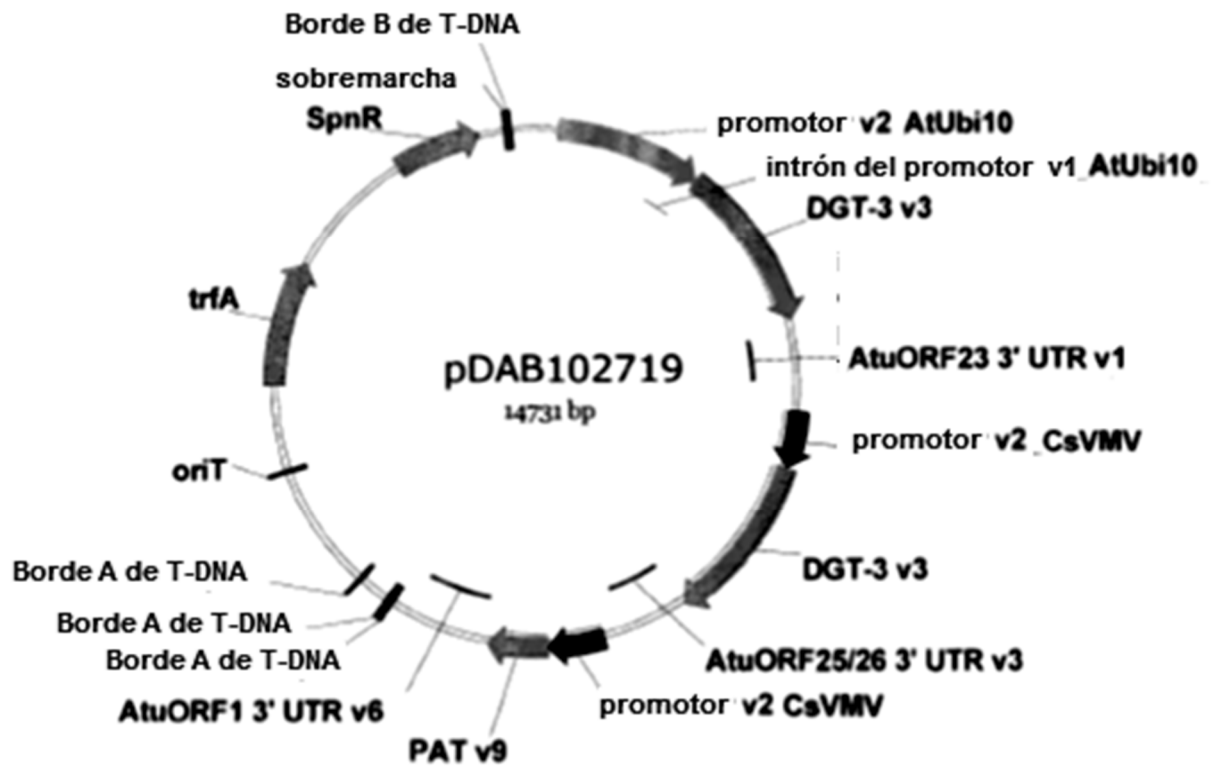


FIG. 32

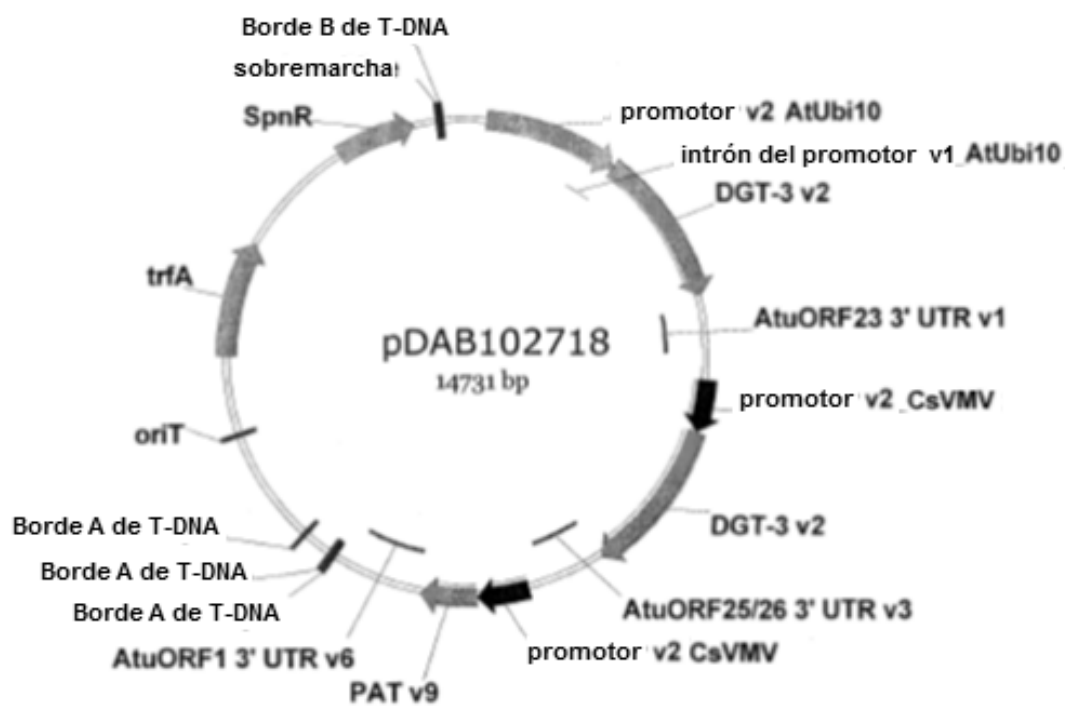


FIG. 33

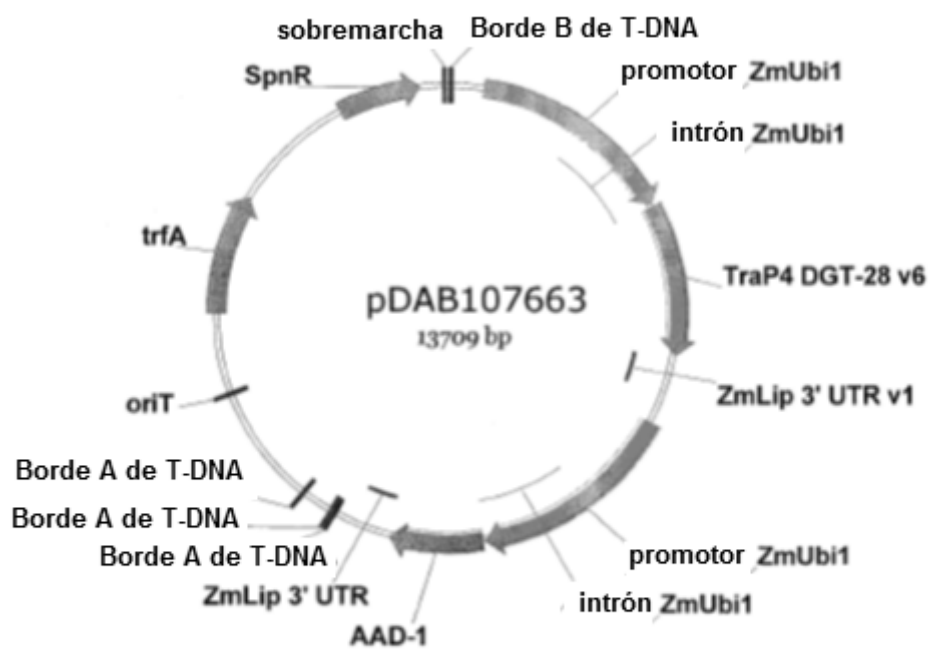


FIG. 34

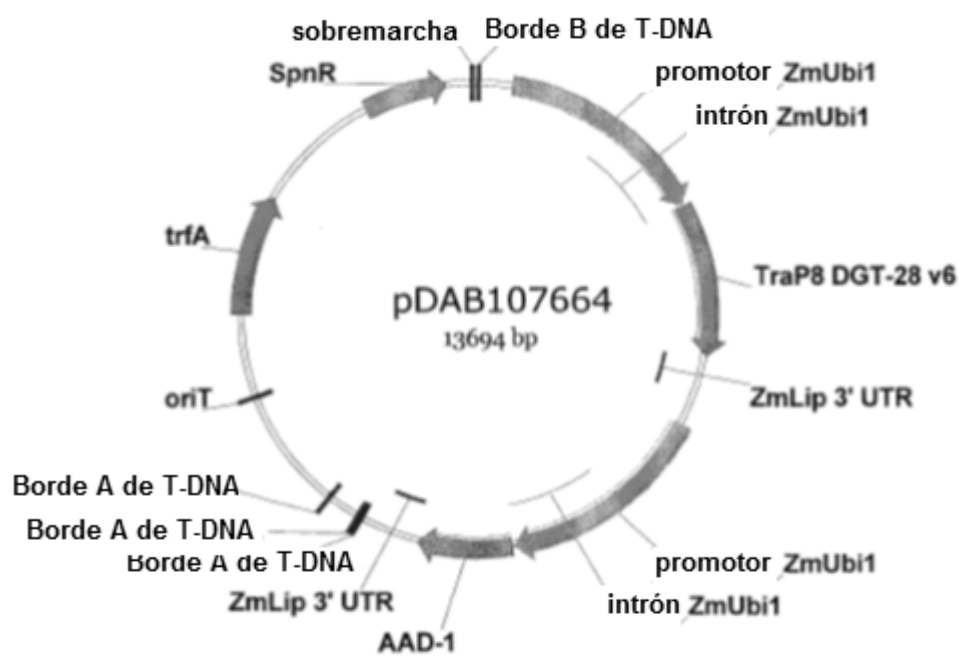


FIG. 35

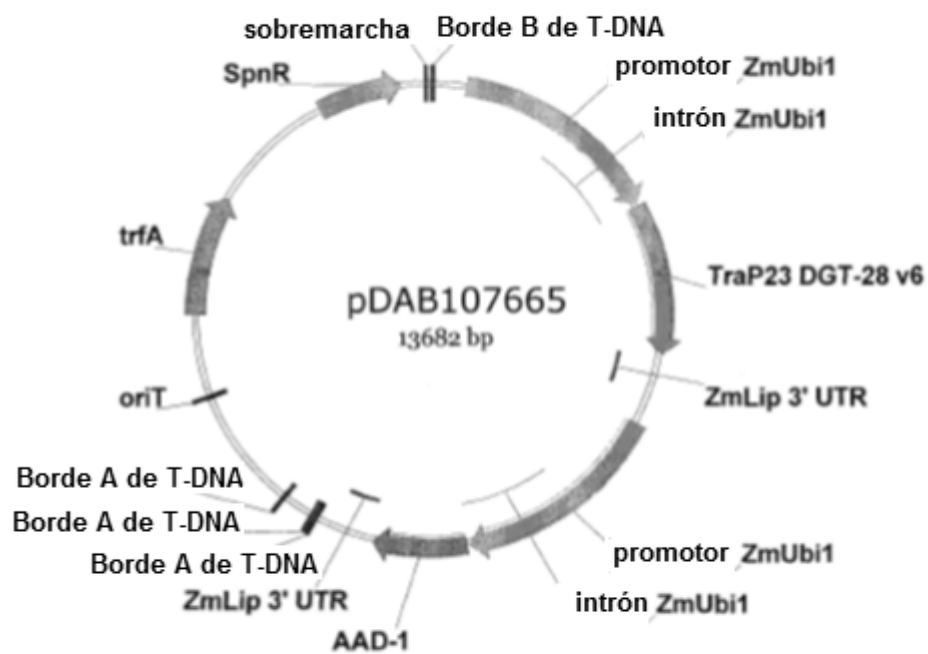


FIG. 36

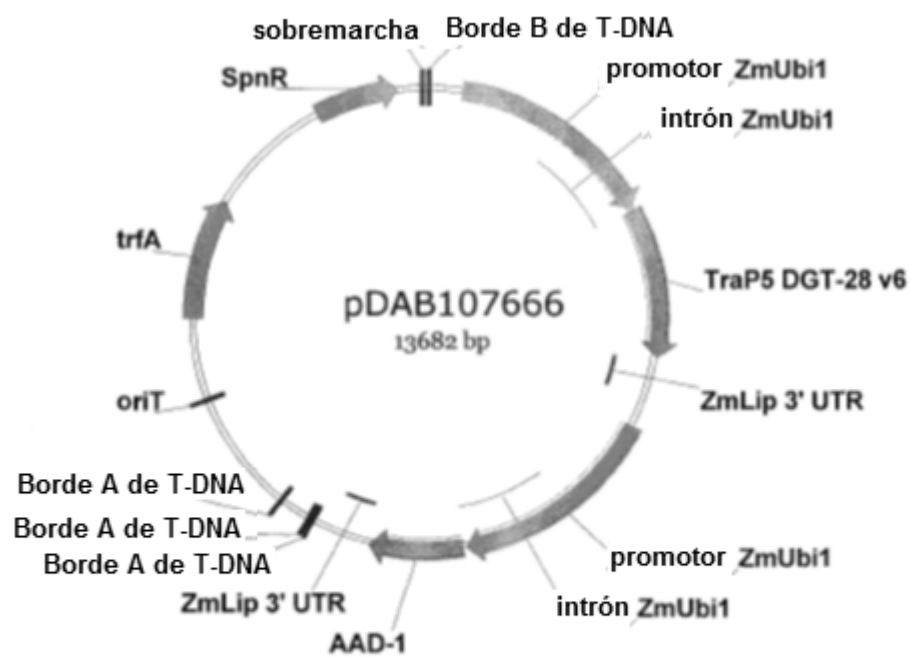


FIG. 37

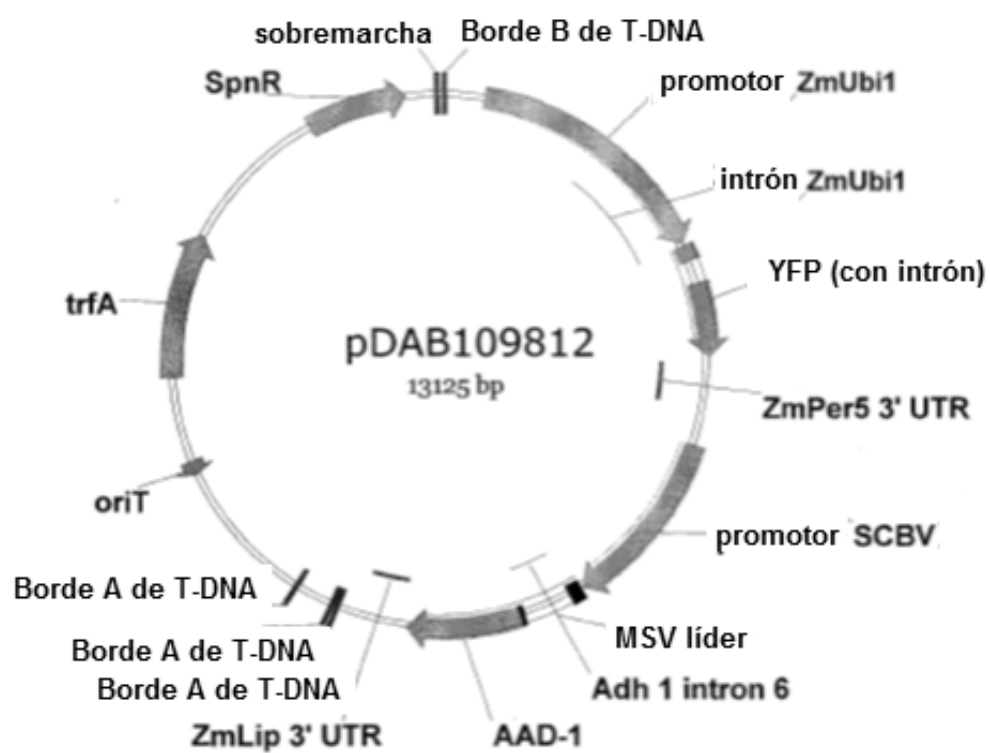


FIG. 38

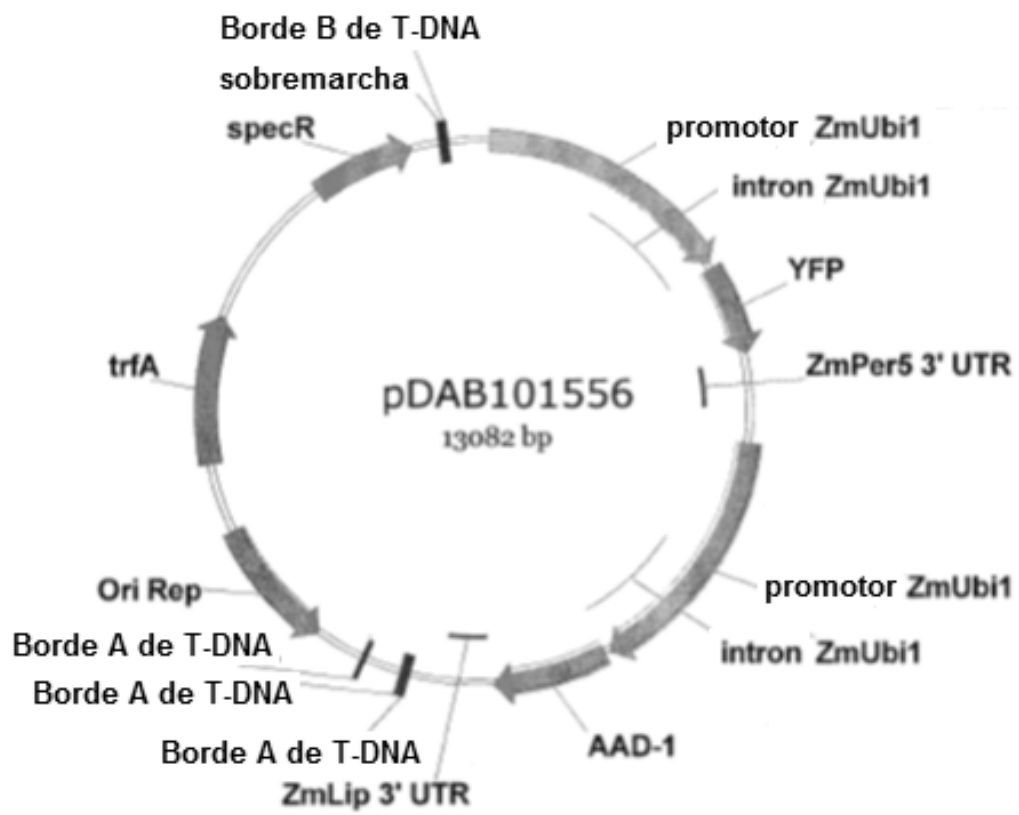


FIG. 39

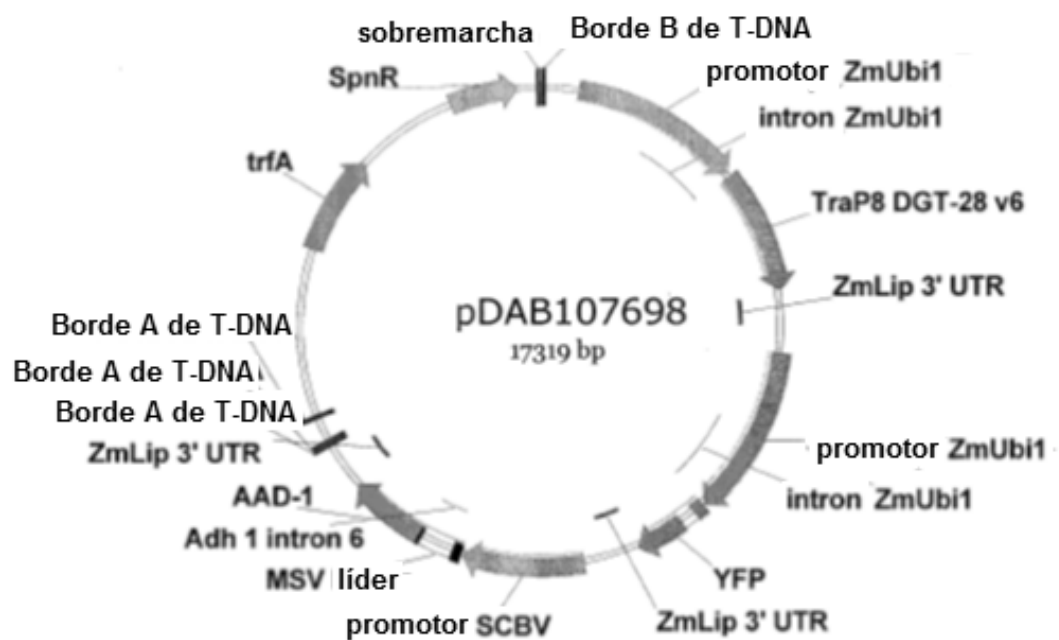


FIG.40

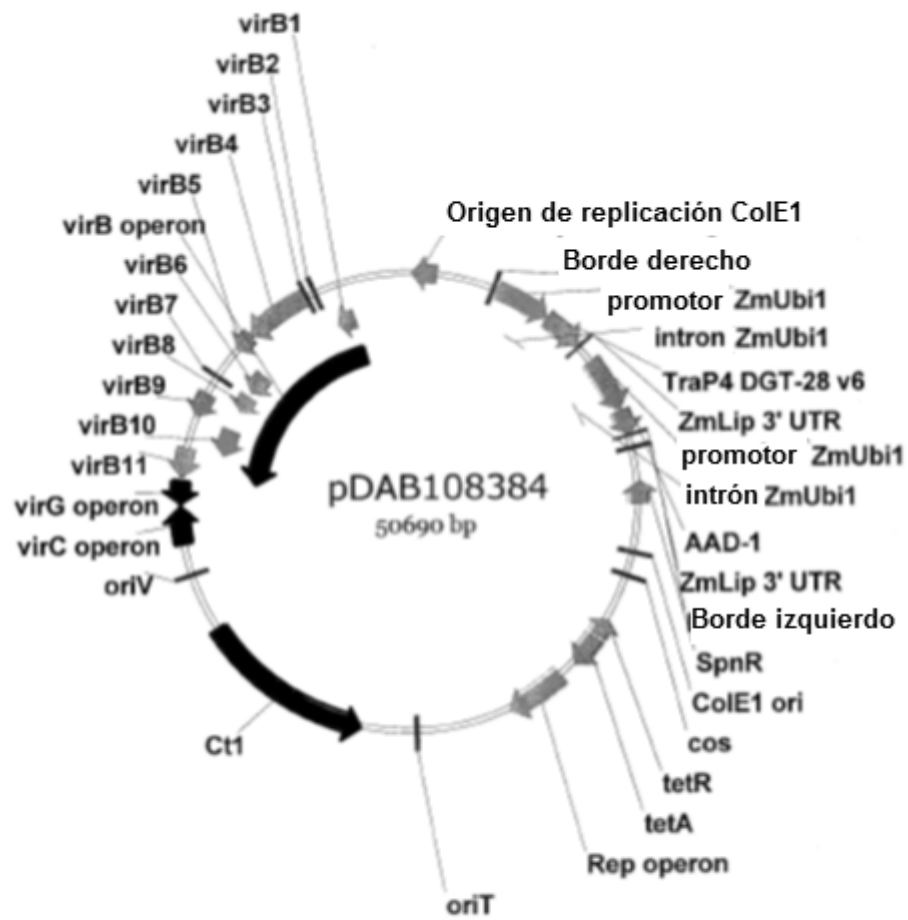


FIG. 41

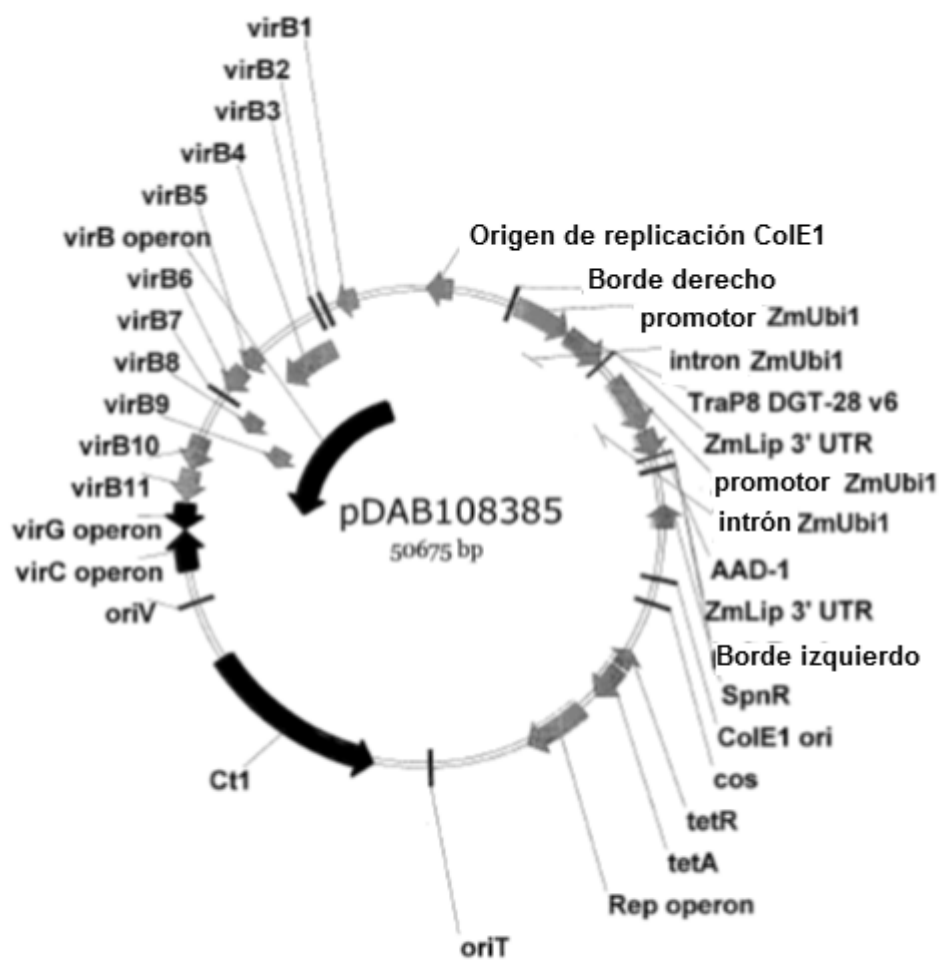


FIG. 42

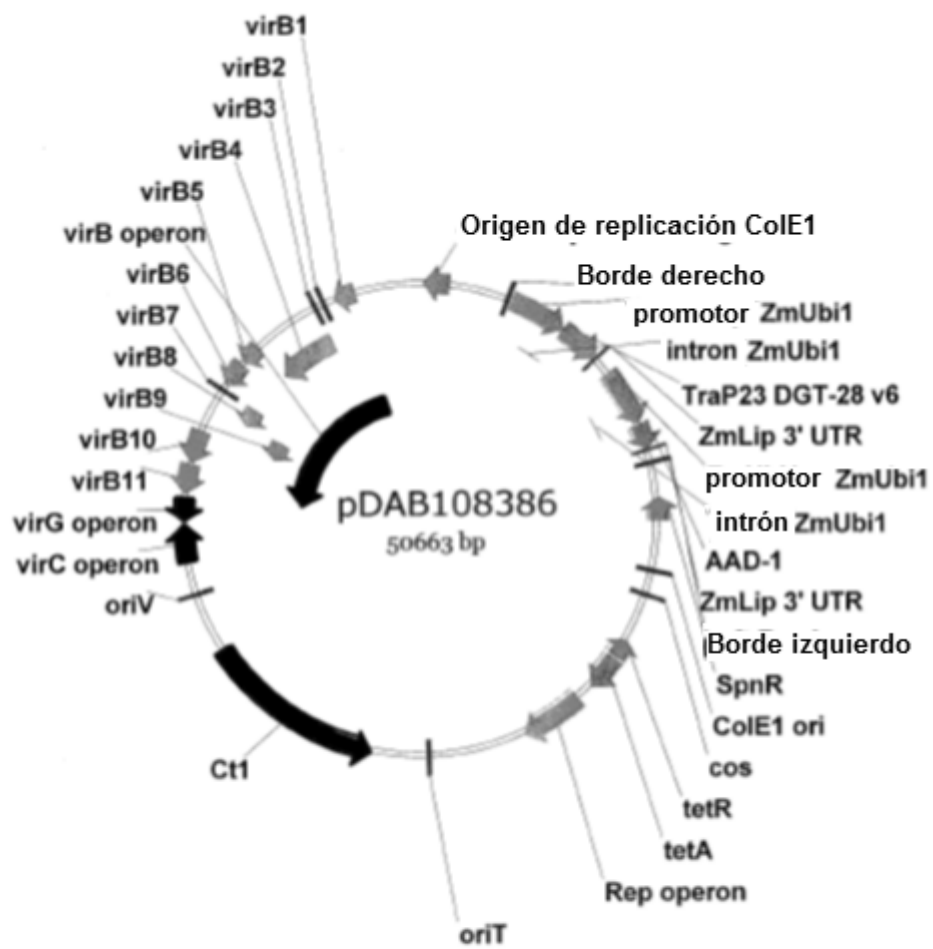


FIG. 43

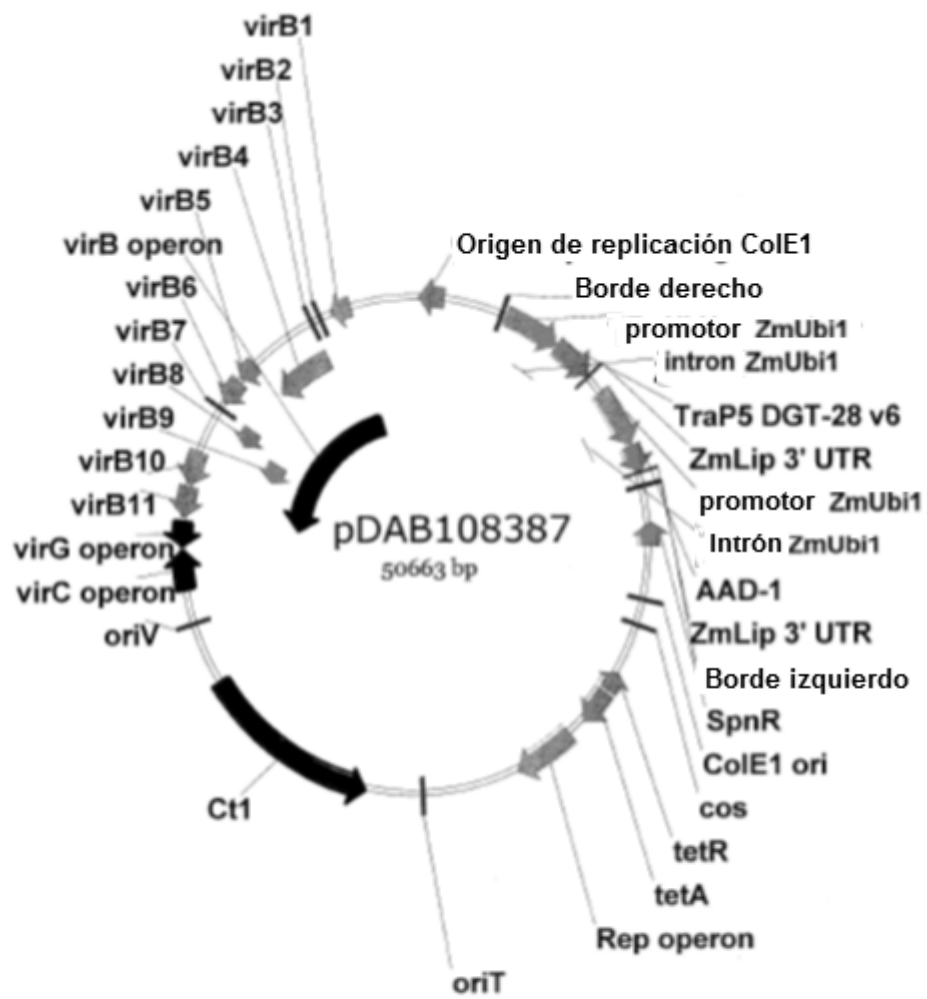


FIG. 44

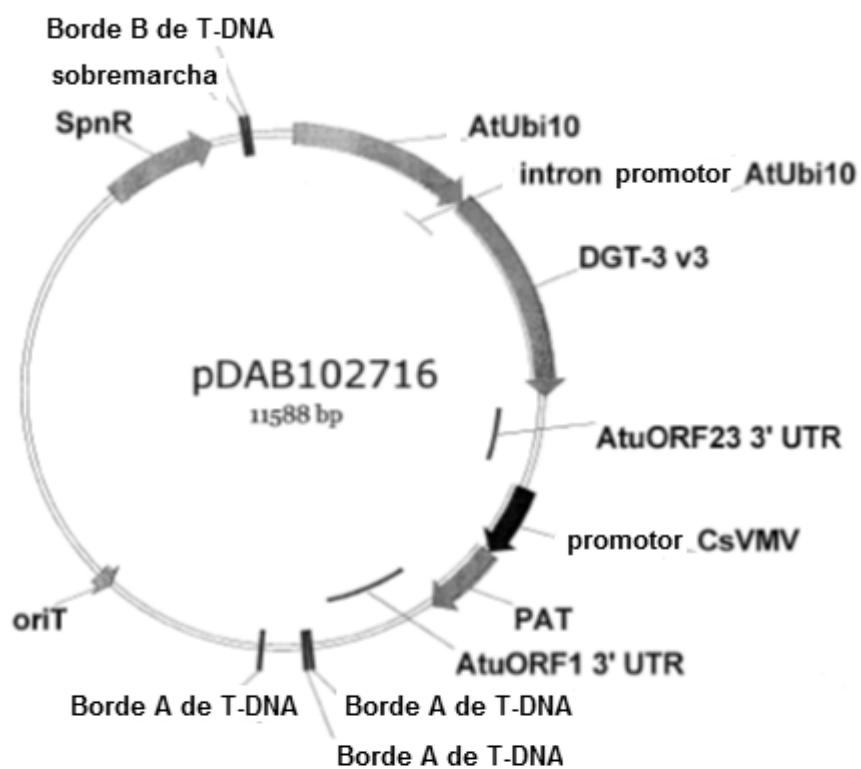


FIG. 45

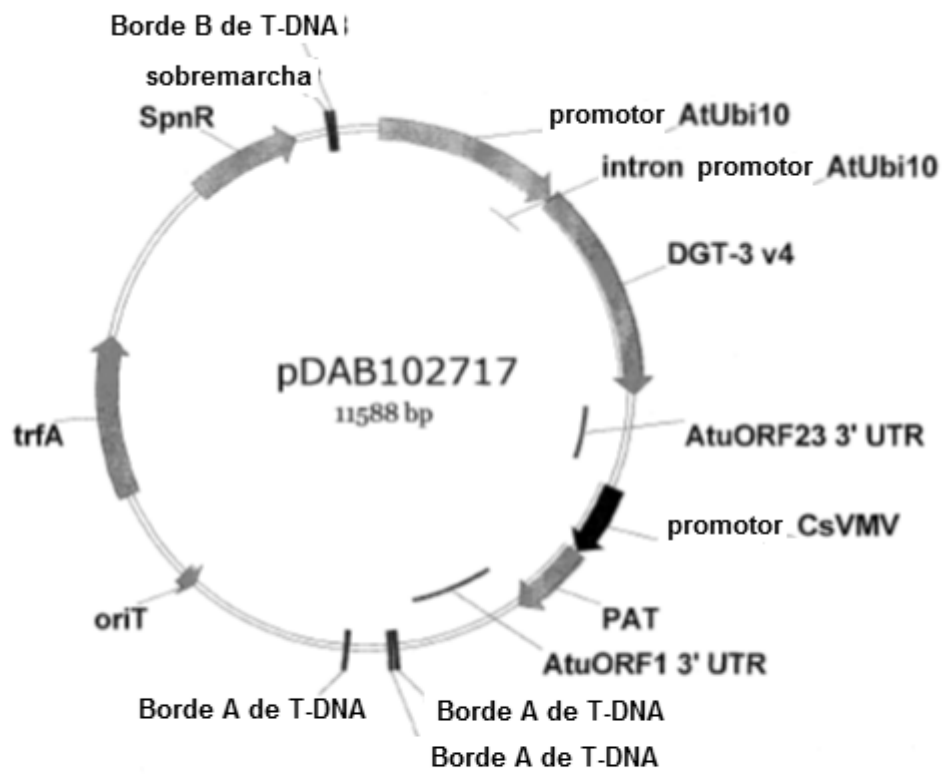


FIG. 46

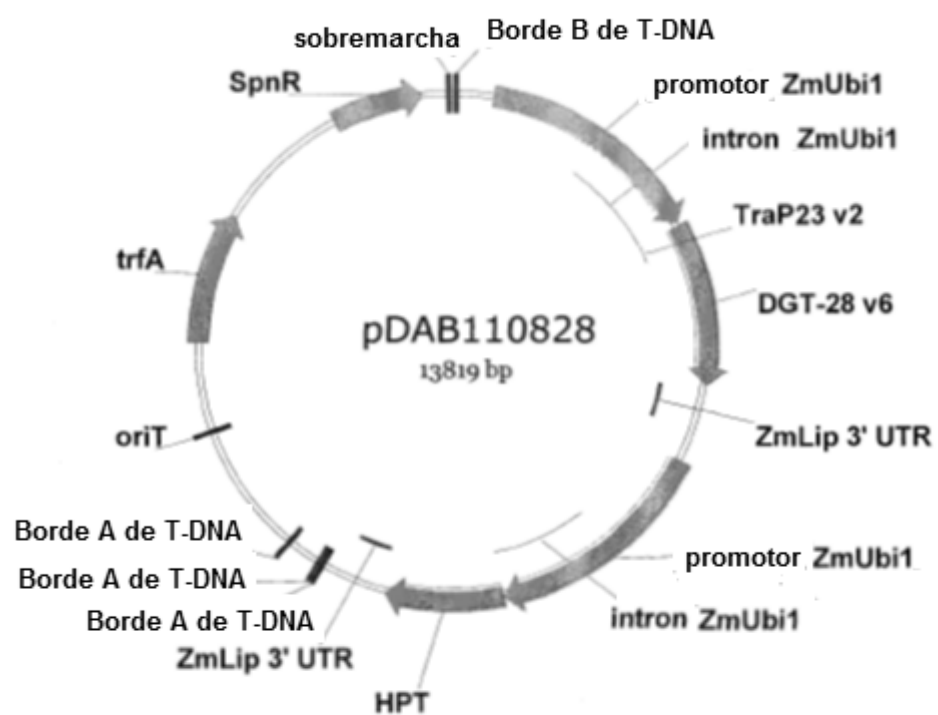


FIG. 47

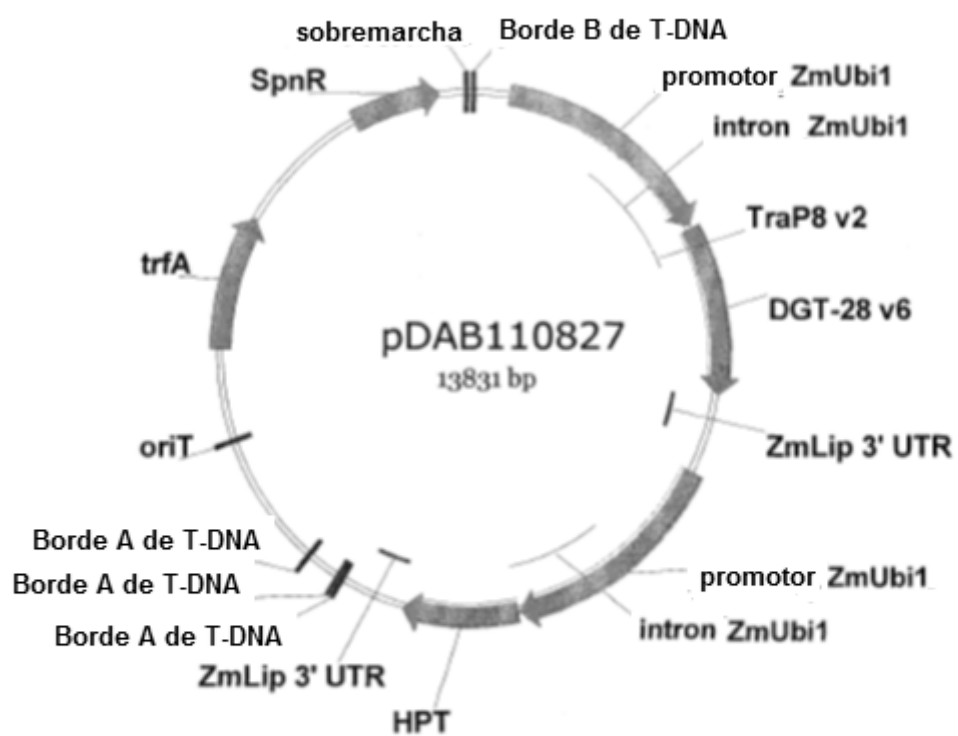


FIG. 48

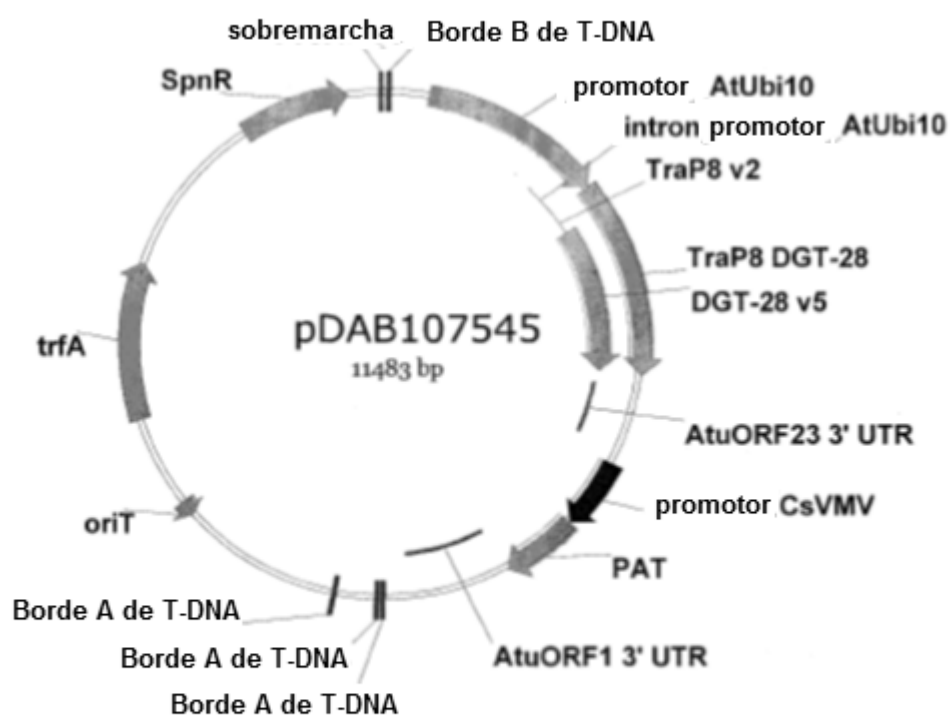


FIG. 49

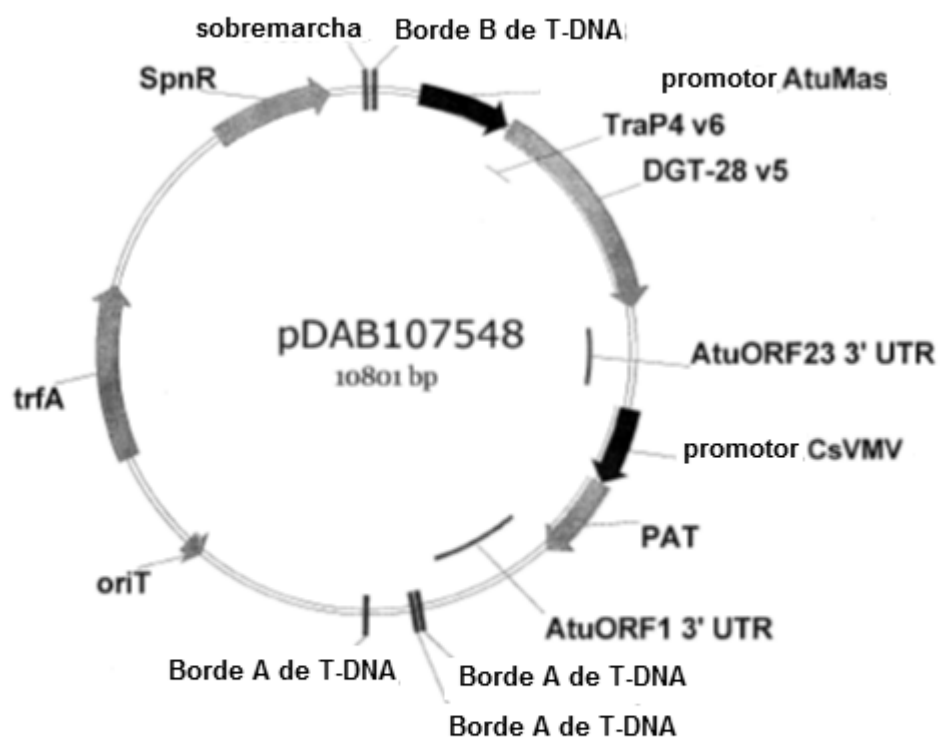


FIG. 50

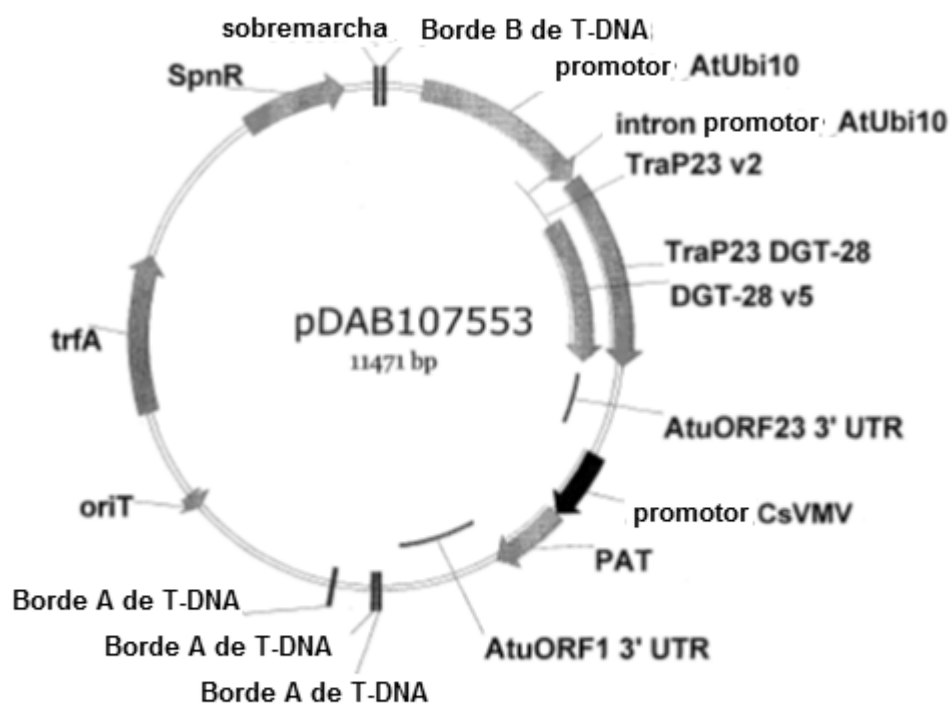


FIG. 51

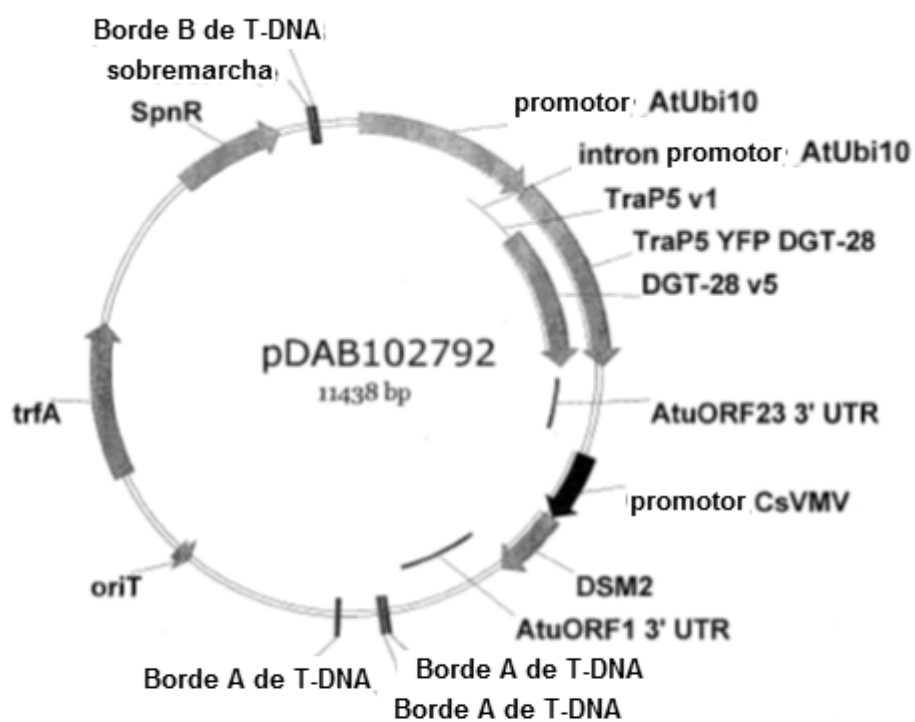


FIG. 52

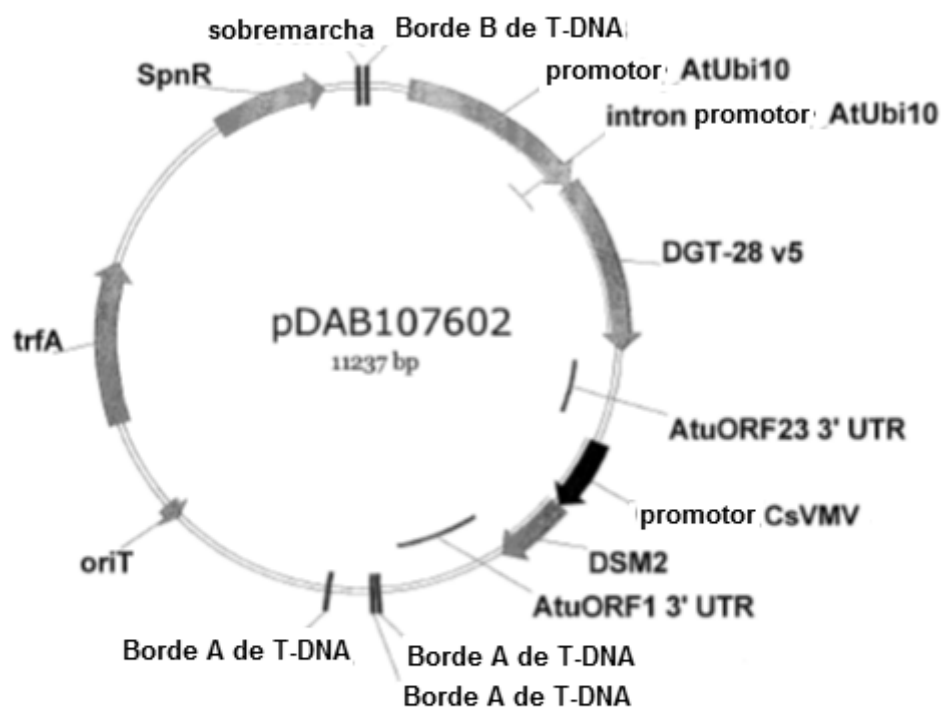


FIG. 53

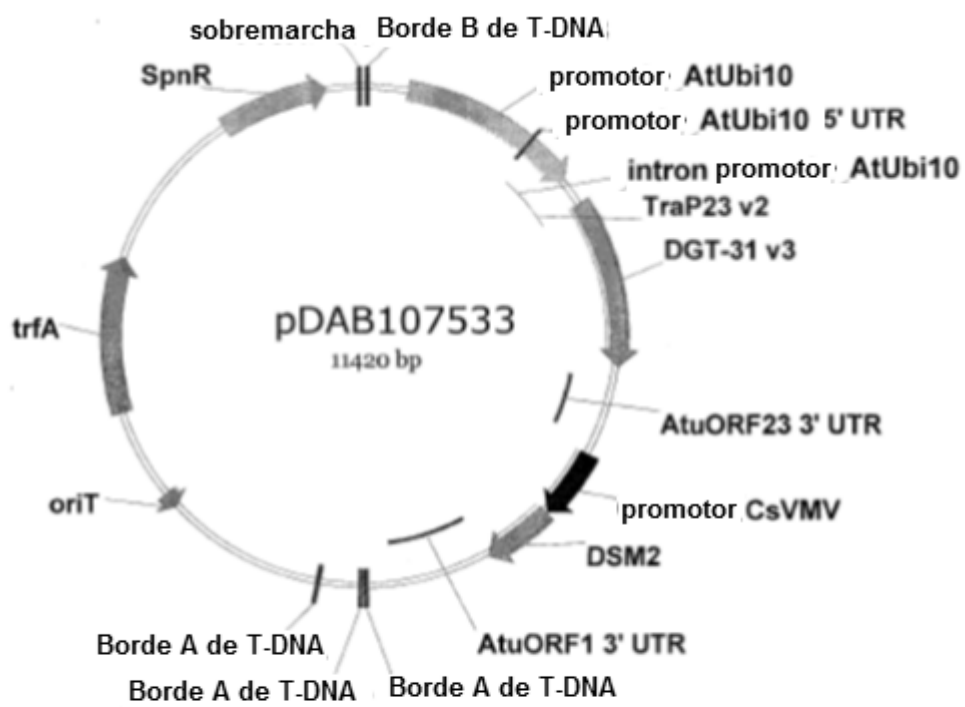


FIG. 54