

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 998**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2012 PCT/US2012/064831**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13074524**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2012 E 12850161 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2788482**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para aislar, identificar y caracterizar mutaciones tolerantes a herbicidas de ACCasa plástica de monocotiledónea usando un sistema modelo**

30 Prioridad:

14.11.2011 US 201161559618 P

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

09.01.2020

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**NEUTEBOOM, LEENDERT W.;
WHITT, SHERRY R.;
MCELVER, JOHN;
PAULIK, JILL MARIE y
MANKIN, S. LUKE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 736 998 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

Procedimientos y composiciones para aislar, identificar y caracterizar mutaciones tolerantes a herbicidas de ACCasa plástica de monocotiledónea usando un sistema modelo

5 **1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para identificar y aislar mutaciones tolerantes a herbicidas en acetil-CoA carboxilasas vegetales.

10 **2. Antecedentes de la invención**

Los herbicidas de ariloxifenoxipropionato (FOP) y ciclohexanodiona (DIM) se utilizan después de la emergencia en cultivos de dicotiledóneas para controlar las malezas gramíneas. Debido a que estos herbicidas efectivamente matan a la mayoría de las especies monocotiledóneas en bajas concentraciones, hay una baja toxicidad para los organismos no diana. Existe un gran potencial para el desarrollo de variedades de cereales que pueden tratarse después del brote para controlar hierbas de maleza que escapan a otros tratamientos con herbicidas preemergentes (Somers, 1996). Además, estos herbicidas tienen una baja persistencia en el suelo y brindan a los productores una mayor flexibilidad para el control de malezas y la rotación de cultivos. Por ejemplo, el arroz rojo es la plaga más generalizada y costosa en la producción de arroz en los Estados Unidos (Informe Anual 2006 del Centro Nacional de Investigación del Arroz del USDA-ARS Dale Bumpers) y puede servir como anfitrión para las enfermedades del arroz. El arroz CLEARFIELD® es la herramienta principal para el manejo del arroz rojo en áreas infestadas; sin embargo, el flujo de genes entre el arroz rojo y el arroz CLEARFIELD® puede dar como resultado ~170 híbridos F1/ha (Shivrain et al., 2007). Por lo tanto, las pautas de administración limitan la penetración del mercado de arroz CLEARFIELD® a dos de cada cuatro años en un campo determinado. Por lo tanto, la generación de arroz cultivado con tolerancia a diferentes herbicidas brindará a los agricultores CLEARFIELD® un socio de rotación para ayudar a manejar las poblaciones de maleza de arroz rojo.

Los FOP y DIM se dirigen a la enzima acetil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.2), que cataliza la primera etapa comprometida en la biosíntesis de ácidos grasos (FA). La ACCasa es una enzima biotinilada que convierte acetil-CoA en malonil-CoA en una reacción reversible de 2 etapas. En primer lugar, la enzima carboxila el grupo de biotina y luego la actividad carboxitransferasa intrínseca transfiere el grupo carboxilo de carboxibiotina a acetil-CoA (Nikolau et al., 2003). La actividad de ACCasa es necesaria en el plástido, que es el sitio principal para la biosíntesis de FA para la biogénesis de membrana. La actividad de ACCasa también está presente en el citosol, donde participa en la síntesis de FA de cadena muy larga y flavonoides (Chugh y Eudes, 2008). Las ACCasas, monocotiledóneas y dicotiledóneas citoplasmáticas multidominio no son sensibles a los herbicidas FOP y DIM. Es la forma plástica de ACCasa la que confiere la selectividad a esta clase de herbicidas. Las ACCasas plásticas dicot son naturalmente insensibles, mientras que las ACCasas plásticas monocotiledóneas son sensibles a los herbicidas. Las ACCasas plásticas son altamente expresadas en tejido meristemático para alimentar la alta demanda de biogénesis de membrana en plántulas jóvenes en rápido crecimiento (Podkowinski et al., 2003). Este rol esencial para el crecimiento explica la efectividad de la inhibición de ACCasa en las malezas post-emergentes.

Desde el inicio del uso de FOP y DIM para controlar las malezas en la agricultura mundial en la década de 1980, ha habido un surgimiento de tolerancia entre varias especies de malezas. Entre estos, los más ampliamente estudiados son *Alopecurus myosuroides* (pasto negro) y *Avena sterilis* (avena silvestre). Los estudios exhaustivos de mutantes de avena silvestre y pasto silvestre natural han revelado seis residuos dentro del dominio carboxiltransferasa de la isoforma plástica que confieren tolerancia a FOP y/o DIM (Delye et al., 2003; Delye et al., 2005; Liu et al., 2007) y estos son 11781L, W2027C, I2041N, G2096A, D2078G y C2088R (designación según la secuencia de referencia estándar de ACCasa de pasto negro). Curiosamente, I1781L y D2078G confieren tolerancia tanto a FOP como a DIM, mientras que las otras cuatro mutaciones confieren tolerancia solo a FOP, lo que sugiere que los sitios de unión de las dos clases de herbicidas se superponen, pero son distintos.

Dos enfoques para desarrollar arroz tolerante a DIM que se han probado incluyen los siguientes. En el primer enfoque, las mutaciones previamente identificadas en el pasto negro natural y la avena silvestre se introducen mediante técnicas de biología molecular en ACCasa plástica de arroz. Los efectos de las mutaciones se estudian en el arroz después de la transformación mediada por *Agrobacterium* de los genes ACCasa modificados. En última instancia, las mismas mutaciones se pueden diseñar en el locus endógeno a través de la orientación del gen del oligonucleótido (Beetham et al., 1999). En el segundo enfoque, el callo del arroz se propaga en un medio con un aumento gradual de las concentraciones de DIM. Este procedimiento puede enriquecer el callo de las células en las que la ACCasa plástica ha mutado para ser más tolerante al herbicida. Las plantas pueden regenerarse a partir del callo cuando se alcanza un nivel de tolerancia satisfactorio. Sin embargo, ambos enfoques están limitados en el número de mutaciones que se pueden generar y/o probar.

La levadura es un excelente organismo modelo para la detección y prueba de grandes números de genes ACCasa de arroz mutados para una mayor tolerancia a los herbicidas. Sin embargo, la levadura contiene un único gen de

ACCasa endógeno (ACC1), que codifica una proteína multidominio que es altamente tolerante a los herbicidas. La levadura haploide en la que se interrumpe ACC1 no es viable (Hasslacher et al., 1993). Joachimiak et al. (1997) introdujeron la ACCasa citoplásmica del trigo en una cepa heterocigota diploide para la ACC1. El análisis de tétrada estándar demostró que la mutación ACC1 se complementó con la planta ACCasa. Un experimento similar con el gen de ACCasa plastídica de trigo sensible a los herbicidas mostró que este gen no podía asumir la función de ACC1 (Nikolskaya et al., 1999). Una serie de constructos quiméricos que consisten en el extremo N de la ACCasa citoplásmica del trigo y el extremo C de la ACCasa plastídica del trigo se probaron para la complementación y la sensibilidad al herbicida. La ACCasa de trigo c60p40, que comprende el primer 60% de la ACCasa citoplásmica y el 40% de la ACCasa plastídica, complementó un mutante de delección de la ACCasa, $\Delta acc1$, al tiempo que muestra la mayor sensibilidad al haloxifop, clodinafop, quizalofop, cetoxidim y setoxidim de todos los constructos probados. La ACCasa quimérica c60p40 es un objetivo adecuado para la mutagénesis, ya que todas las mutaciones que confieren herbicidas conocidas se han mapeado en el último 40% de la ACCasa plastídica. Sin embargo, el enfoque de Joachimiak está limitado en su eficiencia en el hecho de que cada nuevo constructo de ACCasa plastídica mutante se introduce por separado en las células de levadura para crear un nuevo complemento de inactivación de levadura.

Los DIM y FOP son herbicidas importantes y existe la necesidad de procedimientos y composiciones para aislar, identificar y caracterizar variantes de ACCasa tolerantes a herbicidas. Los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria son adecuados para aislar, identificar y caracterizar tales variantes de ACCasa tolerantes a herbicidas. La cita o discusión de una referencia en la presente memoria no debe interpretarse como una admisión de que pertenece al estado de la técnica de la presente invención.

3. Sumario de la invención

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para producir una enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) que es tolerante a al menos un herbicida. Usualmente, los procedimientos de la invención son procedimientos de alto rendimiento tal como se definen en las reivindicaciones. Tales procedimientos comprenderán usualmente proporcionar una levadura deficiente en ACCasa que comprende un ácido nucleico que codifica una ACCasa quimérica. Cualquier molécula de ácido nucleico conocida en la técnica se puede usar para este propósito. Los ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, por ejemplo, plásmidos de copia única. La ACCasa quimérica codificada por el ácido nucleico comprenderá dos o más regiones. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprenderá una región N-terminal y una región C-terminal, en la que la región C-terminal comprende una región de sensibilidad a herbicidas (HSR). La levadura deficiente en ACCasa que comprende el ácido nucleico se pondrá en contacto con al menos un oligonucleótido mutagénico en condiciones que permitan la mutagénesis dirigida al sitio de al menos un codón del ácido nucleico que codifica la ACCasa quimérica. La levadura mutagenizada puede entonces cultivarse formando una biblioteca de colonias de levadura mutagenizadas. La biblioteca de colonias de levadura mutagenizadas puede cultivarse en presencia de al menos un herbicida inhibidor de ACCasa para formar colonias tratadas; y al menos una de dichas colonias tratadas aisladas para identificar al menos una levadura mutagenizada que crece en presencia del herbicida, en el que la levadura mutagenizada que crece en presencia del herbicida comprende una ACCasa mutagenizada que tiene una tolerancia al herbicida que es mayor que la exhibida por la ACCasa quimérica antes de la mutagénesis. Como se indicó anteriormente, usualmente estos procedimientos son de alto rendimiento, en el que, un trabajador capacitado puede generar y seleccionar al menos 500 diferentes ACCasas con HSR variante, cada una de su propia colonia celular, en 1 mes, más preferentemente al menos o aproximadamente 1000, 2000, o 4000, y preferentemente hasta aproximadamente 5000, 8000 o 10000 por mes; en comparación con el procedimiento de levadura de Nikolskaya (disección de tétrada) en el que un trabajador podría lograr de 10 a menos de aproximadamente 50. En algunas realizaciones de la invención, los procedimientos presentes pueden producir al menos aproximadamente 500, 1000, 2500, 5000 o 10000 diferentes ACCasas con HSR variante por mes por trabajador capacitado. Preferentemente, los procedimientos de la invención son capaces de producir al menos aproximadamente 1000, 2500, 5000 o 10000 diferentes ACCasas con HSR variante por mes por trabajador capacitado. Esto supone que el trabajador capacitado en cualquier caso comienza con todos los suministros necesarios de células competentes y vectores útiles para transformar esas células con oligos mutagénicos de acuerdo con una realización presente o con la variante ACCasa de acuerdo con el procedimiento de Nikolskaya; y que no se dividen colonias de células para formar multiplicados para su ensayo, una vez establecidas las colonias clonales.

La presente invención se refiere a procedimientos para producir, aislar, identificar y caracterizar variantes de ACCasa tolerantes a herbicidas. En una realización, la invención abarca un procedimiento de detección de una enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) que es tolerante a al menos un herbicida, que comprende: a) proporcionar una levadura deficiente en ACCasa con una ACCasa quimérica, comprendiendo dicha ACCasa quimérica: al menos dos regiones en las que dichas regiones comprenden además; i) una región N-terminal, dicha región N-terminal derivada de ACCasas citoplásmicas de levadura, hongos o monocotiledónea, preferentemente una ACCasa de levadura; ii) una región C-terminal, dicha región C-terminal derivada de ACCasas plastídicas monocotiledóneas de una *Poaceae* y que comprende una HSR; y iii) dicha región N-terminal comprende aproximadamente 50% a aproximadamente 60% de la ACCasa quimérica; b) aislar células de levadura tolerantes

a herbicidas después de cultivar en presencia de al menos un herbicida; y c) que además comprende identificar la(s) mutación(es) no presente(s) en la ACCasa quimérica antes del cultivo, lo que confiere tolerancia a al menos un herbicida.

5 En otras realizaciones, la presente invención se refiere a una célula de levadura tolerante a al menos un herbicida en el que la célula se produce al: a) complementar una levadura deficiente en ACCasa con una ACCasa quimérica, comprendiendo dicha ACCasa quimérica al menos dos regiones en las que dichas regiones comprenden además; i) una región N-terminal, dicha región N-terminal se deriva de ACCasas de levadura, hongos o monocotiledóneas; ii) una región C-terminal, dicha región C-terminal derivada de una o más ACCasas plastídicas de especies monocotiledóneas y que comprende una HSR; y iii) dicha región N-terminal comprende aproximadamente 50% a
10 aproximadamente 60% de la ACCasa quimérica; y b) aislar células de levadura tolerantes a herbicidas después de cultivar en presencia de al menos un herbicida.

15 En otras realizaciones adicionales, la presente invención se refiere a una célula de levadura aislada que comprende: a) ACCasa genómica no activa; b) un ácido nucleico que codifica una ACCasa quimérica, comprendiendo dicha ACCasa quimérica al menos dos regiones en las que dichas regiones comprenden además; i) una región N-terminal, dicha región N-terminal se deriva de ACCasas de levadura, hongos o monocotiledóneas; ii) una región C-terminal, dicha región C-terminal derivada de ACCasa plastídica de especies monocotiledóneas y que comprende una HSR; y iii) dicha región N-terminal comprende aproximadamente 50% a aproximadamente
20 60% de la ACCasa quimérica; y c) al menos un oligonucleótido que es mutagénico para la ACCasa no de levadura.

25 En otras realizaciones adicionales, la presente invención se refiere a una ACCasa mutante que es tolerante a al menos el herbicida en el que la ACCasa se identifica por: a) proporcionar una levadura deficiente en ACCasa con una ACCasa quimérica, comprendiendo dicha ACCasa quimérica al menos dos regiones en las que dichas regiones comprenden; i) una región N-terminal, dicha región N-terminal se deriva de ACCasas de levadura, hongos o monocotiledónea; ii) una región C-terminal, dicha región C-terminal derivada de ACCasas plastídicas de especies monocotiledóneas y que comprende una HSR; y iii) dicha región N-terminal comprende aproximadamente 50% a aproximadamente 60% de la ACCasa quimérica; b) aislar células de levadura tolerantes a herbicidas después de cultivar en presencia de al menos un herbicida; c) que comprende además identificar la(s) mutación(es) no
30 presente(s) en la ACCasa quimérica antes del cultivo, lo que confiere tolerancia a al menos un herbicida; y d) recapitular dicha mutación en un gen de ACCasa plastídica de monocotiledónea de longitud completa.

35 En otras realizaciones adicionales, la presente invención se refiere a una molécula de ADN aislada que codifica una ACCasa quimérica que es tolerante a al menos un herbicida, comprendiendo dicha ACCasa quimérica al menos dos regiones en las que dichas regiones comprenden; a) una región N-terminal, dicha región N-terminal derivada de ACCasas citoplásmicas de levadura, hongos o monocotiledónea; b) una región C-terminal, dicha región C-terminal derivada de ACCasas plastídicas monocotiledóneas y que comprende una HSR, en la que dicha región C-terminal comprende además al menos una mutación que confiere tolerancia al herbicida; y c) dicha región N-terminal comprende aproximadamente del 50% a aproximadamente el 60% de la ACCasa quimérica.

40 En otras realizaciones adicionales, la presente invención se refiere a una ACCasa quimérica aislada que es tolerante a al menos un herbicida, comprendiendo dicha ACCasa quimérica al menos dos regiones en las que dichas regiones comprenden: a) una región N-terminal, dicha región N-terminal derivada de ACCasas citoplásmicas de levadura, hongos o monocotiledónea; b) una región C-terminal, dicha región C-terminal derivada de ACCasas plastídicas monocotiledóneas y que comprende una HSR; y c) dicha región N-terminal comprende aproximadamente del 50% a aproximadamente el 60% de la ACCasa quimérica.

45 En otras realizaciones, los procedimientos de la invención y las composiciones descritas en la presente memoria abarcan levaduras deficientes en ACCasa debido a una mutación del gen de ACCasa de la levadura genómica que puede incluir una mutación puntual única, mutaciones puntuales múltiples, una delección parcial, una inactivación parcial, una delección completa y una inactivación completa.

50 En otras realizaciones, los procedimientos de la invención y las composiciones descritas en la presente memoria abarcan una ACCasa quimérica o mutante, en la que dicha región N-terminal se deriva de un género de levadura u hongo seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Ascomycetes*, *Neurospora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Chrysosporium*, *Yarrowia*, *Arxula* y *Hansenula*.

55 En otras realizaciones, los procedimientos de la invención y las composiciones descritas en la presente memoria abarcan una ACCasa quimérica o mutante, en la que dicha región N-terminal o región C-terminal se deriva de un género de monocotiledónea seleccionado del grupo que consiste en *Saccharum*, *Poa*, *Agrostis*, *Lolium*, *Festuca*, *Zoysia*, *Cynodon*, *Stenotaphrum*, *Paspalum*, *Eremochloa*, *Axonopus*, *Bouteloua*, *Arundinaria*, *Bambusa*, *Chusquea*, *Guadua*, *Shibataea*, *Erharta*, *Leersia*, *Microlaena*, *Oryza*, *Zizania*, *Triticeae*, *Aveneae*, *Hordeum*, *Lolium*, *Digitaria*, *Cyperus*, *Kyllinga*, *Erigeron*, *Hydrocotyle*, *Kummerowia*, *Euphorbia*, and *Viola*, *Zea*, *Sorghum*, *Pennisetum*, *Panicum*, *Setaria*, *Eleusine*, *Ananas* y *Musa*.

65

En una realización específica, los procedimientos de la invención y las composiciones descritas en la presente memoria abarcan una ACCasa quimérica, en la que dicha región N-terminal se deriva de una ACCasa citoplásmica de una especie de *Oryza*.

5 En otras realizaciones específicas adicionales, los procedimientos de la invención y las composiciones como se describen en la presente memoria abarcan una ACCasa quimérica, en la que dicha región C-terminal se deriva de una ACCasa plasmídica de una especie de *Oryza*.

10 En otras realizaciones, los procedimientos de la invención y las composiciones descritas en la presente memoria abarcan al menos un herbicida que es un herbicida ariloxifenoxipropionato (FOP) o ciclohexanodiona (DIM). En otras realizaciones, los procedimientos y composiciones de la invención abarcan un herbicida FOP seleccionado del grupo que consiste en haloxifop, cihalofop, quizalofop, diclofop, clodinafop, fluazifop, metamifop, propaquizafop y fenoxiprop. En otras realizaciones, los procedimientos y composiciones de la invención abarcan un herbicida DIM
15 seleccionado del grupo que consiste en aloxidim, butroxidim, cletodim, cicloxidim, tepraloxidim, setoxidim, tralkoxidim y profoxidim. En otras realizaciones adicionales, los procedimientos y composiciones de la invención abarcan al menos un herbicida presente en una concentración de aproximadamente 0,02 µM a aproximadamente 200 µM.

20 En otras realizaciones, los procedimientos de la invención y las composiciones descritas en la presente memoria abarcan la mutagénesis de la ACCasa quimérica. En realizaciones adicionales, los procedimientos y composiciones de la invención abarcan la mutagénesis inducida por agentes químicos, radiación ultravioleta o una biblioteca de oligos de ADN proporcionados a la célula de levadura.

25 En otras realizaciones, los procedimientos de la invención y las composiciones descritas en la presente memoria abarcan una ACCasa quimérica en la que la región C-terminal comprende aproximadamente del 50% a aproximadamente el 60% de la ACCasa quimérica.

30 En otras realizaciones, los procedimientos de la invención y las composiciones descritas en la presente memoria abarcan células de levadura cultivadas a una temperatura de aproximadamente 23°C a aproximadamente 30°C. En otras realizaciones, los procedimientos y composiciones de la invención abarcan células de levadura que se cultivan en un medio líquido o sólido.

35 En otras realizaciones, los procedimientos de la invención y las composiciones descritas en la presente memoria abarcan una ACCasa quimérica o mutante en la que dicha región C-terminal comprende una secuencia que codifica para al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en 11781L, W1999G, I1781T, V2049F, V2075L, V2075I, D2078G y V2098A.

4. Breve descripción de las figuras

40 Con el fin de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran ciertas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos de las realizaciones representadas en los dibujos.

45 La Figura 1A proporciona una vista esquemática de la estructura de dominio de una ACCasa plasmídica de monocotiledónea.

La Figura 1B proporciona una descripción general de la proteína quimérica OsJACCc60p40. Se indican los sitios de restricción únicos introducidos en la secuencia de ADN correspondiente para la subclonación. Los aminoácidos para los cuales se ha encontrado que las sustituciones confieren tolerancia a los herbicidas se indican mediante rectángulos blancos.

50 La Figura 2A proporciona una descripción general del plásmido RTP3240-1; La Figura 2B proporciona una descripción general del plásmido RTP4108; y la Figura 2C proporciona la secuencia de ADN de RTP4108 (SEQ ID NO: 13).

55 La Figura 3A proporciona una descripción general del plásmido RTP3378; y la Figura 3B proporciona la secuencia de ADN de la porción de ACCasa plasmídica del arroz del plásmido RTP3378 (SEQ ID NO: 14).

60 La Figura 4 proporciona una descripción general de las regiones p40 (40% plasmídica) de cuatro vectores de levadura utilizados en este trabajo. Todos los plásmidos eran idénticos a RTP4108 fuera de estas regiones. RLW001 y RTP4106 contienen un pequeño tramo que está optimizado para la expresión en arroz entre Acc65I y XhoI. La Figura 4 divulga la "etiqueta 10xHis" como la SEQ ID NO: 31.

65 La Figura 5 presenta una descripción general de la selección de evolución *in vitro* dirigida. En (a), se presenta una descripción general de la ACCasa quimérica de arroz presente en RTP4108. Los paneles (b) a (e) representan la mezcla aleatoria de plásmidos y cromosomas con el informante SGA (can1Δ::LEU2-MFApr-

HIS3/CAN1). Los plásmidos RTP4106, RTP4107 y RLW001 también se usaron para la transposición, (e) - (h). El panel (f) representa una biblioteca de fragmentos de ADN sintéticos con nucleótidos degenerados en una posición deseada para mutagenizar la ACCasa quimérica presente en la célula de levadura. El panel (g) representa los eventos de recombinación homóloga que ocurren entre la biblioteca de fragmentos de ADN sintéticos con el gen quimérico de la ACCasa en la célula de levadura, seguido de la detección de mutaciones que confieren tolerancia a los FOP o DIM junto con la secuenciación de mutaciones que confieren tolerancia en el panel (h).

La Figura 6 representa un ejemplo de verificación de la ausencia de una copia genómica intacta del gen *ACC1* de la levadura (pares de cebadores A y B) junto con la presencia del gen de la ACCasa quimérica (par de cebadores C). Las colonias haploides independientes que dependen de RTP4108 para la biosíntesis de FA se verificaron mediante PCR usando el conjunto A de cebadores específico de *ACC1* (*ACC1aFW* y *ACC1aRV*) y el conjunto B (*ACC1bFW* y *ACC1bRV*) y el conjunto C de cebadores específico de OsJACCc60p40 (c60p40-5924FW). Como control, se utilizó un haploide de levadura con *ACC1* en el cromosoma 14.

La Figura 7 representa una representación de 'Curvas de muerte' para RTP4108-8b-2 (indicado por 'c60p40'), RTP4107-5b-1 (indicado por 'Etiqueta His c60p40'), RLW001-1a-1 (indicado por 'I1781L'), RTP4106-7a-1 (indicado por "Etiqueta His I1781L") y levadura *ACC1* (indicado por '*ACC1*') con concentraciones variables de los herbicidas cicloxidim (7A), tepraloxidim (7B) y haloxyfop (7C). La levadura que contiene un gen *ACC1* de levadura de tipo salvaje se usó como control tolerante, el centro de cada inserto.

La Figura 8 es una tabla que muestra la frecuencia de las mutaciones observadas (columnas) después de la transformación con diferentes fragmentos y placas en diferentes DIM (filas). I1781X C100 = transformación llevada a cabo con fragmentos con degeneración en el triplete correspondiente a I1781 y chapado en cicloxidim 100 μ M. I1781X T1 = la misma transformación recubierta en tepraloxidim 1 μ M, etc. Control Wt = un fragmento correspondiente al fragmento I1781X, pero solo con el triplete que codifica isoleucina "Wt". Los cuadrados sombreados representan mutantes que obtuvieron la mutación deseada (de los cuales una fracción puede ser espontánea, ya que solo diferían en un nucleótido de la secuencia "Wt").

La Figura 9 es una tabla que muestra la frecuencia de las mutaciones observadas (columnas) después de la transformación con los fragmentos I2041X y W2027X y el recubrimiento en diferentes DIM (filas).

La Figura 10 es una tabla que muestra la frecuencia de las mutaciones dobles observadas (columnas) después de la transformación de fragmentos (donante) a cepas que ya tienen una mutación (aceptante) y se colocan en placa en tepraloxidim 75 μ M. Los cuadrados sombreados representan los mutantes dobles previstos. DuplV2075 significa una duplicación de V2075.

La Figura 11 es una tabla que muestra las mutaciones dobles identificadas al recubrir mutantes individuales y esperar segundas mutaciones espontáneas.

La Figura 12 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen *ACC1* de levadura que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxyfop. El número es la concentración en μ M.

La Figura 13 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxyfop. El número es la concentración en μ M.

La Figura 14 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxyfop. El número es la concentración en μ M. La mutación en la HSR es la indicada.

La Figura 15 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxyfop. El número es la concentración en μ M. La mutación en la HSR es la indicada.

La Figura 16 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxyfop. El número es la concentración en μ M. La mutación en la HSR es la indicada.

La Figura 82 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

5

La Figura 83 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

10

La Figura 84 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

15

La Figura 85 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

20

La Figura 86 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

25

La Figura 87 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen de ACCasa quimérica de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

30

La Figura 88 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen de ACCasa quimérica de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

35

La Figura 89 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

40

La Figura 90 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

45

La Figura 91 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

50

La Figura 92 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

55

La Figura 93 es un gráfico lineal que muestra el crecimiento de la levadura que expresa un gen quimérico de la ACCasa de la invención que crece en presencia de los herbicidas indicados. El crecimiento se mide como la OD_{600nm} (eje y) en función del tiempo en días. Los herbicidas utilizados son C = cicloxidim, T = tepraloxidim y H = haloxifop. El número es la concentración en μM. La mutación en la HSR es la indicada.

60

5. Terminología

Como se usa en la presente memoria, "tolerante" o "tolerante a herbicidas" indica una célula o cepa de levadura; una planta; o una célula vegetal capaz de crecer en presencia de una cantidad de herbicida que usualmente causa

65

inhibición del crecimiento en una célula o cepa de levadura no tolerante (por ejemplo, de tipo salvaje); una planta; o una célula vegetal.

5 Como se usa en la presente memoria, una ACCasa es "sensible" a un herbicida particular si la actividad enzimática de la ACCasa se reduce en presencia del herbicida cuando se compara con la actividad de la ACCasa en condiciones idénticas en ausencia del herbicida. En la Tabla 1 se exponen ejemplos de herbicidas a los que una ACCasa podría ser sensible.

10 **Tabla 1 Lista de herbicidas**

	Inhibidor de ACCasa	Clase	Compañía	Ejemplos de Nombres Comerciales	Tasa Máxima[g ai/ha]	Uso
	aloxidim	DIM	BASF	Fervin, Kusagard, NP-48Na, BAS 9021H	1000	POST
15	butroxidim	DIM	Syngenta	Falcon, ICI-A0500	75	POST
	cletodim	DIM	Valent	Select, Prism, RE-45601	280	POST
	clodinafop-propargil	FOP	Syngenta	Discover, Topik, CGA 184 927	80	POST
	cicloxiidim	DIM	BASF	Focus, Laser, Stratos, BAS 517H	448	POST
20	cihalofop-butil	FOP	Dow	Clincher, XDE 537, DEH 112	310	POST
	diclofop-metil	FOP	Bayer	Hoegrass, Hoelon, Illoxan, HOE 23408	1120	POST
	fenoxaprop-P-etil	FOP	Bayer	Super Whip, Option Super, Exel Super, HOE-46360, Aclaim, Puma S	111	POST
25	fluazifop-P-butil	FOP	Syngenta	Fusilade, Fusilade 2000, Fusilade DX, ICI-A 0009, ICI-A 0005, SL-236, IH-773B, TF-1169	210	POST
	haloxifop-etotil	FOP	Dow	Gallant, DOWCO 453EE	600	POST
	haloxifop-metil	FOP	Dow	Verdict, DOWCO 453ME	600	POST
30	haloxifop-P-metil	FOP	Dow	Edge, DE 535	600	POST
	metamifop	FOP	Dongbu	NA	201	POST
	pinoxaden	DEN	Syngenta	Axial	60	POST
	profoxidim	DIM	BASF	Aura, Tetris, BAS 625H	212	POST
35	propaquizafop	FOP	Syngenta	Agil, Shogun, Ro 17-3664	150	POST
	quizalofop-P-etil	FOP	DuPont	Assure, Assure II, DPX-Y6202-3, Targa Super, NC-302	112	POST
	quizalofop-P-tefuril	FOP	Uniroyal	Pantera, UBI C4874	112	POST
40	setoxidim	DIM	BASF	Poast, Poast Plus, NABU, Fervinal, NP-55, Sertin, BAS 562H	560	POST
	tepraloxidim	DIM	BASF	BAS 620H, Aramo	60	POST
	tralkoxidim	DIM	Syngenta	Achieve, Splendor, ICI-A0604	3400	POST

45 Como se usa en la presente memoria, "quimérico" se refiere a un polipéptido de origen no natural compuesto de dos o más regiones derivadas de diferentes fuentes. Los ejemplos de un polipéptido quimérico incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que tienen actividad ACCasa en la que los polipéptidos tienen una región N-terminal derivada de una fuente y una región C-terminal derivada de otra fuente. Los ejemplos de ACCasas quiméricas incluyen, pero no se limitan a, una ACCasa quimérica que comprende una región N-terminal derivada de una ACCasa citosólica de monocotiledónea y una región C-terminal derivada de una ACCasa plastídica de monocotiledónea, y una ACCasa quimérica que comprende una región N-terminal derivada de una ACCasa de levadura y una región C-terminal derivada de una ACCasa plastídica de monocotiledónea, por ejemplo, una ACCasa plastídica de arroz.

50 Como se usa en la presente memoria, una "levadura deficiente en ACCasa" es una célula o cepa de levadura que no expresa una actividad de ACCasa funcional distinta de la actividad de la ACCasa quimérica de la invención. Una célula de levadura deficiente en ACCasa comprenderá usualmente una fuente exógena de actividad de ACCasa, por ejemplo, un ácido nucleico extra-genómico, por ejemplo, un plásmido, que codifica una ACCasa quimérica de la invención.

60 Como se usa en la presente memoria, "recombinante" se refiere a un organismo que tiene material genético de diferentes fuentes.

65 Como se usa en la presente memoria, "mutagenizado" se refiere a un segmento de ADN que se ha modificado para contener uno o más nucleótidos que varían de la secuencia de ADN original. Cualquier procedimiento

conocido en la técnica se puede usar para inducir mutaciones. Los procedimientos para inducir mutaciones pueden inducir mutaciones en posiciones aleatorias en el material genético o pueden inducir mutaciones en ubicaciones específicas en el material genético (es decir, pueden ser técnicas de mutagénesis dirigida).

5 Como se usa en la presente memoria, los términos "tolerante a herbicida" y "resistente a herbicida" se usan indistintamente y se pretende que tengan un significado equivalente y un alcance equivalente. De manera similar, los términos "tolerancia a herbicidas" y "resistencia a herbicidas" se usan de manera intercambiable y se pretende que tengan un significado equivalente y un alcance equivalente. De manera similar, los términos "tolerante" y "resistente" se usan indistintamente y se pretende que tengan un significado equivalente y un alcance equivalente.

10 Como se usa en la presente memoria, la numeración de los aminoácidos y la numeración de la secuencia de ADN asociada se basan en la numeración de la ACCasa en *Alopecurus myosuroides* (pasto negro) (Genbank CAC84161.1) y se denota con un(*Am*). Las posiciones de referencia citadas en su interior están destinadas a corresponder al equivalente posicional recitado real en la ACCasa de *Alopecurus myosuroides*.

15 Como se usa en la presente memoria, y "región de sensibilidad a herbicida" (HSR) es una secuencia de aminoácidos presente en el dominio carboxil transferasa de una ACCasa plástica de monocotiledónea de una *Poaceae* que: (1) cuando está presente en la ACCasa en su tipo salvaje secuencia de aminoácidos, permite que la ACCasa sea sensible a la inhibición por al menos un herbicida DIM, FOP o DEN, y (2) es capaz de ser mutagenizado para contener al menos una sustitución de aminoácido que proporciona a la ACCasa tolerancia hacia al menos un herbicida DIM, FOP o DEN. Como mínimo, la HSR de tipo salvaje comprende una secuencia de aminoácidos de la ACCasa plástica de monocotiledónea de o correspondiente a los residuos 1781(*Am*) - 2098(*Am*).

25 Como se usa en la presente memoria, "alto rendimiento" significa capaz de producir al menos aproximadamente 500, 1000, 2500, 5000 o 10000 diferentes ACCasas con HSR variante por mes por trabajador capacitado. Preferentemente, los procedimientos de la invención son capaces de producir al menos aproximadamente 1000, 2500, 5000 o 10000 diferentes ACCasas con HSR variante por mes por trabajador capacitado

30 Descripción detallada

La invención abarca procedimientos y composiciones (que no son parte de la invención) útiles para aislar, identificar y caracterizar mutaciones en ACCasa que confieren tolerancia a al menos un herbicida. Para este propósito, se empleó un sistema de modelo de levadura. El sistema de modelo de levadura incluía una célula de levadura deficiente en ACCasa con una ACCasa química que comprende y HSR. La ACCasa química complementa la deficiencia de ACCasa de la levadura. Los procedimientos y composiciones abarcados por la invención se refieren a la fabricación y uso de dicho sistema para aislar, identificar y caracterizar mutaciones en ACCasa que confieren tolerancia a un herbicida mediante el escrutinio o selección en medios con herbicida presente. Dichos mutantes aislados en la ACCasa que confieren tolerancia al herbicida no están presentes antes de la selección o el cultivo en presencia de herbicida.

Los sistemas de detección de la técnica antecedente, por ejemplo, reportados por Nikolskaya, estaban limitados en el número de mutaciones que podían generarse y analizarse. La presente invención ha superado estas limitaciones expresando la ACCasa química de la invención a partir de un plásmido de copia única. Cualquier mutación, ya sea espontánea o introducida mediante transformación, se identificará de manera mucho más eficiente. Los sistemas de la técnica antecedente hicieron uso de plásmidos de alto número de copias (como pRS426 con 20 copias/célula haploide). En teoría, un plásmido único con una mutación que confiere resistencia a los herbicidas podría formarse en presencia de 19 plásmidos de tipo salvaje en una célula. En rondas subsiguientes de división celular, las células hijas deberían comenzar a contener el plásmido mutado solo, si la presión de selección se mantiene en todo momento. Sin embargo, esto no sucede, porque la expresión del plásmido mutado inicial, único, entre los 19 plásmidos de tipo salvaje no es lo suficientemente robusta como para atravesar las etapas iniciales de la presión de selección de herbicida. Una dificultad adicional del procedimiento de la técnica antecedente es el fracaso del constructo de la técnica antecedente para complementar eficazmente en levadura a 30 grados. Solo complementa eficientemente a 23 grados. Las ACCasas químicas descritas en la presente memoria son más eficientes y se complementan a 30 grados.

En algunas realizaciones, la invención abarca un procedimiento para seleccionar una enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) que es tolerante a al menos un herbicida. Usualmente, tales procedimientos pueden incluir proporcionar una célula de levadura deficiente en la actividad de la ACCasa, es decir, una célula de levadura deficiente de la ACCasa. Además, tales procedimientos pueden incluir proporcionar una levadura deficiente en ACCasa con una ACCasa química. La ACCasa química puede comprender al menos dos o más regiones. La ACCasa química puede comprender una región N-terminal. La región N-terminal puede derivarse de una ACCasa citoplásmica de levadura, hongos o monocotiledónea. La región N-terminal puede comprender de aproximadamente 10% a aproximadamente 75% de la ACCasa química. La ACCasa química también comprende una región C-terminal. Usualmente, la región C-terminal puede comprender de aproximadamente 90%

a aproximadamente 25% de la ACCasa quimérica. La región C-terminal comprende una HSR y puede derivarse de una ACCasa plastídica de monocotiledónea sensible a al menos un herbicida. Los porcentajes en la presente memoria se calculan en relación con los aminoácidos 98-2320 de una ACCasa *Am* madura.

5 En otras realizaciones, la invención abarca procedimientos para aislar células de levadura tolerantes a herbicidas que expresan una ACCasa quimérica después de cultivar en presencia de al menos un herbicida. Usualmente, la ACCasa quimérica en tales células de levadura tolerantes a herbicida puede albergar al menos una mutación que confiere la tolerancia al herbicida en que se cultiva la célula de levadura. Además, la mutación(s) que confiere tolerancia a la ACCasa y la célula de levadura además se puede identificar usando las células de levadura.

10 En otras realizaciones, la invención abarca una célula de levadura tolerante a al menos un herbicida. Dicha célula de levadura puede producirse complementando una levadura deficiente en ACCasa con una ACCasa quimérica. Usualmente, la ACCasa quimérica puede comprender al menos dos o más regiones. La ACCasa quimérica puede comprender una región N-terminal. La región N-terminal se puede derivar de una ACCasa citoplásmica de levadura, hongos, dicotiledónea o monocotiledónea. La región N-terminal puede comprender de aproximadamente 10% a aproximadamente 75% de la ACCasa quimérica. La ACCasa quimérica también comprende una región C-terminal. Usualmente, la región C-terminal puede comprender de aproximadamente 90% a aproximadamente 25% de la ACCasa quimérica. La región C-terminal comprende una HSR y puede derivarse de una ACCasa plastídica de monocotiledónea sensible a al menos un herbicida. En general, la célula de levadura puede cultivarse en presencia de al menos uno o más herbicidas.

25 En otras realizaciones adicionales, la invención abarca una molécula de ADN aislada que codifica una ACCasa quimérica que es tolerante a al menos un herbicida. En algunas realizaciones, la molécula de ADN codifica una ACCasa quimérica que comprende al menos dos o más regiones. Usualmente, la molécula de ADN codifica una ACCasa quimérica que puede comprender al menos una o más regiones N-terminales. En general, la molécula de ADN codifica una región N-terminal de la ACCasa que puede derivarse de las ACCasas citoplásmicas de levadura, hongos, dicotiledóneas o monocotiledóneas. La región N-terminal puede comprender de aproximadamente 10% a aproximadamente 75% de la ACCasa quimérica. La ACCasa quimérica codificada por la molécula de ADN también comprende al menos una región C-terminal. La región C-terminal que puede comprender de aproximadamente 90% a aproximadamente 25% de la ACCasa quimérica. La región C-terminal comprenderá una HSR y se puede derivar de una ACCasa plastídica de monocotiledónea sensible a al menos un herbicida.

35 En otras realizaciones, la invención abarca una ACCasa quimérica aislada que es tolerante a al menos un herbicida. La ACCasa quimérica puede comprender una región N-terminal. La región N-terminal puede derivarse de una ACCasa citoplásmica de levadura, hongos, dicotiledónea o monocotiledónea. La región N-terminal puede comprender de aproximadamente 10% a aproximadamente 75% de la ACCasa quimérica. La ACCasa quimérica también comprende una región C-terminal. Usualmente, la región C-terminal puede comprender de aproximadamente 90% a aproximadamente 25% de la ACCasa quimérica. La región C-terminal comprende una HSR y puede derivarse de una ACCasa plastídica de monocotiledónea sensible a al menos un herbicida.

40 En otras realizaciones adicionales, la invención abarca una ACCasa mutante que es tolerante a al menos un herbicida. Usualmente, la ACCasa mutante se genera al inducir una o más mutaciones en la HSR de una ACCasa quimérica. La ACCasa quimérica puede comprender una región N-terminal. La región N-terminal puede derivarse de una ACCasa citoplásmica de levadura, hongos, dicotiledónea o monocotiledónea. La región N-terminal puede comprender de aproximadamente 10% a aproximadamente 75% de la ACCasa quimérica. La ACCasa quimérica también comprende una región C-terminal. Usualmente, la región C-terminal puede comprender de aproximadamente 90% a aproximadamente 25% de la ACCasa quimérica. La región C-terminal comprende una HSR y puede derivarse de una ACCasa plastídica de monocotiledónea sensible a al menos un herbicida. Una vez inducida, la mutación o mutaciones en la ACCasa quimérica que dan como resultado la tolerancia a los herbicidas en la célula de levadura se pueden identificar, por ejemplo, mediante la secuenciación de la molécula de ADN que codifica la ACCasa quimérica. Además, el procedimiento puede comprender la introducción de la(s) mutación(es) tolerante(s) a los herbicidas identificadas de la ACCasa quimérica en una ACCasa de longitud completa u otra.

Levadura deficiente en ACCasa y complementación con ACCasa quimérica

55 La levadura contiene un único gen endógeno de ACCasa (*ACC1*), que codifica una proteína multidominio que es altamente tolerante a los herbicidas. La levadura haploide en la que se interrumpe *ACC1* no es viable (Hasslacher et al., 1993).

60 En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención comprenden levadura deficiente en ACCasa. Una levadura deficiente en ACCasa puede carecer de actividad endógena de ACCasa debido a una o más mutaciones del gen de ACCasa de levadura genómica que puede incluir una mutación puntual única, mutaciones puntuales múltiples, una delección parcial, una inactivación parcial, una delección completa y una inactivación completa. Usualmente, la actividad de la ACCasa de la levadura genómica puede reducirse o eliminarse usando otras

65

técnicas de biología molecular, como ARNi, ARNip o ARN antisentido. Tales técnicas de biología molecular son bien conocidas en la técnica.

5 En algunas realizaciones, la invención comprende la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica una ACCasa quimérica en una cepa de levadura diploide heterocigota para un gen *ACC1* genómico funcional. Usualmente, el procedimiento incluye verificar la incorporación del ácido nucleico que codifica la ACCasa quimérica en una cepa heterocigota. En general, el procedimiento también puede incluir la inducción de la esporulación y el aislamiento de células de levadura haploides que contienen un gen *ACC1* de levadura inactiva y un gen de ACCasa quimérica. Por consiguiente, el procedimiento puede incluir verificar la incorporación de la ACCasa quimérica en una cepa haploide con un gen *ACC1* genómico inactivado.

15 En una realización alternativa, la invención comprende la incorporación de una molécula de ácido nucleico que codifica una ACCasa quimérica en una cepa homocigótica seguida de la inactivación de una o ambas copias del gen *ACC1* de levadura. Usualmente, el procedimiento incluye verificar la incorporación del gen quimérico de la ACCasa en una cepa homocigótica. En otras realizaciones adicionales, la invención comprende la inducción de la esporulación y el aislamiento de células de levadura haploides que contienen un gen *ACC1* de levadura inactiva y un gen de ACCasa quimérica.

20 En otras realizaciones, la invención comprende un gen de ACCasa quimérica que complementa una deficiencia en el gen *ACC1* de la levadura. En otras realizaciones, la complementación de la deficiencia del gen *ACC1* de la levadura se produce cuando las células de levadura que contienen la ACCasa quimérica se cultivan a una temperatura de aproximadamente 23°C a aproximadamente 30°C. En otras realizaciones, la complementación del gen *ACC1* de la levadura se produce cuando las células de levadura que contienen la ACCasa quimérica se cultivan a una temperatura de aproximadamente 23°C, aproximadamente 24°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 26°C, 27°C, aproximadamente 28°C, aproximadamente 29°C, o aproximadamente 30°C. En otras realizaciones adicionales, la complementación puede ocurrir a una temperatura permisiva, pero no a una temperatura restrictiva. Estas temperaturas permisivas pueden oscilar entre aproximadamente 23°C y aproximadamente 30°C. En otras realizaciones, dichas temperaturas permisivas pueden ser aproximadamente 23°C, aproximadamente 24°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 26°C, 27°C, aproximadamente 28°C, aproximadamente 29°C o aproximadamente 30°C. En otras realizaciones, las temperaturas restrictivas incluyen, pero no se limitan a, un intervalo de aproximadamente 23°C a aproximadamente 30°C. En otras realizaciones, dichas temperaturas permisivas pueden ser aproximadamente 23°C, aproximadamente 24°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 26°C, 27°C, aproximadamente 28°C, aproximadamente 29°C o aproximadamente 30°C.

35 ACCasas quiméricas

40 En una realización, la presente invención abarca ACCasas quiméricas y moléculas de ácido nucleico que las codifican. En general, al menos una parte de la ACCasa quimérica comprenderá una secuencia de aminoácidos que es la misma que, o corresponde a, la encontrada en una ACCasa plástidica de monocotiledónea, por ejemplo, en la ACCasa 2 multifuncional de *Alopecurus myosuroides* (Genbank CAC84161).

45 Las ACCasas plásticas monocotiledóneas comparten una estructura similar caracterizada por la aparición y disposición de 8 regiones funcionales como se muestra en la Figura 1A. Los números de residuos(*Am*) para estas regiones son los siguientes (las viñetas muestran las regiones que pertenecen a la Región 1 o Región 5).

Parte de AmACCasa	Inicio	Fin
AmACCasa	1	2320
Región 1	135	643
• Región 2	135	257
• Región 3	259	492
• Región 4	530	637
Región 5	703	841
• Región 6	787	841
Región 7	842	1556
Región 8	1654	2204

50 Las designaciones oficiales de COG de la base de datos de "Agrupaciones de Grupos Ortólogos" administrada por el Centro Nacional de Información Biotecnológica NIH de los Estados Unidos en Bethesda, MD, EE. UU. y/o las designaciones de pfam de la base de datos de "Familias de Proteínas Pfam" administrada El Instituto Wellcome Trust Sanger, en Hinxton, Cambridge, Reino Unido, de cada una de estas regiones es como se indica a continuación.

Región 1: COG0439 (Biotin carboxilasa [metabolismo lipídico])

65

ES 2 736 998 T3

Región 1 que contiene las Regiones 2, 3, 4:

Región 2: pfam00289 (CPSase_L_cadena) cadena L de carbamoil-fosfato sintasa, dominio N-terminal;

5 Región 3: pfam02786 (CPSase_L_D2) cadena L de carbamoil-fosfato sintasa, dominio de unión a ATP;

Región 4: pfam02785 (Biotin_carb_C) Dominio C-terminal de la biotin carboxilasa.

10 Región 5: COG0511 (Proteína portadora de biotin carboxil [metabolismo lipídico])

Región 5 que contiene la Región 6

Región 6: pfam00364 (Biotin_lipoil) Enzima que requiere biotina.

15 Región 7: pfam08326 (ACC_central) acetil-CoA carboxilasa, región central.

Región 8: pfam01039 (Carboxil_trans) Dominio de carboxil transferasa (de carboxilasas dependientes de biotina).

20 El dominio carboxil transferasa cataliza la transcarboxilación de biotina a una molécula aceptante. Todas las ACCasas útiles como fuentes de secuencias para construir enzimas ACCasa químicas para la práctica de la presente invención contienen un conjunto de estas 8 regiones, dispuestas en el mismo orden relativo. Por lo tanto, la numeración de residuos estandarizada para todas las ACCasas plastídicas monocotiledóneas, así como para todas las dicotiledóneas, levaduras y animales citosólicos/etc. Las ACCasas multifuncionales enumeradas en la presente memoria se basan en el estándar Am ACCasa, al que todas son homólogos.

30 La región 8 comprende el dominio carboxil transferasa de la enzima ACCasa de la invención. La sensibilidad a los herbicidas se ha mapeado en una región denominada Región de Sensibilidad a los Herbicidas (HSR) ubicada en la región 8 de las ACCasas plastídicas de monocotiledóneas. Toda o una parte de la región 8 de una ACCasa plastídica de monocotiledónea se puede usar como una HSR. Por ejemplo, una ACCasa química de la invención puede comprender una HSR que comienza desde 1654(Am) hasta 1781(Am), y podría terminar, por ejemplo, desde 2098(Am) hasta 2204(Am). Por lo tanto, una HSR de la invención puede comprender aminoácidos correspondientes a 1654(Am) a 2204(Am), 1654(Am) a 2130(Am), 1654(Am) a 2098(Am), 1750(Am) a 2204(Am), 1750(Am) a 2130(Am), 1750(Am) a 2098(Am), 1781(Am) a 2204(Am), 1781(Am) a 2130(Am) o 1781(Am) a 2098(Am). Los ejemplos de regiones HSR adecuadas para uso en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las de la siguiente tabla.

Tabla de secuencias deHSR

40	A. myosuroides O. sativa E. crus-galli Set. italica Sor. bicolor	ihgsaaiaa ysrayeetft ltfvtgrtv igaylarlgi rciqridqpi ihgsaaiaa ysrayketft ltfvtgrtv igaylarlgi rciqrlsqpi ihgsaaiaa ysrayeetft ltfvtgrtv igaylarlgi rciqrlsqpi ihgsaaiaa ysrayeetft ltfvtgrtv igaylarlgi rciqrlsqpi ihgsaaiaa ysrayeetft ltfvtgrtv igaylarlgi rciqrlsqpi
45	T. aestivum Z. mays	ihgsaaiaa ysrayeetft ltfvtgrtv igaylarlgi rciqrtdqpi ihgsaaiaa ysrayeetft ltfvtgrtv igaylarlgi rciqrlsqpi
50	A. myosuroides O. sativa E. crus-galli Set. italica Sor. bicolor T. aestivum Z. mays	iltgfsalnkl lgrevyssh mqlggpkima tngvvhltvp ddlegvsnil iltgfsalnkl lgrevyssh mqlggpkima tngvvhltvs ddlegvsnil iltgfsalnkl lgrevyssh mqlggpkima tngvvhltvs ddlegvsnil iltgfsalnkl lgrevyssh mqlggpkima tngvvhltvs ddlegvsnil iltgfsalnkl lgrevyssh mqlggpkima tngvvhltvp ddlegvsnil iltgfsalnkl lgrevyssh mqlggpkima tngvvhltvs ddlegvsnil iltgfsalnkl lgrevyssh mqlggpkima tngvvhltvp ddlegvsnil
55	A. myosuroides O. sativa E. crus-galli Set. italica Sor. bicolor T. aestivum Z. mays	rwlsyvpani ggplpitksl dpidrpvayi pentcdpraa isgiddsqgk rwlsyvpani ggplpvttpl dpidrpvayi pentcdpraa irgvddsqqgk rwlsyvpani ggplpitkpl dpidrpvayi pentcdpraa irgvddsqqgk rwlsyvpani ggplpitkpl dpidrpvayi pentcdpraa irgvddsqqgk rwlsyvpani ggplpitksl dpidrpvayi pentcdpraa isgiddsqgk rwlsyvpani ggplpitkpl dpidrpvayi pentcdpraa icgvddsqqgk
60	A. myosuroides O. sativa	wlggmfdkds fvtefegwak tvvtgraklg gipvgviave tqtmmlvpa wlggmfdkds fvtefegwak tvvtgraklg gipvgviave tqtmmlqtpa
65		

5	E. crus-galli Set. italica Sor. bicolor T. aestivum Z. mays	wlggmfkdks fvetfegwak tvvtgraklg gipvgviave tqtmmlqlipa wlggmfkdks fvetfegwak tvvtgraklg gipvgviave tqtmmlqlipa wlggmfkdks fvetfegwak tvvtgraklg gipvgviave tqtmmlqlipa wlggmfkdks fvetfegwak tvvtgraklg gipvgviave tqtmmlqlipa wlggmfkdks fvetfegwak tvvtgraklg gipvgviave tqtmmlqlipa
10	A. myosuroides O. sativa E. crus-galli Set. italica Sor. bicolor T. aestivum Z. mays	dpgqpdsher svpragqvwf pdsatktaqa mldfnreglp lfilanwrgf dpgqpdsher svpragqvwf pdsatktaqa lldfnreglp lfilanwrgf dpgqpdsher svpragqvwf pdsatktaqa lldfnreglp lfilanwrgf dpgqpdsher svpragqvwf pdsatktaqa lldfnreglp lfilanwrgf dpgqpdsher svpragqvwf pdsatktaqa lldfnreglp lfilanwrgf dpgqpdsher svpragqvwf pdsatktaqa mldfnreglp lfilanwrgf dpgqpdsher svpragqvwf pdsatktaqa lldfnreglp lfilanwrgf
15	A. myosuroides O. sativa E. crus-galli Set. italica Sor. bicolor T. aestivum Z. mays	sggqrdlfeg ilqagstive nlrtnqpaf vyipkaaelr ggawvvidsk sggqrdlfeg ilqagstive nlrtnqpaf vyipmaaelr ggawvvidsk sggqrdlfeg ilqagstive nlrtnqpaf vyipmagelr ggawvvidsk sggqrdlfeg ilqagstive nlrtnqpaf vyipmagelr ggawvvidsk sggqrdlfeg ilqagstive nlrtnqpaf vyipmagelr ggawvvidsk sggqrdlfeg ilqagstive nlrtnqpaf vyipkaaelr ggawvvidsk sggqrdlfeg ilqagstive nlrtnqpaf vyipmagelr ggawvvidsk
20	A. myosuroides O. sativa E. crus-galli Set. italica Sor. bicolor T. aestivum Z. mays	inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 15) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 16) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 17) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 18) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 19) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 20) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 21)
25	A. myosuroides O. sativa E. crus-galli Set. italica Sor. bicolor T. aestivum Z. mays	inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 15) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 16) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 17) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 18) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 19) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 20) inpdriecya ertakgnv (SEQ ID NO: 21)
30		

Estas secuencias son *Alopecurus myosuroides* 1781-2098 (número de acceso del GenBank CAC84161); *Oryza sativa* 1792-2109 (número de acceso del GenBank AAM18728); *Echinochloa crus-galli* 1775-2092 (número de acceso del GenBank ADR32358); *Setaria italica* 1780-2097 (número de acceso del GenBank AAO62902); *Sorgo bicolor* 1785-2102 (número de acceso del GenBank EES 10506); *Triticum aestivum* 1769-2086 (número de acceso del GenBank AAC49275); *Zea mays* 1783-2100 (número de acceso del GenBank AAP78896).

Las ACCasas quiméricas de la invención comprenden usualmente al menos dos regiones, una región N-terminal y una región C-terminal. Usualmente, la presente invención puede abarcar ACCasas quiméricas de longitud completa. Alternativamente, la presente invención puede abarcar ACCasas quiméricas con extremos N-terminales y/o C-terminales truncados que retienen la actividad de acetil-CoA carboxilasa. Además, las ACCasas quiméricas pueden incluir regiones N-terminales y/o C-terminales que incluyen secuencias que se derivan de las mismas fuentes que el resto de las regiones N-terminales y/o C-terminales. Dichas secuencias pueden incorporarse con fines de identificación de mutantes, purificación de la ACCasa u otras funciones similares.

45 **Regiones N-terminales de ACCasas quiméricas**

En la presente memoria también se describe una ACCasa quimérica con una región N-terminal derivada de una ACCasa de levadura, hongos, dicotiledónea o monocotiledónea. En una realización específica, la región N-terminal de la ACCasa quimérica se puede derivar de una ACCasa citoplásmica de arroz. Alternativamente, la región N-terminal puede derivarse de *Saccharomyces*. Además, aunque las ACCasas citoplásmicas de monocotiledónea son fuentes preferidas de regiones N-terminales, otras fuentes de región N-terminal incluyen ACCasas citoplásmicas de dicotiledónea, levaduras y animales y otras (por ejemplo, retículo endoplásmico), cuyos ejemplos se proporcionan en la presente memoria. Cualquier ACCasa que sea multifuncional, homóloga/hibridable con y dentro del mismo intervalo de tamaño general, por ejemplo, 2000-2500 aminoácidos, o más preferentemente 2200-2400 aminoácidos, se puede usar como fuente de la región N-terminal de una ACCasa quimérica de la invención.

Usualmente, la región N-terminal comprende de aproximadamente 10% a aproximadamente 75% de la longitud total de la ACCasa quimérica. Más específicamente, la región N-terminal puede comprender aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, o aproximadamente el 75% de la longitud total de la ACCasa quimérica.

Cuando la región N-terminal comprende aproximadamente el 10% de la ACCasa quimérica, el residuo de aminoácido más 3' de la región N-terminal puede corresponder a un aminoácido en la vecindad de 319(Am). Cuando la región N-terminal comprende aproximadamente el 20% de la ACCasa quimérica, el residuo de

aminoácido más 3' de la región N-terminal puede corresponder a un aminoácido en la vecindad de 542(*Am*). Cuando la región N-terminal comprende aproximadamente el 30% de la ACCasa quimérica, el residuo de aminoácido más 3' de la región N-terminal puede corresponder a un aminoácido en la vecindad de 764(*Am*). En algunas realizaciones, la región N-terminal comprende aproximadamente el 62% de la ACCasa quimérica y el residuo de aminoácido más 3' de la región N-terminal puede corresponder a un aminoácido en la vecindad de 1472(*Am*). En algunas realizaciones, la región N-terminal comprende aproximadamente el 39% de la ACCasa quimérica y el residuo de aminoácido más 3' de la región N-terminal puede corresponder a un aminoácido en la vecindad de 969(*Am*). En algunas realizaciones, la región N-terminal comprende aproximadamente el 33,5% de la ACCasa quimérica y el residuo de aminoácido más 3' de la región N-terminal puede corresponder a un aminoácido en la vecindad de 841(*Am*). En algunas realizaciones, la región N-terminal comprende aproximadamente el 76% de la ACCasa quimérica y el residuo de aminoácido más 3' de la región N-terminal puede corresponder a un aminoácido en la vecindad de 1781(*Am*).

En algunas realizaciones preferidas, la región N-terminal comprende de aproximadamente el 35% a aproximadamente el 76% de la longitud de la ACCasa quimérica, suponiendo que la longitud total de la ACCasa quimérica es aproximadamente la misma que la de los aminoácidos 98-2320 de una ACCasa *Am* madura.

En algunas realizaciones, la región N-terminal puede comprender las regiones 1 a 7, 1 a 6, o 1-5 de una ACCasa derivada de una ACCasa citoplásmica de levadura, hongos, dicotiledónea o monocotiledónea.

En algunas realizaciones, las regiones N-terminales de la invención comienzan en la metionina citoplasmática cuya posición corresponde a la ACCasa *Am* (plastídica) H98. En otras realizaciones, las regiones N-terminales pueden comenzar con otras metioninas nativas, por ejemplo, la metionina citoplasmática correspondiente a *Am* ACCasa M104 o S111. La siguiente alineación muestra las posiciones de otros residuos de metionina en las ACCasas citosólicas que pueden usarse como el primer aminoácido de la región N-terminal de las ACCasas quiméricas de la invención (vea las flechas a continuación). En la alineación, las secuencias citosólicas se muestran con una numeración que comienza en sus residuos nativos de Met-1, mientras que las secuencias plastídicas se muestran sin sus péptidos líderes/péptidos de tránsito del cloroplasto (ctps).

100	110	120	
HKASYQMNGILNESHNGRHAS-LSKVY			ACCasa <i>Am</i> plastídica (sin líder/ctp)
VPGSYQMNGIINETHNGRHAS-VSKVV			ACCasa plastídica de arroz (sin líder/ctp)
MEGSYQMNGILNGMSNSRHPSPSEVD			Citosólica de arroz (Genbank AAM18728)
MEGSYQMNGILNGMSNSRHPSPSEVD			Citosólica de arroz
MVESDQING---RMS-----VD			Citosólica de trigo
mvesdqing---rmss-----vd			Citosólica de trigo (Genbank AAA19970)
mvesdqingtprnmss-----vd			Citosólica de trigo (Genbank 2208491A)
↑	↑	↑	
(SEQ ID NO: 22-28, respectivamente en orden de aparición)			

Estos son ejemplos de opciones preferidas para constructos que utilizan una posición Met nativa como el iniciador. En otras realizaciones, se puede usar una región N-terminal que contiene un péptido líder de la ACCasa vegetal incluido aguas arriba desde el inicio del segmento de la ACCasa citoplásmica, es decir, agregado más arriba de la posición en la que se produce la Met-1 nativa de la ACCasa citoplásmica, y la Met-1 nativa del péptido líder agregado puede servir como un iniciador Met de tipo nativo.

En algunas realizaciones, se puede usar un constructo que codifica un sitio Met sintético para iniciar la ACCasa quimérica. El sitio Met sintético podría ubicarse en cualquier lugar aguas arriba del comienzo de la Región 1 de la ACCasa, por ejemplo, hasta aproximadamente 100 o 150 aminoácidos aguas arriba de la misma, aunque preferentemente de aproximadamente 10 o 15 a aproximadamente 50 o 60 residuos de aminoácidos aguas arriba de la Región 1.

La presencia de una secuencia peptídica aguas arriba desde dicho sitio de inicio preferido es opcional, por ejemplo, péptidos líderes, ctp, etc., pero puede incluirse, siempre que no sea un retículo mitocondrial, plastídico, nuclear, endoplásmico, secreción u otro péptido de direccionamiento operativo en la célula huésped de levadura. Preferentemente, los péptidos líderes N-terminales, particularmente los péptidos dirigidos N-terminales, están ausentes de las ACCasas quiméricas de la invención.

Se puede usar una ACCasa citoplásmica de levadura como una fuente alternativa de una secuencia N-terminal para la ACCasa quimérica de la invención. Como en el caso de las ACCasas citoplásmicas de monocotiledóneas, cualquier sitio Met nativo o sintético aguas arriba de la Región 1 de la ACCasa de levadura se puede usar como Met iniciador nativo para el constructo. Preferentemente, se usa Met-1 nativo del polipéptido de levadura en una realización. Por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* ACC1 (Genbank AAA20073) incluye dos sitios Met nativos en su región N-terminal: Met-1 y Met-14, es decir, numerados según la secuencia de *S. cerevisiae*: MSEESLFESSPQKME (SEQ ID NO: 29) La numeración de estas posiciones con respecto al estándar *Am* ACCasa

puede variar, según la alineación elegida, según se alinee con H98(*Am*) y S111(*Am*), o A57(*Am*) y P70(*Am*), respectivamente. Sin embargo, en cualquier caso, estos dos residuos se encuentran adyacentes a I77(*Am*) y D90(*Am*) cuando la levadura citoplásmica y los dominios de enzima de ACCasa *Am* plastídica, es decir, las Regiones 1-8, están alineadas de manera óptima sin alinear también computacionalmente sus secuencias peptídicas aguas arriba. Consulte las alineaciones ejemplares a continuación, con la numeración según el estándar *Am* anterior y la numeración de *S. cerevisiae* a continuación.

5

10

15

```

      60      70      80      90      100      110
      |      |      |      |      |      |
AGIIDLPKEGASAPDVIDISHIDLPKEGASAPDVIDISHGSEDHKASYQMNGILNESH   AmACC2

MSEESLFESSPQKME      MSEESLFESSPQKME      MSEESLFESSPQKME      ScACC1 1-15
Alineación 1      Adyacencia 2      Alineación 3
|      |      |      |      |      |
1      15      1      15      1      15
(SEQ ID NO: 30, 29, 29 y 29, respectivamente en orden de aparición)
    
```

20

25

Las ACCasas citoplásmicas y plastídicas de monocotiledónea, y las ACCasas citoplásmicas de la levadura, aunque todas son enzimas monocatenarias (multifuncionales), no corresponden necesariamente entre sí o con ACCasa *Am* en cada posición ocupada por un aminoácido. Su alineación muestra la presencia de algunos huecos, inserciones, etc. Además de estas diferencias, no existe en las formas citoplásmicas un péptido líder N-terminal que contiene ctp que está presente en formas plastídicas. Sin embargo, comúnmente estas formas multifuncionales de monocotiledóneas y levaduras tienen una longitud de aproximadamente 2000-2500 aminoácidos, usualmente de aproximadamente 2200-2400 aminoácidos, y todas comparten el mismo patrón estructural de 8 regiones.

30

La siguiente tabla presenta ejemplos útiles de fuentes de ACCasa multifuncionales citosólicas y otras (por ejemplo, retículo endoplásmico) para regiones N-terminales en alguna ACCasa quimérica de la invención. La tabla también muestra los sitios clave de inicio y fin en las ACCasas sensibles a herbicidas nativas que corresponden a las del estándar *Am*.

35

40

45

50

55

Tipo de Fuente	Organismo fuente	Acceso de Genbank	Longitud (aa)	Reg.1 Inicio	Reg.7 Inicio	Reg.7 Fin	Reg.8 Fin	Reg.8 Fin
Monocot	<i>Oryza sativa</i>	AAM18728	2267	39	745	1495	1599	2152
	<i>Sorghum bicolor</i>	EES16080	2248	39	728	1476	1580	2133
	<i>Triticum aestivum</i>	AAC49275	2260	30	736	1483	1587	2145
Dicot	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAC41645	2254	37	744	1485	1587	2139
	<i>Glycine max</i>	AAA75528	2261	39	746	1491	1593	2145
	<i>Medicago sativa</i>	AAB42144	2257	39	746	1487	1589	2141
Yeast	<i>Candida tropicalis</i>	EER36267	2274	103	822	1522	1615	2172
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	CAG98063	2231	60	769	1477	1572	2128
	<i>Neurospora crassa</i>	EAA33781	2275	52	760	1500	1602	2153
	<i>Pichia pastoris</i>	CAY68084	2215	44	735	1457	1552	2110
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AAA20073	2237	59	768	1479	1574	2134
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	BAA11238	2279	69	777	1516	1614	2169
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	CAG82031	2266	67	776	1516	1610	2164
Animal	<i>Bos Taurus</i>	CAB56826	2346	118	819	1569	1669	2223
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	EDS45294	2311	93	789	1531	1631	2185
	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAF59156	2323	101	797	1541	1641	2196
	<i>Gallus gallus</i>	AAA48701	2324	118	819	1546	1646	2200
	<i>Ovis aries</i>	CAA56352	2346	118	819	1569	1669	2223

60

65

Estas secuencias se usan preferentemente sin ningún segmento peptídico de señal N-terminal del mismo, si hay alguno presente en la secuencia nativa. Las secuencias N-terminales en general son opcionales en una ACCasa quimérica de la invención, pero usualmente pueden estar presentes aproximadamente 10-50 aminoácidos de la secuencia N-terminal en una ACCasa quimérica de la invención. En aquellas realizaciones en las que se usa una secuencia N-terminal, es decir, aguas arriba de la Región 1, preferentemente carece de cualquier péptido de señal operable en la célula huésped del sistema de levadura.

Cuando se usa una ACCasa de levadura como fuente de secuencia para la región N-terminal de una ACCasa quimérica de la invención, se seleccionará preferentemente de una especie de levadura diferente de la especie de la célula huésped de levadura en la que está para ser utilizada. En diversas realizaciones, las ACCasas citoplásmicas monocotiledóneas son fuentes más preferidas de secuencia N-terminal para los constructos.

5

Regiones C-terminales de ACCasas quiméricas

Debido a que las ACCasas "citoplásmicas" y plastídicas utilizadas como fuentes de secuencia para las ACCasas quiméricas de la invención son homólogas, la determinación del residuo de aminoácido del extremo N (punto de inicio) de una porción de ACCasa plastídica, es decir, la región C-terminal, para usar en un constructo, generalmente determina el residuo de aminoácido inmediatamente aguas arriba como el extremo C de una región N-terminal, aunque el criterio del experto en la técnica se puede usar para variar la selección del punto de empalme real.

En algunas realizaciones, la presente invención abarca una ACCasa quimérica con una región C-terminal derivada de una ACCasa plastídica de monocotiledónea que es sensible a al menos un herbicida. Usualmente, la región C-terminal confiere sensibilidad a los herbicidas a la ACCasa quimérica. En una realización específica, la región C-terminal se puede derivar del gen de ACCasa plastídica de arroz.

En la siguiente tabla, se identifican varias ACCasas plastídicas monocotiledóneas adecuadas que pueden servir como fuente para la región C-terminal de las ACCasas quiméricas de la invención. Las secuencias de estas ACCasas son homólogas entre sí y son representativas de las ACCasas multifuncionales (de cadena simple). La tabla también muestra los sitios clave de inicio y fin en las ACCasas nativas sensibles a los herbicidas que corresponden a los estándares *Am* que figuran en la primera fila.

25

Organismo fuente	Acceso de Genbank	Longitud (aa)	Reg.1 Inicio	Reg.7 Inicio	Reg.7 Fin	Reg.8 Inicio	Reg.8 Fin	'HSR' Desde	'HSR' Hacia
<i>Alopecurus myosuroides</i>	CAC84161	2320	135	842	1556	1654	2204	1781	2098
<i>Oryza sativa</i>	EAY97401	2327	135	842	1561	1665	2216	1792	2109
<i>Echinochloa crus-galli</i>	ADR32358	2316	132	839	1549	1648	2201	1775	2092
<i>Setaria italica</i>	AAO62902	2321	132	839	1549	1653	2206	1780	2097
<i>Sorghum bicolor</i>	EES10506	2326	132	839	1554	1658	2211	1785	2102
<i>Zea mays</i>	AAP78896	2324	132	839	1552	1656	2219	1783	2100

La HSR ("Región de Sensibilidad a Herbicidas") en las ACCasas anteriores es el segmento correspondiente al que abarca el conjunto de todas las mutaciones de tolerancia al herbicida ACCasa conocidas hasta la fecha, que comprende la secuencia desde y hasta las posiciones indicadas anteriormente en las dos últimas columnas. Tenga en cuenta que la HSR completa puede incluir una cantidad de secuencia más arriba y/o más abajo de la secuencia indicada anteriormente de la HSR, por ejemplo, de aproximadamente 10, 20 o 30 residuos aguas arriba y/o hasta aproximadamente 10, 20, o 30 residuos aguas abajo de la secuencia indicada, o de aproximadamente 1750(*Am*), 1760(*Am*), 1770(*Am*) o 1780(*Am*) a aproximadamente 2100(*Am*), 2110(*Am*), 2120(*Am*) o 2130(*Am*).

Debido a que la HSR ahora ha sido definida como una porción finita de la Región 8 de tales ACCasas multifuncionales, ahora esto también hace que sean posibles realizaciones del sistema de levadura que emplean una ACCasa quimérica que comprende tres regiones, una región N-terminal derivada de una ACCasa citoplásmica, una región que contiene HSR derivada de una ACCasa plastídica de monocotiledónea y una región adicional 3' a la HSR derivada de una ACCasa citoplásmica. Por lo tanto, se puede usar el segmento HSR descrito anteriormente, o el segmento más grande de la Región 8 o la totalidad de la Región 8.

En otras realizaciones, la región C-terminal comprende aproximadamente del 50% a aproximadamente el 60% de la longitud total de la ACCasa quimérica. En realizaciones específicas, la región C-terminal comprende aproximadamente el 50%, aproximadamente el 51%, aproximadamente el 52%, aproximadamente el 53%, aproximadamente el 54%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 56%, aproximadamente el 57%, aproximadamente el 58%, aproximadamente el 59%, o aproximadamente el 60% de la longitud total de la ACCasa quimérica.

60

En el presente trabajo, se ha encontrado que la HSR de ACCasa de monocotiledónea nativa incluye el segmento ACCasa desde 1781(*Am*) hasta 2098(*Am*). En algunas realizaciones, se puede usar una porción más grande de la Región 8 de una ACCasa de monocotiledónea sensible a herbicida, por ejemplo, una región que comienza en aproximadamente 1750(*Am*), 1760(*Am*), 1770(*Am*) o 1780(*Am*), y se extiende a aproximadamente 2100(*Am*),

65

2110(Am), 2120(Am), o 2130(Am). En algunas realizaciones, tal porción posterior de una Región 8 de ACCasa plástica de monocotiledónea susceptible a herbicidas puede comprender: la totalidad de la secuencia de ACCasa monocotiledónea susceptible a herbicidas correspondiente al segmento de aproximadamente 1750(Am) a aproximadamente 2130(Am); o una secuencia completa de la Región 8 de la ACCasa plástica, de monocotiledónea y susceptible a herbicidas, es decir, la secuencia correspondiente al segmento de aproximadamente 1654(Am) a 2204(Am).

Las posiciones de residuos sensibles a herbicidas incluyen las siguientes, enumeradas con restos de aminoácidos sensibles a herbicidas de tipo nativo a modo de ejemplo: I1781(Am), A1785(Am), A1786(Am), I1811(Am), Q1824(Am), V1864(Am), W1999(Am), W2027(Am), E2039(Am), I2041(Am), V2049(Am), A2059(Am), W2074(Am), V2075(Am), D2078(Am), S2079(Am), K2080(Am), I2081(Am), C2088(Am), K2095(Am), G2096(Am) y V2098(Am). En algunas realizaciones, una o más de estas posiciones pueden mutarse a un residuo tolerante a herbicidas y la HSR resultante se incluye en una ACCasa quimérica de la invención. Una ACCasa quimérica de este tipo se puede usar para generar mutaciones adicionales en la ACCasa quimérica que pueden permitir una mayor tolerancia a los herbicidas que la tolerancia exhibida por la ACCasa quimérica que tiene solo una única mutación de tolerancia a los herbicidas.

La siguiente tabla proporciona algunos ejemplos de mutaciones y características de tolerancia a herbicidas esperadas de y ACCasa que tiene la mutación indicada:

Mutación	Tolerancia a Cicloxidim	Tolerancia a Tepraloxidim	Tolerancia a Haloxifop
I1781L	Alta	Baja	Alta
I1781T	Media	Ninguna	Baja
I1781V	Media	Baja	Media
G1783C	Baja	Ninguna	Baja
A1785G	Baja	Ninguna	Baja
A1786P	Baja	Ninguna	Media
I1811N	Baja	Ninguna	Ninguna
A1837V*	Más alta	Más alta	Más alta
V1864F*	Más baja	Más alta	Ninguna
W1999C*	Más alta	Más alta	Más alta
W1999G	Alta	Media	Muy alta
I2041V*	Más alta	Más alta	Más alta
V2049C*	Más alta	Más alta	Ninguna
V2049F	Baja	Media	Ninguna
V2049I*	Idéntica	Más alta	Idéntica
V2049T*	Más baja	Más alta	Ninguna
W2074L	Baja	Ninguna	Ninguna
V2075G	Baja	Ninguna	Media
V2075I	Ninguna	Baja	Ninguna
V2075L	Baja	Alta	Baja
V2075M	Ninguna	Muy alta	Media
2xV2075*	Idéntica	Más alta	Idéntica
D2078G	Alta	Alta	Alta
D2078T	Alta	Alta	Alta
K2080E*	Ninguna	Más alta	Más alta
ΔK2080ΔI2081	Ninguna	Baja	Baja
C2088G*	Más baja	Más alta	Más alta
C2088H*	Más alta	Más alta	Más alta
C2088K*	Más alta	Idéntica	Idéntica
C2088L*	Más alta	Más alta	Más alta

Mutación	Tolerancia a Cicloxidim	Tolerancia a Tepraloxidim	Tolerancia a Haloxifop
C2088R	Alta	Media	Muy alta
C2088T	Más baja	Más alta	Ninguna
C2088V*	Más baja	Más alta	Más alta
C2088W	Baja	Ninguna	Ninguna
K2095E*	Ninguna	Más alta	Idéntica
G2096A	Alta	Media	Alta
G2096S	Media	Baja	Media
V2098A	Alta	Alta	Media
V2098C*	Más baja	Más alta	Ninguna
V2098G	Alta	Alta	Baja
V2098H	Media	Media	Baja
V2098P	Media	Alta	Media
V2098S	Media	Alta	Baja

*-indica los identificados en mutantes dobles

Fuentes de levadura/hongos de ACCasa citoplásmica

En una realización, la presente invención abarca ACCasas citoplásmicas o porciones de las mismas de levadura u hongos. Los miembros del grupo de levadura/hongos incluyen, pero no se limitan a, miembros de género *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Ascomycetes Neurospora*, *Kluyveromyces*, *Picha*, *Cryptococcus*, *Chrysosporium*, *Yarrowia*, *Arxula* y *Hansenula*.

En otras realizaciones, la invención abarca ACCasas quiméricas que tienen al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, en al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos particular para una ACCasa citoplásmica de levadura u hongos al que se hace referencia en la presente memoria.

Fuentes de monocotiledónea de ACCasa

En algunas realizaciones, la invención abarca ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas o porciones de las mismas de la familia de plantas monocotiledóneas.

En otra realización, la presente invención abarca las ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas de la subfamilia de *Ehrhartoideae*. Los ejemplos de la subfamilia *Ehrhartoideae* incluyen, entre otros, los de los géneros *Erharta*, *Leersia*, *Microlaena*, *Oryza* y *Zizania*.

En otra realización adicional, la presente invención abarca ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas de plantas de arroz o porciones de las mismas. Las dos especies de arroz más cultivadas son *Oryza sativa* y *Oryza glaberrima*. Numerosas subespecies de *Oryza sativa* son comercialmente importantes, incluidas, entre otras, *Oryza sativa* subespecie *indica*, *Oryza sativa* subespecie *japonica*, *Oryza sativa* subespecie *javanica*, *oryza sativa* subespecie *glutinosa* (arroz glutinoso), *Oryza sativa* del grupo Aromática (basmati) y *Oryza sativa* del grupo de arroz Flotante.

En una realización, la presente invención abarca ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas de la familia de las gramíneas *Poaceae* o porciones de las mismas. La familia *Poaceae* puede dividirse en dos grandes subtipos, el subtipo que contiene las subfamilias *Bambusoideae*, *Ehrhartoideae* y *Pooideae* (el subtipo BEP) y el subtipo que contiene las subfamilias *Panicoideae*, *Arundinoideae*, *Chloridoideae*, *Centothecoideae*, *Micrairoideae*, *Aristidoideae* y *Danthonioideae* (el subtipo PACCMAD).

En otra realización, la presente invención abarca las ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas de las monocotiledóneas comercialmente importantes o porciones de las mismas, que incluyen, pero no se limitan a, caña de azúcar (*Saccharum spp.*), así como a céspedes, por ejemplo, *Poa pratensis* ((Bluegrass), *Agrostis spp.* (Bentgrass), *Lolium spp.* (Ryegrasses), *Festuca spp.* (Fescues), *Zoysia spp.* (Zoysia grass), *Cynodon spp.* (Bermudagrass), *Stenotaphrum secundatum* (St. Augustine grass), *Paspalum spp.* (Bahagrass), *Eremochloa ophiuroides* (Centipedegrass), *Axonopus spp.* (Carpetgrass), *Bouteloua dactyloides* (Buffalograss) y *Bouteloua var. spp.* (Grama grass).

En otra realización, la presente invención abarca las ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas de la subfamilia

Bambusoideae o partes de las mismas. Los ejemplos de la subfamilia *Bambusoideae* incluyen, entre otros, los de los géneros *Arundinaria*, *Bambusa*, *Chusquea*, *Guadua* y *Shibataea*.

5 En otra realización, la presente invención abarca ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas de la subfamilia de *Pooideae* o porciones de las mismas. Los ejemplos de la subfamilia *Ehrhartoideae* incluyen, entre otros, los de los géneros *Triticeae*, *Aveneae* y *Poeae*.

10 En otra realización adicional, la presente invención abarca las ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas de plantas de trigo o porciones de las mismas. Las dos especies de trigo se cultivan con mayor frecuencia, *Triticum aestivum* y *Triticum turgidum*. Muchas otras especies son comercialmente importantes, incluyendo, entre otras, *Triticum timopheevii*, *Triticum monococcum*, *Triticum zhukovskyi* y *Triticum urartu* y sus híbridos. Ejemplos de subespecies de *T. aestivum* incluidas en la presente invención son *aestivum* (trigo común), *compactum* (trigo blando), *macha* (trigo macha), *vavilovi* (trigo vavilovi), *spelta* y *sphaerococcum* (trigo triturado). Ejemplos de subespecies de *T. turgidum* incluidas en la presente invención son *turgidum*, *carthlicum*, *dicoccon*, *durum*, *paleocolchicuna*, *polonicum*, *turanicum* y *dicoccoides*. Ejemplos de subespecies de *T. monococcum* incluidas en la presente invención son *monococcum* (*einkorn*) y *aegilopoides*.

20 En otra realización, la presente invención abarca ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas de plantas de cebada o porciones de las mismas. Las dos especies de cebada se cultivan con mayor frecuencia, *Hordeum vulgare* y *Hordeum arizonicum*. Numerosas otras especies son comercialmente importantes, incluyendo, pero no limitadas, *Hordeu bogdanii*, *Hordeum brachyantherum*, *Hordeum brevisubulatum*, *Hordeum bulbosum*, *Hordeum comosum*, *Hordeum depressum*, *Hordeum intercedens*, *Hordeum jubatum*, *Hordeum marinum*, *Hordeum marinum*, *Hordeum parodii*, *Hordeum pusillum*, *Hordeum secalinum* y *Hordeum spontaneum*.

25 En otra realización, la presente invención abarca ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas de plantas de centeno o porciones de las mismas. Las dos especies de centeno son las más frecuentemente cultivadas, *Lolium canariense* y *Lolium edwardi*. Muchas otras especies son comercialmente importantes, incluyendo, entre otras, *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Lolium persicum*, *Lolium remotum*, *Lolium rigidum* y *Lolium temulentum*.

30 En otra realización, la presente invención abarca las ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas de céspedes o porciones de las mismas. Un césped, como se usa en la presente memoria, es una monocotiledónea, preferentemente un miembro de las *Poaceae*, que exhibe un hábito de crecimiento como cobertura del suelo; dicho hábito de crecimiento es en muchos casos el resultado de un patrón de propagación o propagación estolonífera de la planta. Entre los ejemplos de géneros a los que pertenecen especies y variedades de césped, se incluyen:
35 *Agropyron*, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Ammophila*, *Andropogon*, *Arrhenatherum*, *Axonopus*, *Bouteloua*, *Bromus*, *Buchloe*, *Calamovilfa*, *Cenchrus*, *Chloris*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Ehrharta*, *Elymus*, *Eragrostis*, *Eremochloa*, *Festuca*, *Hilaria*, *Lolium*, *Muhlenbergia*, *Oryzopsis*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Setaria*, *Sorghastrum*, *Sorghum*, *Sporobolus*, *Stenotaphrum*, *Stipa*, *Trichachne*, *Tripsacum* y *Zoysia*.
40 Numerosas especies comercialmente importantes de césped de césped incluyen *Zoysia japonica*, *Agrostris palustris*, *Poa pratensis*, *Poa annua*, *Digitaria sanguinalis*, *Cyperus rotundus*, *Kyllinga brevifolia*, *Cyperus amuricus*, *Erigeron canadensis*, *Hydrocotyle sibthorpioides*, *Kummerowia striata*, *Euphorbia humifusa* y *Viola arvensis*.

45 En otras realizaciones adicionales, la invención abarca ACCasas citoplásmicas y/o plastídicas de plantas monocotiledóneas seleccionadas de *Zea* (por ejemplo, *Zea mays*), sorgo (por ejemplo, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), mijo (por ejemplo, mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo proso (*Panicum miliaceum*), mijo cola de zorra (*Setaria italica*), mijo dedo (*Eleusine coracana*), piña (*Ananas comosus*) y especies de bananos (*Musa spp.*) o porciones de las mismas.

50 En otras realizaciones, la invención abarca ACCasas quiméricas que tienen al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos particular para una ACCasa plastídica y/o citoplásmica de monocotiledónea a la que se hace referencia en la presente memoria.

55 En una realización específica, la invención abarca una ACCasa quimérica que comprende una región N-terminal derivada de una ACCasa citoplásmica de *Oryza sativa*.

En una realización específica, la invención abarca una ACCasa quimérica que comprende una región C-terminal derivada de una ACCasa plastídica de *Oryza sativa*.

60 **Procedimientos de selección/crecimiento/aislamiento de células de levadura que comprenden una ACCasa quimérica**

65 Los procedimientos para cultivar células de levadura son bien conocidos en la técnica. Sin embargo, en algunas realizaciones, la invención abarca el cultivo de células de levadura deficientes en la levadura *ACC1* mientras que tiene una ACCasa quimérica como se describe en la presente memoria en un esfuerzo por inducir, seleccionar,

crecer y/o aislar las ACCasas mutantes que comprenden mutaciones que confieren tolerancia a los herbicidas a las células de levadura.

5 En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención abarcan el cultivo de células de levadura en presencia de al menos un herbicida en líquido o en medio sólido. En otras realizaciones, las células de levadura se cultivan en medios ricos antes de exponerse a al menos un herbicida. En algunas realizaciones, los medios ricos pueden complementarse con ácidos grasos (incluidos, entre otros, ácido palmítico o ácido estérico) o biotina, solos o en combinación. En algunas realizaciones, las células de levadura se cultivan en medios que contienen una concentración creciente de herbicida a lo largo del tiempo. En realizaciones adicionales, las células de levadura se exponen a un aumento gradual de la concentración de herbicida a lo largo del tiempo.

15 En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención abarcan el cultivo de células de levadura deficientes en la levadura *ACC1*, mientras que tienen una ACCasa quimérica en presencia de al menos un herbicida. En tales realizaciones, los herbicidas incluyen, pero no se limitan a, un herbicida ariloxifenoxipropionato (FOP) o ciclohexanodiona (DIM). En algunas realizaciones, los herbicidas FOP incluyen, entre otros, cihalofop, quizalofop, diclofop, clodinafop, fluazifop, metamifop, propaquizafop y fenoxiprop. En otras realizaciones, los herbicidas DIM incluyen, pero no se limitan a, aloxidim, butoxidim, cletodim, cicloxidim, tepraloxidim, setoxidim, tralkoxidim y profoxidim. En otras realizaciones adicionales, el herbicida incluye, pero no se limita a, cualquier herbicida enumerado en la Tabla 1 de la presente memoria.

20 En algunas realizaciones, las células de levadura se exponen a al menos un herbicida presente en una concentración de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 200 μM . En otras realizaciones, las células de levadura están expuestas a al menos un herbicida presente a una concentración de aproximadamente 0,02 μM , aproximadamente 0,05 μM , aproximadamente 0,1 μM , aproximadamente 0,5 μM , aproximadamente 1 μM , aproximadamente 5 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 40 μM , aproximadamente 100 μM , o aproximadamente 200 μM . En realizaciones específicas, las células de levadura se exponen a cicloxidim a una concentración de aproximadamente 1 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 40 μM , aproximadamente 100 μM o aproximadamente 200 μM . En otra realización específica, las células de levadura se exponen a tepraloxidim a una concentración de aproximadamente 1 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 40 μM , aproximadamente 100 μM o aproximadamente 200 μM .

35 En algunas realizaciones, las células de levadura están expuestas a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más herbicidas en un evento de selección. En otras realizaciones, las células de levadura están expuestas a al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8 o más herbicidas en un evento de selección. Usualmente, un evento de selección representa una ronda de condiciones de selección en la que se analiza una colección de células, en este caso, la tolerancia a herbicidas. En otras realizaciones que comprenden al menos 2 o más herbicidas, dichos herbicidas pueden estar presentes en una concentración que no es inhibitoria de la ACCasa quimérica cuando se usan en aislamiento de otros herbicidas. En otras realizaciones adicionales, pueden usarse 2 o más herbicidas de forma concurrente o secuencial.

40

Procedimientos de generación de ACCasas quiméricas mutantes.

45 En algunas realizaciones, la invención abarca ACCasas quiméricas mutantes tolerantes a al menos un herbicida que surgen debido a mutaciones (por ejemplo, espontáneas o inducidas) de la ACCasa quimérica presente y selección en presencia de al menos un herbicida. En una realización específica, las células de levadura se cultivan en medios ricos antes de la exposición al herbicida. En algunas realizaciones, la mutagénesis espontánea puede conducir a al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o más mutaciones que confieren tolerancia al herbicida. En algunas realizaciones, las mutaciones espontáneas individuales son suficientes para provocar la tolerancia al herbicida utilizado para la selección. En otras realizaciones, se requieren mutaciones en múltiples sitios para proporcionar tolerancia al herbicida probado. En otras realizaciones adicionales, la invención comprende usar una ACCasa con al menos una mutación conocida que confiere tolerancia a los herbicidas en un procedimiento para aislar o identificar mutaciones espontáneas adicionales que incrementan o aumentan la tolerancia a los herbicidas de la mutación conocida.

55 En una realización específica, la invención abarca tasas de mutación espontáneas de aproximadamente 1 mutación tolerante en cada 5×10^9 células.

60 En otras realizaciones, la invención abarca una etapa de mutagénesis para introducir mutaciones de la ACCasa quimérica que dará como resultado tolerancia a los herbicidas cuando la levadura que contiene la ACCasa quimérica mutada se cultiva en presencia del herbicida. En algunas realizaciones, la etapa de mutagénesis implica mutagénesis aleatoria del ácido nucleico que codifica la ACCasa quimérica.

65 En algunas realizaciones, la mutagénesis química se realiza mediante la incubación de la célula de levadura que comprende la ACCasa quimérica con un mutágeno análogo de base. Los mutágenos análogos de bases son sustancias químicas que son estructuralmente similares a las bases normales y, como tal, engañan al sistema de

replicación de ADN. Su propiedad esencial es que forman pares de bases con dos bases diferentes, por lo que hacen mutaciones debido a su falta de consistencia en el emparejamiento de bases. Para ser mutágenos, deben incorporarse al ADN y, por lo tanto, deben estar presentes durante la síntesis activa de ADN. Un ejemplo es la 5-bromo-desoxiuridina (5-BU), que puede existir en dos formas tautoméricas: usualmente existe en una forma ceto (imitación T) que se empareja con A, pero también puede existir en una forma enol (imitación C) que se empareja con G.

En otras realizaciones, la mutagénesis química se realiza mediante la incubación de la célula de levadura que comprende la ACCasa quimérica con un agente alquilante de base. Los agentes alquilantes de bases reaccionan directamente con ciertas bases y, por lo tanto, no requieren una síntesis activa de ADN para actuar, pero aún requieren una síntesis de ADN para estar "fijas". Se usan con mucha frecuencia porque son mutágenos poderosos en casi todos los sistemas biológicos. Los ejemplos de alquiladores incluyen etil metano sulfonato (EMS), metil metano sulfonato (MMS), dietilsulfato (DES) y nitrosoguanidina (NTG, NG, MNNG). Estos mutágenos tienden a preferir regiones ricas en G, que reaccionan para formar una variedad de residuos de G modificados, y el resultado es a menudo depuración. Algunos de estos residuos de G modificados tienen la propiedad de inducir una reparación propensa a errores, aunque también podría ser posible un emparejamiento incorrecto de la base alterada. Esta estimulación de la reparación propensa a errores permite que ocurran todo tipo de mutaciones como resultado de estos mutágenos, aunque las sustituciones de bases son, con mucho, las más frecuentes. También parece que las bases alquiladas pueden confundirse durante la replicación.

En otras realizaciones, la mutagénesis aleatoria se realiza con radiación UV. En tales procedimientos, las células de levadura que comprenden la ACCasa quimérica sensible a un herbicida se exponen a una fuente de UV durante un período de tiempo suficiente para desarrollar lesiones en el ADN. Se pueden encontrar protocolos adicionales relacionados con la mutagénesis inducida por UV en toda la técnica, incluyendo: Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. 1990. Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, que se incorpora por referencia en la presente para todos los fines.

En otras realizaciones, la invención abarca la mutagénesis dirigida hacia al menos uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones, la mutagénesis dirigida puede dirigirse a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más aminoácidos en un evento. En otras realizaciones, la mutagénesis dirigida puede ser aleatorizar la selección de una sustitución de aminoácidos para al menos uno o más aminoácidos presentes en la ACCasa. En otras realizaciones, la mutagénesis dirigida es una sustitución restrictiva de al menos un aminoácido presente en la ACCasa. En otras palabras, la mutagénesis dirigida puede desarrollarse para incluir aminoácidos particulares, o clases de aminoácidos, mientras se excluyen otros.

En una realización, la mutagénesis dirigida se realiza proporcionando una biblioteca de oligonucleótidos que se hibridan con el ácido nucleico que codifica la ACCasa quimérica, pero son mutagénicos para al menos una posición de aminoácido. La biblioteca aleatoria hibridará con el gen quimérico de la ACCasa y desencadenará la recombinación, incorporando así la aleatorización de al menos una posición de aminoácido en el gen quimérico de la ACCasa. En algunas realizaciones, la biblioteca aleatoria es una aleatorización completa para la inclusión de la base de nucleótidos en el codón. En otras realizaciones, la biblioteca aleatoria es una biblioteca de diversidad restringida en la que la inclusión de nucleótidos en el codón no es completamente aleatoria, por ejemplo, la restricción de la primera posición es la adenina con el resultado de codones que codifican todos los aminoácidos que comienzan con adenina. El gen de ACCasa quimérica mutagenizado resultante se puede expresar y seleccionar para tolerancia a herbicida como se describe en la presente memoria.

Otras mutaciones adecuadas que pueden codificarse en un oligonucleótido y usarse para construir un ACCasas para usar en la presente invención incluyen las de la siguiente tabla.

Aminoácido de tipo salvaje y posición	Mutaciones posibles
11781	L, V, T, A
G1783	c
A1785	G
A1786	P
I1811	N
Q1824	P
A1837	V
V1864	F
W1999	C, G
W2027	C, R
E2039	G
12041	N, V
V2049	F, I, L, C, T

Aminoácido de tipo salvaje y posición	Mutaciones posibles
A2059	V
W2074	L
V2075	M, L, I, GVV(doble valina)
D2078	K, G, T
S2079	F
K2080	E, deletado
I2081	deletado
C2088	R, W, F, G, H, K, S, T, L, V
K2095	E
G2096	A, S
V2098	A, G, P, H, S, C

En otras realizaciones, la invención abarca la ACCasa mutante y quimérica en la que al menos una o más de las siguientes sustituciones específicas no están presentes: 11781L, W2027C, I2041N, G2096A, D2078G y C2088R.

En una realización específica, la invención abarca una célula de levadura que no comprende ningún gen de ACCasa genómico activo, una secuencia de nucleótidos que codifica una ACCasa quimérica como se describe en la presente memoria, y al menos un oligonucleótido que es mutagénico para al menos una posición de aminoácido en la ACCasa quimérica.

En una realización específica, la invención abarca composiciones y procedimientos en los que una ACCasa quimérica se aleatoriza en el aminoácido correspondiente a la posición 1781(Am) de la ACCasa plástica de *Oryza sativa*. En otras realizaciones, la invención abarca composiciones y procedimientos en los que una ACCasa quimérica se aleatoriza en el aminoácido correspondiente a una posición seleccionada entre 1781(Am), 1999(Am), 2049(Am), 2075(Am), 2075(Am), 2078(Am), 2098(Am), 2027(Am), 2041(Am), 2096(Am) y 2088(Am) de la ACCasa plástica de *Oryza sativa* (que son las posiciones referidas a *Alopecurus myosuroides*).

Productos

En algunas realizaciones, la invención abarca ACCasas mutantes que son tolerantes al menos a un herbicida. Usualmente, las ACCasas mutantes se construyen proporcionando una levadura deficiente en ACCasa con una ACCasa quimérica. En general, la ACCasa quimérica que comprende al menos dos regiones, una región N-terminal y una región C-terminal. En algunas realizaciones, la región N-terminal se deriva de las ACCasas citoplásmicas de levaduras, hongos o monocotiledóneas, mientras que la región C-terminal se deriva de las ACCasas plásticas de monocotiledónea y comprende una HSR. Una vez que las células de levadura complementadas con el gen quimérico ACCasa se cultivan en presencia de herbicida, se pueden aislar las células tolerantes. Estas células tolerantes pueden estudiarse para identificar las mutaciones no presentes en la ACCasa quimérica antes del cultivo, lo que confiere tolerancia a al menos un herbicida. Una vez que se conocen las mutaciones que confieren tolerancia a la ACCasa quimérica, pueden introducirse en un gen de la ACCasa plástica de monocotiledónea de longitud completa.

Los procedimientos para introducir la mutación tolerante a herbicidas en un gen de ACCasa plástica de monocotiledónea de longitud completa incluyen técnicas generales de biología molecular conocidas en la técnica. En algunos casos, la mutación se puede escindir del gen quimérico de la ACCasa mediante endonucleasas de restricción y se puede "empalmar" en el gen de ACCasa plástica de monocotiledónea de longitud total. Alternativamente, la mutación se puede diseñar en el gen de longitud completa a través de PCR. Además, un oligo que codifica la mutación se puede generar y administrar a una célula huésped que contiene el gen de longitud completa y, a través de la recombinación homóloga, se puede incorporar la mutación.

Los genes de ACCasa plástica de monocotiledónea de longitud completa que contienen las mutaciones deseadas se pueden introducir en plantas y/o células vegetales usando cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Usualmente, el gen incluirá secuencias de nucleótidos que dirigen la expresión del gen en las células y orgánulos vegetales deseados. Tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líderes, secuencias de direccionamiento (por ejemplo, secuencias de direccionamiento de cloroplastos), secuencias de terminación y similares. Los genes pueden introducirse usando cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica, incluidos, entre otros, vectores plásmidos inductores de tumores (Ti), vectores de transformación de plantas, transformación de protoplastos mediada por PEG, electroporación, microinyecciones y biolística o bombardeo de microproyectiles. Las células vegetales que comprenden el gen de ACCasa mutado pueden regenerarse en plantas usando técnicas conocidas. Las plantas regeneradas comprenderán el gen de ACCasa mutado. Usualmente, el gen mutado hará que la planta sea resistente a los herbicidas. En algunas realizaciones, el gen de ACCasa que comprende una o más sustituciones se introducirá en el locus de tipo salvaje del gen de ACCasa.

Procedimientos para determinar la sensibilidad a los herbicidas

5 En algunas realizaciones de la invención, la invención de las ACCasas quiméricas comprende una HSR derivada de una ACCasa plástica de monocotiledónea, lo que hace que el herbicida ACCasa quimérica sea sensible. Para determinar si una ACCasa plástica de monocotiledónea es adecuada para su uso en la construcción de una ACCasa quimérica sensible a herbicida, la sensibilidad de la ACCasa plástica de monocotiledónea a la inhibición por un herbicida inhibidor de ACCasa se puede determinar usando cualquier procedimiento de ensayo conocido por los expertos en la técnica.

10 El ensayo puede ser, por ejemplo, ya sea (1) un ensayo de planta completa, por ejemplo, una escala de calificación de lesión visual, puntuada después del contacto con una tasa de 1x de un inhibidor de ACCasa seleccionado de entre los DIM, FOP y DEN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante; o (2) un ensayo basado en células (p. ej., basado en células vegetales o basado en células microbianas) en el que las células se exponen a concentraciones equivalentes del inhibidor de ACCasa a medida que se administran en las células vegetales en el ensayo basado en plantas, teniendo en cuenta el aumento en el suministro de ingrediente(s) herbicida(s) activo(s) a las células de un ensayo *in vitro* basado en células. Tanto en el ensayo de planta completa como en el basado en células, la ACCasa cuya susceptibilidad al herbicida se está determinando puede ser nativa de la planta o célula o puede ser exógena a la misma. El grado de lesión inducida por herbicida en el cultivo de la planta o célula/célula proporciona una indicación de si la ACCasa plástica de monocotiledónea en la misma debe considerarse "susceptible" al herbicida o no.

Ejemplo de ensayo de planta completa (PVHI)

25 Por ejemplo, en un ensayo de planta completa para determinar la susceptibilidad al herbicida, se puede usar una escala de calificación de lesión visual de 0 a 10, en el que 0 indica que no hay síntomas de lesión detectables visualmente, y 10 indica la muerte de la planta. El uso de una escala de este tipo para calificación, la "lesión" de la planta puede tener en cuenta los síntomas que incluyen, por ejemplo, clorosis u otra decoloración, necrosis, marchitamiento, atrofia y otras deformidades de la planta. En un ejemplo, una calificación a modo de ejemplo de lesión en plantas de 0 a 10, plantas calificadas de 0 a 3 = tolerantes, con 0 a 1 = altamente tolerantes; plantas calificadas de 4 a 10 = susceptibles, con 8 a 10 = altamente susceptibles.

35 En una realización a modo de ejemplo, se puede usar un pulverizador de herbicida calibrado para administrar un volumen de rociado de aproximadamente 100-500 L/ha (generalmente de aproximadamente 250 L/ha) y, después del tratamiento, la determinación de la lesión se puede hacer al menos una vez dentro de 4 semanas después del tratamiento. Un ejemplo de tal escala de calificación de lesión visual es la siguiente:

- 0 sin síntomas visibles
- 1 síntomas leves
- 2 síntomas menores
- 40 3 síntomas leves, con apariencia agronómicamente aceptable mantenida
- 4 síntomas evidentes, sin reducción de la biomasa.
- 5 síntomas obvios, con probable reducción de la biomasa.
- 6 síntomas sustanciales, con reducción definitiva de la biomasa.
- 7 25-50% del tejido vegetal exhibe necrosis.
- 45 8 50-75% del tejido vegetal exhibe necrosis.
- 9 > 75% del tejido vegetal exhibe necrosis
- 10 muertes totales de plantas

50 Un ensayo de este tipo se puede denominar en la presente memoria como un ensayo de Lesión Visual por Herbicidas en Plantas (PVHI).

EJEMPLO DE ENSAYO BASADO EN CELULAS (CBHI)

55 En el caso de un ensayo basado en células para determinar la susceptibilidad al herbicida, se puede usar una escala de calificación para el tratamiento posterior al herbicida que varía, por ejemplo, de 0 a 6, donde 0 indica que no hay síntomas y 6 indica la muerte de todas las células, en donde una calificación de 0-2 indica tolerante, con 0-1 siendo altamente tolerante; y 3-6 indica susceptible, siendo 5-6 altamente susceptible. Al calificar la "lesión" para las células, los síntomas que se deben observar incluyen, por ejemplo, una disminución temporal de la tasa de multiplicación celular, una disminución en la producción de metabolitos normales (por ejemplo, ácidos grasos, fosfolípidos), un aumento en la producción de metabolitos relacionados con el estrés (por ejemplo, ácido abscísico, etileno, GABA), disminución sostenida en la tasa de multiplicación celular, disminución en la población de cloroplastos de células de plantas, senescencia de células de plantas, localización de cloroplastos en la vacuola de células de plantas, deformación o ruptura de la membrana celular, filtración de células y lisis celular. En una realización a modo de ejemplo, la calificación se puede realizar al menos una vez dentro de los 10 días posteriores a la exposición al herbicida. En el caso de tal ensayo basado en células, la calificación visual se puede hacer solo

con el ojo, o con la ayuda de un microscopio, selección metabólica, tinte o agente de contraste, u otro equipo analítico o agente suplementario.

5 Un ensayo de este tipo puede denominarse en la presente memoria como un ensayo de lesión por herbicida basado en células (CBHI).

6. Ejemplos

10 La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y la invención no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a estos ejemplos, sino que debe considerarse que abarca cualquiera y todas las variaciones que se hacen evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria.

Ejemplo 1. Construcción de la línea celular de selección de ACCasa de levadura

15 Resumen: Para la invención aquí descrita, construimos un gen quimérico ACCasa (*Oryza sativa*) (OsJACCc60p40) correspondiente al 60% N-terminal del gen de ACCasa citoplásmica de arroz fusionado al 40% C-terminal del arroz. gen de ACCasa plastídica. Se introdujo un plásmido CEN de bajo número de copia con OsJACCc60p40 (donde c60 = 60% citoplásmica y p40 = 40% plastídica) se introdujo en el diploide heterocigoto YNR016C BY4743 (acc1::kanMX/ACC1), que estaba equipado con el indicador SGA para transposición de plásmidos y cromosomas (Tong et al., 2001). Después de la esporulación y la germinación en medio selectivo, se obtuvieron células haploides MATa que se basan únicamente en el arroz OsJACCc60p40 para la biosíntesis de ácidos grasos. Estas células se pueden usar para aislar mutaciones al distribuir en placas las células directamente en un medio que contiene herbicida. Estas células se hicieron competentes para la transformación basada en LiAc/PEG (Gietz et al., 1992) de mezclas de fragmentos de ADN que podrían crear genes de ACCasa quiméricas mutantes mediante recombinación homóloga. Demostramos que la mutagénesis dirigida y espontánea conduce a ACCasas quiméricas tolerantes a herbicidas.

Cepas de levadura y condiciones de crecimiento

30 El diploide heterocigoto YNR016C BY4743 (MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0 can1Δ::LEU2-MFApr-HIS3/CAN1 acc1::kanMX/ACC1 [Cromosoma: 14]) se ordenó de Open Biosystems (número de catálogo YSC4034-97040689, identificación de clon 25391). YNR016C BY4743 se cultivó en YPG (20 g/l de extracto de levadura, 40 g/l de bacto triptona, galactosa esterilizada con filtro al 2%, pH de 6,5) con 200 mg/l de G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 30°C y 200 rpm Las cepas haploides, que dependen de la ACCasa vegetal transmitida por el plásmido para la biosíntesis de ácidos grasos, se cultivaron en 1 g/l de ácido monosódico L-glutámico, 1,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio (BD, Franklin Lakes, NJ), 1,57 g/l de SC-Arg-His-Leu-Ura (Sunrise Science, San Diego, CA), 2% de galactosa, 200 mg/l de G418 y 50 mg/l de L-Canavanina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 30°C y 200 rpm. La cepa haploide de control que depende de la levadura ACC1 para la biosíntesis de ácidos grasos se cultivó en 1 g/l de ácido monosódico L-glutámico, 1,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 1,57 g/l de SC-Arg-His-Leu-Ura, 2% de galactosa, 50 mg/l de L-Canavanina y 0,02 g/l de Ura a 30°C y 200 rpm. Para el crecimiento en placas, todos los medios se complementaron con 20 g/l de Difco Agar Noble 214230. Para todos los medios, con la excepción de YP, el agar se sometió a autoclave por separado de las otras soluciones como lo sugieren Tong y Boone (2006). El cicloxidim se mantuvo como una solución madre 614 mM en nafta o una solución madre 100 mM disuelta en metanol. Tanto el haloxifop como el tepraloxidim se mantuvieron como soluciones 100 mM en DMSO.

Construcción de plásmidos

50 Un constructo de fusión del promotor GAL10, OsJACCc60p40 y el terminador ADH1 (Figura 1B y 2C) se sintetizaron por GENEART (Regensburg, Alemania). La secuencia de nucleótidos de OsJACCc60p40 se optimizó para la expresión en levadura con el software Leto 3.0 (Entelechon, Regensburg, Alemania). Los sitios de restricción para mutagénesis y subclonación se introdujeron en puntos clave (Figura 1B) y la homología con la levadura ACC1 se mantuvo al mínimo para evitar la conversión de genes. El constructo se entregó como plásmido purificado en el vector pMK (RTP3240, Figura 2A). El vector de expresión de levadura pRS416 (Mumberg et al., 1995) se modificó antes de la clonación del fragmento Sall-SpeI de 7468 pb de RTP3240 que contiene GAL10pr-OsJACCc60p40-tADH1. El sitio NotI y Acc65I en el sitio de clonación múltiple de pRS416 se eliminaron secuencialmente por digestión con las enzimas correspondientes, "reduciéndose" con ADN polimerasa T4 (Promega, Madison, WI) y re-ligación. El plásmido pRS416ΔNotIΔAcc65I adaptado se digirió con XhoI y SpeI y RTP4108 se construyó mediante ligación del fragmento Sall-SpeI de 7468 pb de RTP3240 (Figura 2B y 2C).

65 La secuencia codificante completa de la ACCasa plastídica del arroz también se sintetizó por GENEART y se administró como RTP3378 (Figura 3A). Esta secuencia de ACCasa (Figura 3B) se optimizó para la expresión en el arroz y la mayoría de los sitios de restricción presentes en RTP4108 se incluyeron en las posiciones

correspondientes para permitir el intercambio de subfragmentos. El triplete en la posición relativa 1781 en RTP3378 se sintetizó para codificar leucina en lugar del aminoácido de tipo salvaje isoleucina (11781L). Se intercambió un fragmento Acc65I-XhoI de 134 pb de RTP3378 con la mutación I1781L con el fragmento correspondiente en RTP4108 para producir el plásmido de control RLW001. Las etiquetas His C-terminal 10x (SEQ ID NO: 31) se agregaron a RLW001 y RTP4108 para los plásmidos RTP4106 y RTP4107, respectivamente, intercambiando los fragmentos BamHI-NotI en el extremo de codificación 3' con la secuencia sintética digerida con BamHI-NotI:

SEQ ID NO: 1

10 ggatccaactttgattgacttgaaggctaagttggaagttccaacaagaatggatctgctgatacgaagtctttgcaagaaaatttgaa
 gctagaactaagcaactgatgccattatacaccxaaattgctatcagattcgtgaattgcatgatacctctttgagaatggctgctaagg
 15 gtgtatcaagaaggttgtgattgggaagaatccagatcttctctacaagagattgagaaggagaattccgaagatgtttggctaag
 gaaattagagctgttctgtgaacaattctctcatcaaccagctattgaactgattaagaagtgtactctctctcatgctgcagaatg
 20 ggatgatgatgatgctttcgttggatggataaccagaaaactacaaggactacattcaatacctgaaagctcaaagagtgtctca
 atctttgtcctctttgtctgattcctctctgatctacaagctctaccacaaggttctctgtgttggataagatggacctctagaagag
 ctcaattggttgaagaaatcagaaaggtttgggtcatcatcatcatcatcatcatcattgataagcgccgc (RTP3889,

Codones His 10x (SEQ ID NO: 31) subrayados, Figura 4).

Transformación de plásmidos que albergan constructos del gen quimérico de la ACCasa.

La transformación se llevó a cabo con el kit Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Clontech, Mountain View, CA) como se describe en el manual de Clontech con 200 ng de plásmido. Las células se colocaron en placas con 20 g/l de Difco Agar Noble 214230, 1 g/l de ácido monosódico L-glutámico, 1,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 1,57 g/l de SC-Arg-His-Leu-Ura, 2% de galactosa, 200 mg/l de G418 y 0.02 g/l de His.

Esporulación y transposición de plásmidos y cromosomas

Las colonias individuales del diploide heterocigoto YNR016C BY4743 que albergaba un plásmido con ACCasa quimérica de arroz se cultivaron en 10 ml de 1 g/l de ácido L-glutámico monosódico, 1,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 1,57 g/l de SC-Arg-His-Leu-Ura, 2% de galactosa, 200 mg/l de G418 y 0.02 g/l de His a 30°C y 200 rpm hasta que la OD_{600nm} alcanzó los 0,400. Los cultivos celulares se transfirieron a tubos de 50 ml, se centrifugaron (700x g, 5 minutos) y se lavaron en 40 ml de H₂O. Se repitió la etapa de lavado y las células se resuspendieron en 2 ml de medio de esporulación (KAc al 1%, ZnAc al 0,005%, His 0,3 mM). Los tubos se agitaron horizontalmente a 25°C, 200 rpm durante 5 días. Las células se recogieron mediante centrifugación, se lavaron con 40 ml de H₂O y se resuspendieron en 10 ml de H₂O después de la etapa de centrifugación final. Se colocaron en placas 50 µl y 50 µl de diluciones 10x y 100x en 20 g/l de Difco Agar Noble 214230, 1 g/l de ácido L-glutámico monosódico, 1,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 1,57 g/l de SC-Arg-His-Leu-Ura, 2% de galactosa, 200 mg/l de G418 y 50 mg/l de L-Canavanina y se incubó a 30°C durante 5 días. Para obtener la cepa haploide de control que depende de la levadura ACC1 para la biosíntesis de ácidos grasos, se utilizó el mismo procedimiento con los siguientes cambios: el crecimiento inicial se llevó a cabo en YPG con 200 mg/ml de G418 y las placas para la selección de haploides no contenían G418, pero se suplementaron con 0.02 g/l de Ura.

Confirmación del genotipo

Las células de 1 ml de cultivo se lavaron dos veces con 1 ml de tampón TE. Después de la última etapa de centrifugación, se aspiró el exceso de líquido y las células se resuspendieron y se rompieron por congelación-descongelación. Posteriormente, las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos con agitación ocasional. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación durante 5 minutos y se utilizaron 2 µl de la muestra de ADN genómico desnaturalizado para confirmar el genotipo mediante amplificación por PCR con cebadores específicos de ACCasa quimérica de arroz (c60p40-5924FW: ttctcacgtcaagattccacc [SEQ ID NO:3] y c60p40-6421RV: tactcaccagttccatagag [SEQ ID NO:4]) y cebadores específicos de ACC1 (ACC1aFW: gttgtgacaccgttcacgttg [SEQ ID NO:5] y ACC1aRV: caccggagaccattccgttg [SEQ ID NO:6]; ACC1bFW: gtttggtccagaagtagcatc [SEQ ID NO:7] y ACC1bRV: tcatggtcgttctgatcttt [SEQ ID NO:8]). La PCR se realizó con el sistema Expand High Fidelity PCR (Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Mutagénesis con fragmentos de ADN que contienen nucleótidos degenerados

Las mezclas de fragmentos con nucleótidos degenerados en posiciones seleccionadas se ordenaron de Epoch Biolabs (Sugar Land, TX). Un fragmento designado como LN1-mut abarcó 1169 pb del extremo de codificación 3' de OsJACCc60p40 y tenía la siguiente composición:

SEQ ID NO: 2

tacctctgttattgctcacaagatgcaacttgattctgggaaattagatgggtcattgattccgttggtgtaagggaagatggttgggagtt
 gaaaatnnncatgggtctgctgcaattgcttctgcttactcgcagagcttacaaggaaacgttcactttgactttcgttactggtagaactgtt
 ggtattggtgcttacttggttagattgggtatcagatgcatccaagacttgatcagcctattatcttgactggttactctgctttgaataagtt
 gttgggtagagaagtttactcgtctcatatgcaattgggtggaccaaaagattatggcaacaaatggtgtgtacttactgactgtttctgatg
 acttggagggtgctctaatactcgtgagatgggtgtcttacgtccagcttacattgggtgctccttgccagttactactccattggaccacc
 tgatagaccagttgcttacatcctgaaaactcttgcgatccaagagctgcaattagaggtgtgtgactctcaaggtaagtggccttggt
 ggcatgttcgataaggattccttcgttgaactttcgaaggtgggtaagactgttactggtagagctaaactagagggtattccagt
 tgggttattgcagttgaaacgcaactatgatgcaactattccagctgaccaggtcaattggattctagagaacaaagtgttcttaga
 gctggcaagttnnnttcccagattctgctacaaagactgctcaagctttgttgacttcaatcgcgaaggtttgccattgttcatcttgcca
 aatnnnagaggtttcctccggagggtcaaagagattgttcgaaggtnnnttgaagctggttctactatcgtcgaaaactgagaacctac
 aatcaaccagctttcgtttacattcctatggctgctgaattgagaggtggcgcctgggtgttgnnttctaagattaaccggaccgtat
 cgaannntacgctgaacgtacgggtaagggtaatgttttgaaccacaannnttgattgaaatcaagttcagaagtgaagaattgcaa
 gattgcatgagtagattggatccaactttgattgactgaaggctaaagttggaagttgccaaca

En un estudio, únicamente se probó la degeneración en el triplete que corresponde a isoleucina en la posición relativa 1781 (los nucleótidos están subrayados). Una mezcla de fragmentos de 299 pb se amplificó con el sistema de PCR Expand High Fidelity usando LN1-mut como plantilla y c60p40-10451FW (tacctctgttattgctcaca [SEQ ID NO: 9]) y c60p40-10750RV (taaacttctccacaaca [SEQ ID NO: 10]) como cebadores.

En otros experimentos, cada triplete degenerado estaba flanqueado por ADN de OsJACCc60p40 de 150 pb para permitir la incorporación a través de recombinación homóloga, excepto el triplete correspondiente a 11781. La PCR se realizó con el sistema de PCR Expand High Fidelity usando cebadores que coinciden con los 21 nucleótidos externos de Fragmentos sintéticos de 303 pb. Para 11781, el triplete degenerado estaba flanqueado por 100 pb en el extremo de codificación 5' y 197 pb en el extremo de codificación 3' en el producto de PCR final.

Preferentemente, el triplete mutado está centrado en el fragmento sintético. En nuestros primeros experimentos con sustituciones para 11781, el primer conjunto de mezclas de fragmentos sintéticos que se ordenó contenía grandes fragmentos con múltiples mutaciones en múltiples posiciones. Este se usó como plantilla para los fragmentos 11781 en una reacción de PCR (excluyendo las otras mutaciones que estaban presentes). Posteriormente, se utilizaron fragmentos sintéticos, simétricos para cada posición.

Después de la PCR, los cebadores y los dNTP se eliminaron con el Gel SV Wizard® y el Sistema de Limpieza de PCR (Promega) y el producto de la PCR se verificó en gel. Se usaron aproximadamente 200 ng para la transformación. Cuando las mezclas de oligonucleótidos se están transformando, la escala del procedimiento de transformación se puede aumentar para garantizar que cada uno de los componentes de la mezcla se represente entre las colonias transformadas. Para las mezclas utilizamos 6 x 5 µg en paralelo usando el protocolo de escala de biblioteca Yeastmaker® (por herbicida). Cuando se introduce una única mutación (por ejemplo, 11781L) usando un fragmento único purificado, solo se requiere una colonia transformada en una placa. Por lo tanto, la escala puede ser mucho menor, por ejemplo, 200 ng y se puede usar el protocolo de transformación estándar.

Las células que dependen de RTP4108 para la biosíntesis de ácidos grasos (designadas RTP4108-8b-2) se cultivaron previamente en YPG G418 o YPG G418 suplementado con 1% de Tween, 0,015% de ácido palmítico, 0,015% de ácido esteárico y/o 0,4 mg/l biotina. Antes de la transformación, las células se lavaron 2x con H₂O para eliminar los ácidos grasos del medio. La transformación se realizó como se describe en el protocolo del kit

Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 con una etapa de recuperación de 1 ½ horas en YPG. Para cada fragmento de mezcla, se transformaron 6 transformaciones en medio con tepraloxidim y 6 en medio con cicloxidim. Por lo tanto, se inician simultáneamente 12 transformaciones en la escala de la biblioteca de Yeastmaker para cada mezcla de fragmentos y se tratan de la misma manera hasta que es hora de colocarlas en sus respectivas placas de herbicida. El ADN de control consistió en el mismo fragmento en el que nnn era ATT (que codifica isoleucina, creando así la secuencia original presente en RTP4108) y TTG (que codifica leucina, creando un control positivo para la transformación).

Aislamiento de ADN, PCR del extremo de codificación 3' y secuenciación de genes tolerantes a herbicidas candidatos

Las colonias individuales que crecían en placas con herbicida se transfirieron a placas nuevas y se seleccionaron una vez más en medio con el mismo herbicida para eliminar cualquier rastro de células no transformadas y no deseadas. Posteriormente, las células se cultivaron en 1 ml de medio líquido (1 g/l de ácido monosódico L-glutámico, 1,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 1,57 g/l de SC-Arg-His-Leu-Ura, 2% de galactosa, 200 mg/l de G418 y 50 mg/l de L-Canavanina) sin herbicida hasta que la OD_{600nm} alcanzó los 0,400. El ADN se aisló con Zymoprep™ II, kit de minipreparación de plásmidos de levadura (Zymo Research, Orange, CA). La PCR se realizó con el sistema de PCR Expand High Fidelity y los cebadores c60p40-9561FW (cgcttctctagaagatattgac [SEQ ID NO: 11]) y c60p40-12331RV (cgacctcatgctatacctgag [SEQ ID NO: 12]). La secuenciación de los productos de la PCR se realizó mediante DNA Landmarks. Para una secuenciación de alto rendimiento, los cultivos se cultivaron en 1 ml de medio en 96 bloques de pocillos profundos montados en el agitador durante 2 días. Se centrifugaron 0,4 ml de los cultivos de levadura totalmente crecidos y los sedimentos se resuspendieron en 30 µl de solución de cimoliasa (2,5 mg/ml de cimolasa ICN, 1,2 M de sorbitol, 0,1 M de fosfato de sodio, pH de 7,4). 10 µl de esa suspensión se dividieron en partes alícuotas en placas de 96 pocillos de fondo en forma de V y se congelaron en hielo seco antes de enviarse a DNA Landmarks. Un tramo de ADN que varía desde 227 pb aguas arriba desde el codón para 11781 hasta 194 pb aguas abajo desde el codón para V2098 se amplificó por PCR (los cebadores CTGGTGCAAGAATCGGTATT (SEQ ID NO: 32) y TGGGTGTATAATGGCATCAGT (SEQ ID NO: 33)) y se secuenció.

Producción de alto rendimiento de curvas de crecimiento en ausencia y presencia de herbicidas

Se cultivaron colonias individuales de mutantes y controles en 1 g/l de ácido monosódico L-glutámico, 1,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 1,57 g/l de SC-Arg-His-Leu-Ura, 2% de galactosa, 50 mg/l de L-Canavanina y 200 mg/l de G418 (cepas híbridas dependientes de ACCasa híbrida de arroz) o 0.02 g/l de Ura (cepa dependiente de ACC1) a 30°C y 200 rpm durante dos días. Los cultivos completamente desarrollados se centrifugaron y se resuspendieron en 300-800 µl de medio para producir cepas de partida con densidades aproximadamente comparables. Se transfirieron 5 µl de la cepa de partida por triplicado a 96 bloques de pocillos profundos con 1,5 ml del mismo medio o el mismo medio suplementado con herbicida. Se montaron bloques en el agitador y se tomaron muestras de 100 µl cada 24 horas para determinar la densidad óptica a 600 nm con el lector de placas Multiskan Ascent (ThermoLabs).

Resultados y discusión

Diseño de OsJACc60p40 y construcción de RTP4108

Las secuencias de los genes de ACCasa plastídica y citoplásmica de arroz (grupo *Oryza sativa Japonica*) (números de acceso EAZ33685 y AAM18728, respectivamente) se usaron para diseñar el gen de la ACCasa química sintética OsJACc60p40 (Figura 1B y 2C). La proteína codificada por OsJACc60p40 consiste en el primer 60% de la proteína ACCasa citoplásmica y el último 40% de la proteína ACCasa plastídica. La secuencia de la proteína de ACCasa plastídica que se envió al GenBank (EAZ33685) contenía errores de secuencia, que se corrigieron con la ayuda de ref [NC_008398.1]. Con estas correcciones, se encontró que la secuencia de aminoácidos era idéntica a la de la proteína de ACCasa plastídica del grupo indica (EAY97401). El constructo de fusión GAL10pr-OsJACc60p40-tADH1 se sintetizó y clonó en un vector lanzadera pRS416 modificado (Mumberg et al., 1995) para crear RTP4108. RTP4108 y todos los demás plásmidos que contienen el constructo de fusión GAL10pr-OsJACc60p40 o sus derivados son altamente tóxicos para *E. coli* y el crecimiento prolongado de cultivos bacterianos da lugar a reordenamientos bruscos dentro del plásmido. Por lo tanto, se cultivaron cultivos de *E. coli* idénticos en paralelo en cinco tubos de cultivo en presencia de glucosa hasta la fase logarítmica temprana, después de lo cual se verificaron las reordenaciones de las muestras. Todos los tubos de cultivo en los cuales los reordenamientos no fueron evidentes en el gel después de la digestión con HindIII se agruparon y se sometieron a aislamiento de plásmido. El mantenimiento de los plásmidos en *E. coli* se minimizó solo en esta etapa. Junto a RTP4108 (GAL10pr-OsJACc60p40), también construimos RTP4107 (GAL10pr-OsJACc60p40 + etiqueta His 10x C-terminal ("etiqueta His 10x descrita como SEQ ID NO: 31)), RLW001 (GAL10pr-OsJACc60p40 I1781L) y Rpc4 -OsJACc60p40 I1781L + etiqueta His 10x C-terminal ("etiqueta His 10x divulgada como SEQ ID NO: 31) (Figura 4).

Transformación del diploide heterocigoto YNR016C BY4743 (*acc1::kanMX/ACC1*), transposición aleatoria de plásmidos y cromosomas y complementación de la deficiencia de *ACC1* por OsJACCc60p40

Los mutantes de levadura en los que se delecta el gen *ACC1* endógeno no son viables. Utilizamos un procedimiento de mezcla aleatoria de plásmidos y cromosomas para reemplazar el gen *ACC1* con la ACCasa quimérica de arroz transmitida por plásmidos (Figura 5a-5e). Los plásmidos RTP4108, RTP4107, RLW001 y RTP4106 de bajo número de copias se transformaron en el diploide heterocigoto YNR016C BY4743 y las células se seleccionaron para la presencia del gen *URA3* en el plásmido (Figura 5b-5d). Por lo tanto, las células diploides contenían tanto el gen *ACC1* endógeno como una ACCasa quimérica de arroz. La transposición fue posible gracias a dos loci heterocigotos: (i) en uno de los cromosomas 14, el gen *ACC1* endógeno había sido reemplazado por el casete *kanMX*, que confiere resistencia a G418 y (ii) en uno de los cromosomas 5 el gen *CAN1* había sido reemplazado por el informante de SGA (*can1Δ::LEU2-MFA1pr-HIS3/CAN1*, Tong et al., 2001). La esporulación se indujo en células diploides que contenían ambos genes ACCasa. Después de la esporulación, las células se colocaron en placas en medio selectivo y se cultivaron a 23°C y 30°C (Figura 5d-5e). Las células haploides que heredaron el gen *ACC1* endógeno fueron eliminadas por G418. Todas las células diploides aún presentes en la mezcla de esporulación y todas las células haploides que poseían el gen *CAN1* fueron delectadas por L-Canavanina; un análogo de arginina tóxico que se importa a la célula por el producto del gen *CAN1*. El informante SGA consiste en el gen de selección *HIS3* auxotrófico bajo el control del promotor *MFA1* específico de MATa. La ausencia de histidina en el medio aseguró que solo las células haploides MATa pudieran sobrevivir. Las células haploides con RTP4108, RTP4107, RLW001 y RTP4106 se verificaron para detectar la presencia de ACCasa quimérica de arroz y la ausencia de *ACC1* con conjuntos de cebadores específicos para ambos genes. Se confirmó el genotipo de múltiples colonias independientes para cada una de estas células haploides (datos mostrados para RTP4108 en la Figura 6). Los cuatro plásmidos complementaron la inactivación *acc1* a 23°C y 30°C. El constructo ACCc60p40 de trigo utilizado por Nikolskaya et al. (1999) no pudo complementarse a 30°C, a pesar de que se expresó a partir de un plásmido de alto número de copias. El resultado obtenido aquí subrayó el diseño sólido de la secuencia de nucleótidos ACCasa quimérica del arroz y el sistema de expresión, aunque la diferencia observada en el crecimiento a 30°C también podría estar causada por diferencias específicas en la secuencia de aminoácidos entre las ACCasas quiméricas del arroz y el trigo. La esporulación también se indujo con células diploides que no contenían un plásmido para obtener una cepa haploide que dependía de *ACC1* (denominada levadura *ACC1*, Figura 6).

'Curvas de muerte' para cepas de levadura que contienen varias variantes de ACCasa con ciclohidim y tepraloxidim

Cepas modelo con RTP4108 (RTP4108-8b-2), RTP4107 (RTP4107-5b-1), RLW001 (también denominado RLW001-1a-1, o YIL-1a-1) y RTP4106 (RTP4106-7a) 1) y la levadura *ACC1* se colocaron en placas en diferentes concentraciones de haloxifop, ciclohidim y tepraloxidim (Figura 7) y se incubaron a 30°C durante 4 días. El crecimiento de las cepas con 11781 se vio severamente obstaculizado por el ciclohidim 100 μM y el tepraloxidim 1 μM. La mutación I1781L, que se sabe que confiere tolerancia en plantas, aumentó la tolerancia y se observó una reducción significativa en el crecimiento a 200 μM de ciclohidim y 10 μM de tepraloxidim. Esta prueba estableció que la levadura podría usarse como un organismo modelo para detectar el aumento de la tolerancia a ciclohidim y tepraloxid. Como se esperaba, la levadura *ACC1* fue tolerante a todas las concentraciones analizadas, aunque se observó una reducción leve pero reproducible en el crecimiento a 200 μM de ciclohidim. Las placas de control con volúmenes comparables de DMSO y metanol no mostraron ningún efecto sobre el crecimiento de ninguna de las cepas utilizadas aquí (datos no mostrados). Sus etiquetas no tuvieron un efecto perjudicial. Por lo tanto, la mutagénesis también se puede hacer comenzando con RTP4107-5b-1 o RTP4106-7a-1 (esta última para encontrar mutaciones dobles con I1781L) y la presencia de las etiquetas His podría ser beneficiosa para la posterior caracterización bioquímica. Los resultados mostrados en la Figura 7 fueron altamente reproducibles con 3-4 líneas haploides independientes que contenían los mismos plásmidos (datos no mostrados).

Mutagénesis con fragmentos que contienen degeneración en sitios preseleccionados

Se eligió RTP4108-8b-2 para un experimento de transformación piloto con un fragmento de 299 pb correspondiente a la secuencia de RTP4108 con TTG, que codifica I1781L, en el centro (Mu13). Un fragmento de control de 299 pb similar contenía el codón ATA original para isoleucina en esa posición (Wt10). Las células RTP4108-8b-2 se cultivaron inicialmente en ácido L-glutámico monosódico, base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, SC-Arg-His-Leu-Ura, galactosa al 2%, 200 mg/l de G418 y 50 mg/l-Canavanina, pero la eficiencia de transformación resultó ser poco práctica debido a la lenta tasa de crecimiento en este medio (datos no mostrados) y posiblemente a una composición de membrana alterada (Schneiter et al., 1996). La Tabla 2 muestra la eficiencia de transformación después del crecimiento en medio rico o en medio rico suplementado con FA y/o biotina, y en placa en medio con ciclohidim 100 μM. El crecimiento previo en YPG G418 + FA y la biotina dio lugar a 11 transformantes y este número se puede aumentar a 200-300 colonias cambiando del protocolo de transformación '200 ng' a la 'escala de biblioteca' (15 μg) descrita en el manual del kit Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 de Clontech (datos no mostrados). Se ha llevado a cabo la transformación con una mezcla de fragmentos de 299 pb que contiene todos los tripletes posibles en el sitio correspondiente a 11781.

Tabla de eficiencias de transformación después del pre-crecimiento en diferentes medios

Fragmento transformado	Pre-crecimiento	Distribución en placas en	# de colonias
Wt10	YPGal G418	100 µM cicloxidim	0
Wt10	YPGal G418 Biotin	100 µM cicloxidim	0
Wt10	YPGal G418 FA	100 µM cicloxidim	2
Wt10	YPGal G418 Biotin FA	100 µM cicloxidim	0
Mu13 (I1781L)	YPGal G418	100 µM cicloxidim	5
Mu13 (I1781L)	YPGal G418 Biotin	100 µM cicloxidim	7
Mu13 (I1781L)	YPGal G418 FA	100 µM cicloxidim	6
Mu13 (I1781L)	YPGal G418 Biotin FA	100 µM cicloxidim	11

15 Se realizó una serie de tales experimentos. En experimentos piloto, la eficiencia fue usualmente de solo 5-20 transformantes/µg de ADN (datos no mostrados). Las cepas haploides RTP4108-8b-2 y RTP4107-5b-1 (así como RLW001-1a-1 y RTP4106-7a-1) tienen un tiempo de duplicación de aproximadamente 4 ½ horas en medio líquido de biotina FA YPG G418. Se cree que la tasa de crecimiento lento y la composición de membrana posiblemente alterada (Schneiter et al., 1996) son las razones principales de las deficientes eficiencias de transformación. La eficiencia de transformación fue un 20% mayor cuando el crecimiento previo de las células tuvo lugar en el medio YPG suplementado con biotina y ácidos grasos y la recuperación tuvo lugar en el medio YPG en oposición al medio de recuperación de transformación estándar YPD plus de Clontech. A pesar de las mejoras, las tasas de transformación fueron bajas, lo que dificultó la detección eficiente de mezclas de fragmentos mutagenizados de alta complejidad.

25 **Mutantes espontáneos y análisis de secuencia**

30 La tabla de eficiencias de transformación anterior mostró que la transformación con Wt10 dio lugar al crecimiento de dos colonias cuando las células se cultivaron previamente en ácidos grasos YPG G418 +. En teoría, el fragmento amplificado por PCR Wt10 podría contener mutaciones no intencionales, introducidas por Epoch Biolabs durante la síntesis o por PCR con ADN polimerasa Expand, que podría incorporarse en OsJACCC60p40 mediante recombinación homóloga y dar lugar a colonias tolerantes a herbicidas. Sin embargo, se encontró que el recubrimiento directo de RTP4108-8b-2 en 200 µM de cicloxidim o 10 µM de tepaloxidim daba como resultado 1 mutante espontáneo por cada ~5x10⁹ células. Este fenómeno fue explotado completamente y RTP4108-8b-2 se distribuyó en placas en grandes cantidades en cicloxidim 200 µM y tepaloxidim 10 µM. De manera similar, RLW001-1a-1 se sembró en 40 µM de tepaloxidim y 100 µM de tepaloxidim para obtener mutantes dobles. Además, se analizaron todas las colonias que crecieron en placas de control en experimentos anteriores destinados a optimizar el proceso de transformación (datos no mostrados). Todas las colonias tolerantes a herbicidas se cultivaron en placas con cicloxidim 100 y 200 µM y tepaloxidim 1 y 10 µM y se estimó la tasa de crecimiento relativa. La siguiente tabla resume otras colonias de interés para las cuales se obtuvieron datos de secuencia.

45

50

55

60

65

Tabla de mutantes obtenidos en varias selecciones (columna izquierda) y tolerancia a C100 (100 μ M cicloxidim), C200 (200 μ M cicloxidim), T1 (1 μ M tepraloxidim) y T10 (10 μ M tepraloxidim)

Identificador	Células haploides de inicio	Aislado de la placa con	Crecimiento relativo en medio después de la transferencia					Sustitución
			Sin herb.	C100	C200	T1	T10	
RTP4108-8b-2 control	RTP4108-8b-2	Sin herbicida	++++	-	-	-	-	
RLW001-1a-1 control	RLW001-1a-1	Sin herbicida	++++	+++	++	++	+	I1781L
8	RTP4108-8b-2	100 μ M cicloxidim	++++	++	++	+++	+	W1999G
22	RTP4108-8b-2	100 μ M cicloxidim	++++	+++	++	-	-	I1781T
29	RTP4108-8b-2	1 μ M tepraloxidim	++++	+	-	++	+	V2049F
30	RTP4108-8b-2	1 μ M tepraloxidim	++++	+	-	+++	+	V2049F
32	RTP4108-8b-2	1 μ M tepraloxidim	++++	+	-	+++	+	V2049F
33	RTP4108-8b-2	1 μ M tepraloxidim	++++	+	+	+++	+	V2049F
18	RTP4108-8b-2	10 μ M tepraloxidim	++++	+	-	++++	+++	V2075L
24	RTP4108-8b-2	1 μ M tepraloxidim	++++	++	+	+++	+++	V2075L
25	RTP4108-8b-2	1 μ M tepraloxidim	++++	++	+	+++	+++	V2075L
26	RTP4108-8b-2	1 μ M tepraloxidim	++++	++	+	+++	+++	V2075L
27	RTP4108-8b-2	1 μ M tepraloxidim	++++	++	-	+++	+++	V2075L
57	RTP4108-8b-2	10 μ M tepraloxidim	++++	++	+	+++	+++	V2075L
58	RTP4108-8b-2	10 μ M tepraloxidim	++++	++	+	+++	+++	V2075L
34	RTP4108-8b-2	1 μ M tepraloxidim	++++	++	+	++	+	V2075I
31	RTP4108-8b-2	100 μ M cicloxidim	++++	+++	+++	+++	+++	D2078G
21	RTP4108-8b-2	10 μ M tepraloxidim	++++	+++	+++	+++	+++	V2098A
28	RTP4108-8b-2	200 μ M cicloxidim	++++	+++	++	+++	++	V2098A
78	RLW001-1a-1	40 μ M tepraloxidim	++++	++++	++++	++++	++++	I1781L + V2049F

El mutante 8 poseía una nueva mutación, W1999G, que daba tolerancia tanto a cicloxidim como a tepraloxidim. La mutación W1999C se ha asociado con la tolerancia al fenoxaprop, pero esta mutación no condujo a la tolerancia para el setoxidim y el tralkoxidim (Liu et al., 2007).

I1781T en el mutante 22 también representó una nueva mutación en una posición conocida. Curiosamente, esta mutación solo confiere tolerancia a los cicloxidim. V2049F condujo a una tolerancia moderada al tepraloxidim. Esta mutación única se encontró en cuatro colonias independientes (29, 30, 32 y 33) y las tasas de crecimiento en placas con diferentes herbicidas fueron altamente reproducibles.

De manera similar, la mutación V2075L, que condujo solo a una alta tolerancia a la tepraloxidim, se encontró varias veces y condujo a tasas de crecimiento consistentes como se muestra arriba. La mutación que confiere tolerancia a cicloxidim I1781T y la mutación que confiere tolerancia a tepraloxidim V2075L pueden usarse en rotación en el arroz.

La mutación V2075I fue menos favorable para la tolerancia DIM en comparación con V2075L.

El mutante 31 contenía una mutación conocida: D2078G. Se sabe que esta mutación está asociada con una penalización por condición física en el arroz. En levadura, la penalización por adecuación no se traduce en una tasa de crecimiento lenta (Liu et al., 2007 y este estudio). Sin embargo, reducir la actividad del promotor GAL10 al disminuir la concentración de galactosa en el medio puede revelar una actividad enzimática subóptima de la ACCasa con D2078G.

V2098A se identificó dos veces y condujo a una alta tolerancia tanto a cicloxidim como a tepraloxidim.

En un experimento, en el que RLW001-1a-1 se colocó sobre 40 μ M de tepraloxidim, se descubrió un doble mutante tolerante con I1781L. La segunda mutación resultó ser V2049F. El doble mutante se desempeñó mejor que cada uno de los dos mutantes individuales por separado en un medio con DIM.

El aislamiento de las ACCasas con la misma mutación en múltiples colonias independientes y la alta reproducibilidad de las características de crecimiento en placas con diferentes (concentraciones de) herbicidas respaldan el hecho de que estas mutaciones están involucradas en una mayor tolerancia.

Ejemplo 2

La sustitución de la levadura *ACC1* por *OsJACCc60p40* redujo drásticamente la eficiencia de transformación, pero permitió el aislamiento directo de mutantes espontáneos que son resistentes a los DIM

Las células RTP4107-5b-1 se pueden mutagenizar mediante la transformación de fragmentos con degeneración en sitios seleccionados y su posterior en placas en medio de ciclohidim o tepraloxidim (Figura 5e-5h). Para determinar la eficiencia de transformación, transformamos los fragmentos que codifican la mutación I1781L a RTP4107-5b-1 y RTP4108-8b-2. En experimentos piloto, la eficiencia fue usualmente de solo 5-20 transformantes/ μg de ADN (datos no mostrados). Las cepas haploides RTP4108-8b-2 y RTP4107-5b-1 (así como RLW001-1a-1 y RTP4106-7a-1) tienen un tiempo de duplicación de aproximadamente 4 ½ horas en medio FA líquido de biotina YPG G418. Se cree que la tasa de crecimiento lento y la composición de membrana posiblemente alterada (Schneiter et al., 1996) son las razones principales de las deficientes eficiencias de transformación. La eficiencia de transformación fue aproximadamente un 20% mayor cuando el crecimiento previo de las células tuvo lugar en el medio YPG suplementado con biotina y ácidos grasos y la recuperación tuvo lugar en el medio YPG en oposición al medio de recuperación de transformación YPD plus estándar de Clontech. A pesar de las mejoras, las tasas de transformación fueron bajas, lo que dificultó la detección eficiente de mezclas de fragmentos mutagenizados de alta complejidad.

En los experimentos de control, se observó que la transformación de fragmentos que no portaban ninguna mutación daba lugar a la aparición de colonias en placas de ciclohidim 100 y 200 μM y de tepraloxidim 1 y 10 μM . Además, la distribución directa en placas de las células en un medio selectivo produjo colonias resistentes a una frecuencia de 1 en $\sim 1\text{-}5 \times 10^9$ células. El análisis de la secuencia de estos mutantes espontáneos reveló que estas colonias poseían mutaciones específicas en el dominio C-terminal de la ACCasa híbrida de arroz. También se produjeron mutaciones espontáneas después de la transformación de fragmentos que llevaban mutaciones, como por ejemplo I1781L. Así, en algunos casos, la mutación deseada, como en este ejemplo I1781L, no se observó, pero se encontró otra mutación en una posición diferente. A continuación, se resumen todas las mutaciones espontáneas obtenidas deliberadamente mediante la colocación directa en placa de RTP4107-5b-1 o involuntariamente como antecedentes en los experimentos de transformación descritos a continuación.

Tabla de mutaciones espontáneas que confieren resistencia DIM y el número de colonias que albergan estas mutaciones identificadas en todos los experimentos. Las nuevas mutaciones están indicadas por *; mutaciones nuevas en sitios nuevos por **

Mutación	Identificada	Cambio de nucleótido
I1781L	7x	ATT → CTT
I1781T*	5x	ATT → ACT
I1781V*	42x	ATT → GTT
G1783C**	1x	GGT → TGT
A1785G**	2x	GCT → GGT
A1786P**	2x	GCA → CCA
I1811N**	4x	ATT → AAT
W1999G*	57x	TGG → GGG
V2049F**	13x	GTC → TTC
W2074L**	2x	TGG → TTG
V2075G	5x	GTT → GGT
V2075I**	8x	GTT → ATT
V2075L**	99x	GTT → CTT
D2078G	142x	GAC → GGC
ΔK2080I2081**	2x	AAGATT → Δ
C2088R	35x	TGC → CGC
C2088W*	5x	TGC → TGG
G2096A	101x	GGT → GCT
G2096S*	12x	GGT → AGT
V2098A**	62x	GTT → GCT
V2098G**	66x	GTT → GGT

Entre las mutaciones identificadas, encontramos 11781L, D2078G, C2088R y G2096A. Se sabe que estas mutaciones confieren resistencia (Powles y Yu, 2010) y validaron el sistema de modelo de levadura. 11781V y 11781T son nuevas mutaciones en un sitio conocido. Se ha reportado que W1999C es una mutación que permitió el crecimiento en presencia de FOP, pero no de DIM (Powles y Yu, 2010). Curiosamente, identificamos W1999G como un fuerte candidato para conferir resistencia DIM. Las mutaciones restantes en la tabla anterior son nuevas mutaciones en sitios nuevos, de los cuales se implicó posteriormente que 11811, V2049, V2075 y V2098 estaban involucrados en la unión a tepraloxidim estudiando la estructura de la proteína de la levadura ACC1 (Xiang et al., 2009).

El modelo de levadura se valida adicionalmente por la alta frecuencia con la que se identificaron las mismas mutaciones nuevas (tabla anterior, segunda columna). Todos los mutantes A1785G y V2075G pueden ser dependientes ya que se aislaron en un experimento, pero todos los demás aparecieron independientemente en dos o más experimentos, a menudo después de comenzar con las cepas RTP4107-5b-1 y RTP4108-8b-2. En un solo experimento, se incubaron cultivos líquidos de RTP4107-5b-1 en presencia de cicloxidim para enriquecer el cultivo de células con mutaciones que confieren resistencia a este herbicida. Este procedimiento alternativo para obtener mutantes espontáneos fue exitoso, pero no fue seguido debido a la mayor probabilidad de que los mutantes sean células hijas de un solo evento de mutación.

Algunos de los nuevos aminoácidos que confieren resistencia a los herbicidas en el dominio plástmico resultaron corresponder a residuos ya presentes en ACC1 y ACCasas citosólicas vegetales, lo que sugiere que estos residuos pueden contribuir parcialmente a la resistencia natural de las formas no plásticas. La isoleucina en la posición 1781 y la alanina en la posición 1785 en las ACCasas plásticas son leucina y glicina, respectivamente en la ACCasa no plástica. Las alineaciones entre ACCasa resistente y susceptible pueden ser valiosas para identificar posibles residuos que confieren resistencia DIM. Aparte de 11781L y A1785G, no obtuvimos más mutaciones de este tipo, pero se debe tener en cuenta que las selecciones descritas en la presente memoria no estaban completamente saturadas.

Generación de mutantes resistentes a DIM mediante la transformación de fragmentos con degeneración en codones seleccionados

Aunque la colocación en placa de RTP4108-8b-2 y RTP4107-5b-1 es un procedimiento fácil y conveniente para obtener mutantes, tiene limitaciones. Todas las mutaciones enumeradas en la tabla de mutaciones espontáneas que confieren resistencia DIM anterior fueron sustituciones de un solo nucleótido. La introducción espontánea de dos o tres mutaciones en un solo triplete es un evento raro. Con las sustituciones de un solo nucleótido, aproximadamente 2/3 de los aminoácidos nunca se encontrarán en ninguna posición dada. Utilizamos mutágenos para aumentar la frecuencia de las mutaciones, pero estos tratamientos llevaron a un mayor número de sustituciones de nucleótidos individuales en dos o más tripletes en todo el extremo de codificación 3'. A pesar de la baja eficiencia, la transformación de fragmentos con degeneración completa en una posición elegida es el mejor procedimiento para probar todos los aminoácidos en esa posición. Sobre la base de experimentos piloto con fragmentos 11781L y la frecuencia promedio de aparición de mutantes espontáneos, se estimó que las transformaciones debían realizarse a una escala que era seis veces mayor que la escala de la biblioteca descrita en el protocolo del kit del Sistema 2 de Transformación de Levadura Yeastmaker™ de Clontech. Para obtener un 99% de certeza de que todos los tripletes fueron transformados.

Los sitios que fueron aleatorizados se seleccionaron en función de los resultados obtenidos en la tabla de mutaciones espontáneas que confieren resistencia DIM anterior (11781, W1999, V2049, V2075, D2078 y V2098) y literatura (W2027 y 12041). Las colonias resistentes aisladas después de la transformación y el cultivo en placa de cicloxidim y tepraloxidim se secuenciaron parcialmente (Figuras 8 y 9). Las transformaciones fueron significativamente "contaminadas" con mutantes espontáneos como se anticipó. Sin embargo, para la mayoría de las transformaciones, observamos un enriquecimiento en el número de colonias que tienen mutaciones en el triplete que fue variado (células sombreadas en la Figura 8). Las transformaciones con fragmentos con degeneración en W2027 y 12041 produjeron solo mutantes espontáneos (Figura 9), de acuerdo con los resultados descritos anteriormente.

Identificamos nuevas mutaciones de aminoácidos que requerían la alteración de más de un par de bases en un único triplete. Estos incluyen V2075M (GTT → ATG), D2078T (GAC → ACG y ACT), V2098H (GTT → CAC), V2098P (GTT → CCG y CCC) y V2098S (GTT → AGC, AGT y TCG). Por lo tanto, el procedimiento de transformación descrito en la presente invención permitió el aislamiento de nuevos mutantes que eran prácticamente imposibles de obtener al depender solo de mutaciones espontáneas. Otros procedimientos por los cuales se pueden identificar nuevos mutantes incluyen: i. cambiar el uso del codón de *OsJACCc60p40* en RTP4107-5b-1 para permitir sustituciones alternativas de aminoácidos en los cambios espontáneos de nucleótidos. ii. explorar mutágenos que alteran nucleótidos consecutivos. iii. cambiar la etapa de transposición de cromosomas y plásmidos y mutagénesis en la Figura 5. La cepa diploide con *OsJACCc60p40*, que todavía se basa en ACC1 para la biosíntesis de FA, puede ser más competente para la transformación basada en LiAc/PEG de fragmentos mutagenizados antes de la esporulación y la posterior selección en placas DIM. Alternativamente, los plásmidos

lineales que albergan *OsJACCc60p40* con pequeñas deleciones se pueden cotransformar con fragmentos de reparación mutagenizados que pueden incorporarse por reparación de recombinación homóloga antes de la esporulación y la selección DIM. Estos procedimientos pueden aumentar el rendimiento de los fragmentos mutagenizados que permiten el descubrimiento de nuevas mutaciones de una manera más eficiente.

En muchos casos, se encontró que dos o tres tripletes diferentes estaban mutados en una sola colonia (Figura 8). Por ejemplo, las nuevas variantes de V2049 (V2049A, V2049C, V2049L, V2049S, V2049T) siempre tenían una segunda mutación D2078G o V2098A. De este experimento no podemos concluir si las nuevas mutaciones del V2049 contribuyeron a la resistencia o representaron mutaciones que podrían clasificarse como "neutrales" tanto para la tolerancia a los herbicidas como para la función enzimática de la proteína. La forma más fácil de probar esto es comparar las curvas de crecimiento de las cepas que tienen mutaciones V2049 en combinación con D2078G o V2098A a D2078G y V2098A mutantes individuales en presencia de DIM (ver más abajo). Las mutaciones V2098A y V2098G a menudo estaban acompañadas por mutaciones C2088. Tanto la mutación V2098 como la C2088 utilizaron una amplia variedad de codones (datos no mostrados); por lo tanto, es casi seguro que ambas mutaciones se introdujeron a partir de fragmentos de ADN sintéticos (a diferencia de los mutantes dobles que involucran a V2049, que siempre estuvieron acompañados por los residuos D2078G y V2098A "mutados en un solo nucleótido"). Epoch Biolabs confirmó que sus mezclas de fragmentos sintéticos poseían imperfecciones debido a limitaciones técnicas para la producción de estos fragmentos. Mutagénesis V2098 "enriquecida" para las imperfecciones en la posición C2088.

Los experimentos de control con fragmentos de 11781L que se realizaron en paralelo dieron como resultado la aparición de 333 colonias en placas de cicloxidim. Los fragmentos de "control de peso" produjeron 33 colonias en el mismo medio (la Tabla 2 solo muestra los mutantes secuenciados). Calculamos el nivel de saturación de la siguiente manera:

$$\text{Saturación} = \left(1 - \left(\frac{63}{64} \right)^{(333-33)} \right) \times 100\% = 99,1\%$$

El alto nivel de saturación se respalda inicialmente por la aparición de seis mutantes V2075M (Figura 8). La metionina está codificada solo por ATG y los seis transformantes se obtuvieron de forma independiente, ya que el tiempo de duplicación de las cepas de levadura dependientes de ACCasa del arroz es mucho más largo (4 ½ h) que el tiempo de regeneración utilizado en el procedimiento de transformación (1½ h). Sin embargo, otras estadísticas sugieren una falta de saturación. Por ejemplo, los mutantes V2075L fueron codificados por CTG, CTT, TTG y TTA, pero nunca se aislaron mutantes CTC o CTA y V2075I de las placas de tepraloxidim, aunque esta mutación debe conferir resistencia a la concentración utilizada. Especulamos que las mezclas de fragmentos de Epoch no contienen cantidades equimolares de todas las variantes posibles y que nuestra selección no estaba completamente saturada. Por lo tanto, aún pueden existir mutaciones adicionales en V2075, así como en todos los otros sitios investigados por la presente memoria, que confieren resistencia DIM. Estos supuestos mutantes se pueden descubrir aumentando la escala de los experimentos de transformación o mediante transformaciones paralelas con fragmentos que codifican aminoácidos individuales no probados en sitios seleccionados.

Generación de mutantes dobles con mayor tolerancia a los herbicidas

Los mutantes dobles se pueden fabricar transformando fragmentos con una mutación que confiere resistencia a DIM a una cepa aceptante con otra mutación que confiere resistencia a DIM y se coloca posteriormente en una alta concentración de DIM que inhibe el crecimiento de mutantes individuales sin transformar y permite la selección de mutantes dobles superiores. La Figura 7 muestra que el crecimiento de la levadura que expresa la *ACC1* de levadura se redujo levemente en cicloxidim 200 µM. Confirmamos que este efecto no fue causado por el metanol, que se usó como disolvente para el cicloxidim. Por lo tanto, elegimos tepraloxidim en una concentración de 75 µM (~150x la concentración que inhibió significativamente las cepas dependientes de *OsJACCc60p40* y ~8x la concentración que inhibió significativamente las "cepas I1781L") para la selección. La Figura 10 muestra que los mutantes I1781L + V2075L, W1999G + V2075L, W1999G + D2078G, W1999G + G2096A y W1999G + V2098A se obtuvieron según lo previsto. Sin embargo, la mayoría de los mutantes dobles pretendidos no se obtuvieron. En cambio, a menudo se encontraron segundas mutaciones espontáneas, además de la mutación ya existente en la cepa aceptante. La ausencia de mutantes dobles intencionados podría haber tenido dos causas: i. las dos mutaciones individuales no tuvieron un efecto sinérgico o incluso aditivo en la tolerancia a los herbicidas ni comprometieron la función de la enzima de manera general, ii. La eficiencia de transformación de la levadura dependiente de ACCasa híbrida de arroz fue demasiado baja en algunos casos. Todas las transformaciones que produjeron los mutantes dobles previstos (indicados en cuadrados sombreados en la Figura 10) se obtuvieron en un solo experimento de transformación. Todas las demás transformaciones que se muestran en la Figura 10 se intentaron cuatro veces sin éxito. Algunas mutaciones pueden no funcionar bien juntas, pero se requieren transformaciones adicionales para adquirir más certeza.

Los mutantes dobles que involucran residuos que están muy juntos (por ejemplo, G2096A y V2098A) se pueden obtener transformando RTP4107-5b-1 con un fragmento que contiene ambas mutaciones. Esta estrategia no fue utilizada en este caso. En su lugar, razonamos que esos y otros mutantes dobles podrían obtenerse mucho más fácilmente colocando mutantes individuales en placas con 75 μM de tepraloxidim y esperando que aparezcan segundas mutaciones espontáneas. Este procedimiento no solo es menos laborioso, sino que también selecciona automáticamente las mutaciones que funcionan bien juntas. La Figura 11 muestra los mutantes individuales que se colocaron en placas (entre $1,5 \times 10^9$ y 5×10^9 células), incluidos los mutantes que requerían más de un cambio de nucleótido (V2075M, D2078T, V2098H, V2098P, V2098S), y las mutaciones adicionales, espontáneas que se obtuvieron. En esta tabla, la frecuencia de aparición de estas mutaciones es menos relevante, ya que los mutantes dobles podrían ser células hijas de un solo evento.

Curvas de crecimiento de mutantes en presencia de tepraloxidim, cicloxidim y haloxifop

La mayoría de los mutantes simples y dobles aislados en la presente se cultivaron en cultivos líquidos con y sin herbicidas para obtener curvas de crecimiento y comparar su efectividad relativa. Además de cicloxidim y tepraloxidim, nos interesaron las características de crecimiento de los mutantes en presencia de haloxifop, que pertenece a la clase de herbicidas FOP. Hicimos "curvas de muerte" en las placas de haloxifop sólidas primero con RTP4107-5b-1 y DIVE292, una cepa que poseía la mutación I1781L (Figura 7C). La actividad del haloxifop fue comparable a la del cicloxidim. Todos los procedimientos descritos en la presente también se pueden aplicar a los herbicidas FOP.

Las curvas de crecimiento se realizaron con cicloxidim 100 y 200 μM , tepraloxidim 2, 10 y 100 μM , haloxifop 100 y 200 μM y sin herbicida (ver Figuras). En todos los experimentos anteriores usamos cicloxidim de Sigma-Aldrich disuelto en metanol. Sin embargo, el producto se discontinuó, por lo que las curvas de crecimiento finales se hicieron con una formulación de cicloxidim, disuelta en nafta. La formulación tiene un efecto negativo sobre la cepa de levadura que depende de ACC1 para la biosíntesis de FA durante los primeros 2 días de crecimiento (Figura 12). Este fenómeno no se observó en experimentos anteriores con cicloxidim disuelto en metanol. Creemos que la nafta retrasa el crecimiento, pero después de la evaporación, el crecimiento del solvente se restaura rápidamente. Las cepas híbridas dependientes de ACCasa del arroz crecen mucho más lentamente y los efectos de la nafta no fueron claramente visibles. Los experimentos de la curva de crecimiento piloto con cicloxidim disuelto en metanol confirmaron esta vista para todos los mutantes analizados, ya que se encontró que los gráficos eran muy similares a los gráficos presentados en la presente (datos no mostrados).

La cepa de control OsJACCc60p40 (RTP4107-5b-1) no pudo crecer en presencia de ninguno de los herbicidas probados en la presente (Figura 13). Todos los mutantes individuales mostraron un cierto grado de tolerancia a los herbicidas. Los mutantes únicos W1999G y V2098A se probaron por triplicado con tres cepas obtenidas independientemente (Figuras 14-19). Los triplicados produjeron gráficos similares. Sin embargo, se debe tener cuidado al comparar diferentes cepas. El objetivo fue comenzar todos los cultivos con la misma cantidad de células, pero el estado físico general de los cultivos puede diferir según el tiempo de los precultivos en la fase estacionaria antes de la dilución en medio con herbicidas. El crecimiento siempre debe considerarse como un crecimiento relativo comparado con el crecimiento en un medio sin herbicida. Las mejores mutaciones individuales que confieren resistencia DIM son D2078G, V2098A y V2098G. V2075M (y, en menor medida, V2075L) es una buena mutación para el crecimiento en medio de tepraloxidim, pero no en medio de cicloxidim. Esta mutación tiene potencial para ser utilizada en rotación con la mutación I1781L, por lo que se ha demostrado que proporciona tolerancia comercial a cicloxidim, pero no a tepraloxidim. La resistencia al haloxifop es más pronunciada en los mutantes W1999G y C2088R.

Se aisló un gran número de mutantes dobles en los que una mutación nunca se caracterizó como una sola mutación. Por lo tanto, estas mutaciones pueden no haber contribuido a la resistencia. La siguiente tabla muestra el cambio relativo en la tolerancia a cicloxidim, tepraloxidim y haloxifop debido a la segunda mutación no caracterizada en comparación con la mutación caracterizada.

La tabla de cambios en la resistencia relativa al cicloxidim, tepraloxidim y haloxifop entre mutantes individuales que se han caracterizado completamente y mutantes dobles que tienen una mutación no probada en combinación con las mutaciones probadas enumeradas.

	no probada	probada	cicloxdim	tepraloxidim	haloxifop
	S1792L	V2049F	ND	ND	ND
5	Q1824P	D2078G	—	—	—
	Q1824P	I1781L	—	—	—
	A1837V	V2075I	↑↑	↑↑	↑↑
	V1864F	I1781L	—	↑↑	↓↓ (ausente)
10	V1864F	W1999G	↓↓ (ausente)	↑↑	↓↓ (ausente)
	W1999C	V2075I	↑↑	↑↑	↑↑
	W1999L	V2049F	ND	ND	ND
15	W2027R	I1781L	↓	↓↓	↓
	E2039G	D2078G	—	—	—
	I2041V	D2078G	↑↑	↑↑	↑↑
	V2049A	D2078G	ND	ND	ND
20	V2049C	D2078G	↑	↑	↓↓ (ausente)
	V2049I	W1999G	—	↑↑	—
	V2049L	V2098A	↓↓	↓↓	↓↓ (ausente)
25	V2049S	D2078G	ND	ND	ND
	V2049T	D2078G	↓	↑↑	↓↓ (ausente)
	duplV2075	I1781L	—	↑↑	—
30	S2079F	D2078G	↓↓	↓↓	↓↓
	S2079P	D2078G	↓	↓	↓
	K2080E	V2075M	— (ninguno)	↑↑	↑↑
	C2088F	V2049F	ND	ND	ND
35	C2088F	V2098A	↓	↓	↓
	C2088G	D2078G	—	↑↑	↑
	C2088G	V2098G	↓	—	— (ninguno)
	C2088H	V2098A	↑↑	↑↑	↑
40	C2088H	V2098G	—	↑↑	↑
	C2088K	V2098A	↑↑	—	—
	C2088L	V2098A	↑↑	—	↑
45	C2088L	V2098G	↓	↑	— (ninguno)
	C2088S	V2098G	↓	—	— (ninguno)
	C2088T	V2098A	ND	ND	ND
	C2088T	V2098G	—	↑↑	— (ninguno)
50	C2088V	V2098G	↓	↑	↑
	K2095E	V2075M	— (ninguno)	↑↑	—
	V2098C	C2088W	↓↓	↑	— (ninguno)

55 Los recuadros grises representan mutantes dobles recogidos de las placas de tepraloxidim de alta concentración (Figuras 10 y 11). ND = No determinado; - = no hay cambio en la tolerancia; ↓ = disminución de la tolerancia; ↑ = aumento de la tolerancia.

60 Las mutaciones Q1824P y E2039G no parecieron cambiar la tolerancia al herbicida y otras mutaciones tuvieron un efecto negativo sobre la tolerancia al herbicida (W2027R, V2049L, S2079F, S2079P, C2088F y C2088S). Las mutaciones A1837V, V1864F, W1999C, I2041V, V2049C, V2049I, V2049T y las duplicaciones V2075, K2080E, C2088G, C2088H, C2088K, C2088L, C2088T, C2088V, K2095E y V2098C incrementaron la tolerancia a al menos un herbicida. En algunos casos, hubo una disminución en la tolerancia a otro(s) herbicida(s) (V1864F, V2049C, V2049T, C2088L, C2088V y V2098C). En particular, la presencia adicional de V1864F eliminó completamente la alta tolerancia que los mutantes individuales I1781L y W1999G mostraron para el haloxifop. Dichas observaciones

son importantes a la luz de la posible rotación entre DIM o entre DIM y FOP en el arroz cultivado, modificado, sin OGM en el futuro. Todos los aislamientos descritos en la presente memoria se seleccionaron en placas DIM. El mutante V2075G, que se aisló de las placas de cicloxidim, es la mutación más "específica de FOP" que fue aislada. Los mutantes que son específicamente tolerantes a los FOP se pueden obtener repitiendo todos los exámenes descritos en la presente memoria y seleccionando las placas de FOP.

Entre los mutantes dobles que consisten en dos mutaciones individuales caracterizadas separadamente, se encontró que I1781L + V2075L, W1999G + V2075L y W1999G + V2098A son completamente resistentes a ~ 150-200x la concentración de tepraloxidim que detiene completamente el crecimiento del control OsJACCc60p40. Estas tres mutaciones dobles también fueron altamente resistentes al cicloxidim y al haloxifop. Las curvas de crecimiento se realizaron con tres cepas obtenidas de forma independiente (ver Figuras) y los resultados fueron altamente reproducibles en múltiples experimentos (datos no mostrados). Estas tres mutaciones dobles, junto con la mutación única V2075M, se han introducido en la ACCasa de arroz totalmente plástica y se pueden usar para generar plantas transgénicas, por ejemplo, maíz transgénico. También se pueden usar A1837V+V2075I, I1781L+V2049F, I1781L+V2098G, W1999G+D2078G, W1999C+V2075I e I2041V + D2078G.

Los mutantes dobles adicionales que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, S1792L+V2049F, N1780D+I1781L, I1781V+V2049F, A1785G+D2078G, A1785G+V2098A, A1785G+V2098G, W1999L+V2049F, V2049A+D2078G, V2049F+C2088F, V2049S+D2078G, A2059G+D2078G, V2075L+C2088W y C2088T + V2098A.

Los mutantes individuales V2075L, V2098A y V2098G son los mutantes individuales más resistentes a tepraloxidim, con V2075L que exhibe una menor tolerancia al cicloxidim y V2098G exhibe una mayor tolerancia. Los mutantes dobles que contienen W1999G en combinación con I1781L y/o V2075L mostraron una buena tolerancia. El doble mutante W1999G V2075L es resistente a tepraloxidim 100 µM (en comparación con I1781L T100). W1999C parece proporcionar específicamente tolerancia a solo FOP.

Referencias

Beetham PR, Kipp PB, Sawycky XL, Arntzen CJ and May GD (1999). A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8774-8778.

Chugh and Eudes (2008). Study of uptake of cell penetrating peptides and their cargoes in permeabilized wheat immature embryos. *FEBS J* 275: 2403-2014.

Delye C, Zhang X-Q, Chalopin C, Michel S and Powles SB (2003). An isoleucine residue within the carboxyltransferase domain of multidomain acetyl-coenzyme A carboxylase is a major determinant of sensitivity to aryloxyphenoxypropionate but not to ciclohexanedione inhibitors. *Plant Physiol* 132: 1716-1723.

Delye C, Zhang X-Q, Michel S, Matejcek A and Powles SB (2005). Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in Black-Grass. *Plant Physiol* 137: 794-806.

Gietz D, St Jean A, Woods RA and Schiestl GH (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl Acids Res* 20: 1425.

Hasslacher M, Ivessa AS, Paltauf F and Kohlwein SD (1993). Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J Biol Chem* 268 (15):10946-10952.

Joachimiak M, Tevzadze G, Podkowinski J, Haselkorn R and Gornicki P (1997). Wheat cytosolic acetyl-CoA carboxylase complements an ACC1 null mutation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (18): 9990-9995.

Liu W, Harrison DK, Chalupska K, Gornicki P, O'Donnell CC, Adkins SW, Haselkorn R and Williams RR (2007). Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3627-3632.

Mumberg D, Muller R and Funk M (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122.

Nikolau BJ, Ohlrogge JB and Wurtele ES (2003). Plant biotin-containing carboxylases. *Arch Biochem Biophys* 414:211-222.

Nikolskaya T, Zagnitko O, Tevzadze G, Haselkorn R, and Gornick P (1999) Herbicide sensitivity determinant of wheat plastid acetyl-CoA carboxylase is located in a 400-amino acid fragment of the carboxyltransferase domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (25): 14647-14651.

5 Podkowinski J, Jelenska J, Sirikhachornkit A, Zuther E, Halekorn R and Gornicki P (2003). Expression of cytosolic and plastid acetyl-coenzyme A carboxylase genes in young wheat plants. *Plant Physiol* 131(2):763-772.

10 Schneider R, Hitomi M, Ivessa AS, Fasch EV, Kohlwein SD and Tartakoff AM (1996) A yeast acetyl coenzyme A carboxylase mutant links very-long-chain fatty acid synthesis to the structure and function of the nuclear membrane-pore complex. *Mol Cell Biol* 16: 7161-7172.

15 Shivrain VK, Burgos NR, Anders MM, Rajguru SN, Moore J and Sales MA (2007). Gene flow between CLEARFIELD® rice and red rice. *Crop Protection* 26: 349-356.

Somers DA (1996). Aryloxyphenoxypropionate- and cyclohexanedione-resistant crops. Duke SO. (Editor) In: *Herbicide-Resistant Crops Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*, Duke SO (Editor), CRC Press, New York, (1996). pp. 175-187/188

20 Tong AH, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD, Pagé N, Robinson M, Raghizadeh S, Hogue CW, Bussey H, Andrews B, Tyers M and Boone C (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294 (5550): 2364-2368.

25 Tong AH and Boone C (2006). Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* 313:171-92.

30 Si bien se han descrito realizaciones particulares de la invención anteriormente con fines descriptivos, los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones de los detalles sin apartarse de la invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) que es tolerante a al menos un herbicida, que comprende:
- a. proporcionar una levadura deficiente en ACCasa que comprende un ácido nucleico que codifica una ACCasa quimérica, comprendiendo dicha ACCasa quimérica una región N-terminal y una región C-terminal, en el que la región C-terminal comprende una región de sensibilidad a herbicidas (HSR) de una ACCasa plastídica de monocotiledónea de una *Poaceae*;
 - b. poner en contacto dicha levadura con al menos un oligonucleótido mutagénico en condiciones que permitan la mutagénesis dirigida al sitio de al menos un codón del ácido nucleico que codifica la ACCasa quimérica, y hacer crecer la levadura mutagenizada formando de este modo una biblioteca de colonias de levadura mutagenizadas;
 - c. cultivar las colonias de levadura mutagenizadas en presencia de al menos un herbicida inhibidor de ACCasa para formar colonias tratadas; y
 - d. aislar de al menos una de dichas colonias tratadas, al menos una levadura mutagenizada que crece en presencia del herbicida, en el que la levadura mutagenizada que crece en presencia del herbicida comprende una ACCasa mutagenizada que tiene una tolerancia al herbicida que es mayor que la exhibida por la ACCasa quimérica de la etapa (a):
- en el que el procedimiento es un procedimiento de alto rendimiento en el que un trabajador capacitado puede generar y seleccionar al menos 500 diferentes ACCasas con HSR variante por mes, cada una de su propia colonia celular.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico que codifica la ACCasa quimérica es un plásmido de copia única.
 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido comprende más de una falta de coincidencia de nucleótidos con la secuencia del ácido nucleico que codifica la HSR de la ACCasa quimérica, dando como resultado la mutación de más de una base del ácido nucleico.
 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos un oligonucleótido mutagénico es una biblioteca de oligonucleótidos con diferentes secuencias.
 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la biblioteca comprende oligonucleótidos que tienen todos los codones posibles en una posición que codifica un aminoácido en la región de sensibilidad a herbicidas.
 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región de sensibilidad a herbicidas comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos seleccionada de la de los residuos: 1654(Am) a 2204(Am), 1654(Am) a 2130(Am) , 1654(Am) a 2098(Am), 1750(Am) a 2204(Am), 1750(Am) a 2130(Am), 1750(Am) a 2098(Am), 1781(Am) a 2204(Am) , 1781(Am) a 2130(Am), o 1781(Am) a 2098(Am) del GenBank CAC84161.
 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la monocotiledónea es una especie de *Oryza*.
 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región de sensibilidad a herbicidas comprende al menos una mutación de tolerancia a herbicida antes de la etapa de contacto con el oligonucleótido mutagénico.
 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha levadura deficiente en ACCasa comprende una mutación del gen de ACCasa de levadura genómica seleccionada del grupo que consiste en: una mutación puntual única, mutaciones puntuales múltiples, una delección parcial, una inactivación parcial, una delección completa y una inactivación completa.
 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha región N-terminal se deriva de una ACCasa de un género de levadura u hongo, seleccionándose la levadura u hongo del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Ascomycetes* *Neurospora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Chrysosporium*, *Yarrowia*, *Arxula* y *Hansenula*.
 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha región C-terminal se deriva de una ACCasa plastídica de monocotiledónea seleccionada del grupo que consiste en ACCasas plastídicas de cereales y ACCasas plastídicas de césped.

12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha región C-terminal se deriva de una ACCasa plástica de una especie de *Oryza*.
- 5 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha región C-terminal HSR se deriva de una ACCasa plástica de una especie de *Oryza*.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho herbicida es un herbicida ariloxifenoxipropionato (FOP) o ciclohexanodiona (DIM).
- 10 15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho herbicida FOP se selecciona del grupo que consiste en cihalofop, quizalofop, diclofop, clodinafop, fluazifop, metamifop, propaquizafop y fenoxiprop o en el que dicho herbicida DIM se selecciona del grupo que consiste en aloxidim, butroxidim, cletodim, cicloxidim, tepraloxidim, setoxidim, tralkoxidim y profoxidim.
- 15 16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho herbicida está presente a una concentración de aproximadamente 0,02 μM a aproximadamente 200 μM .
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha región C-terminal comprende aproximadamente 50% a aproximadamente 60% de la ACCasa química.
- 20 18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células de levadura se cultivan a una temperatura de aproximadamente 23°C a aproximadamente 30°C.
19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células de levadura se cultivan en medio líquido.
- 25 20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células de levadura se cultivan en medio de fase sólida.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

FIGURA 1A

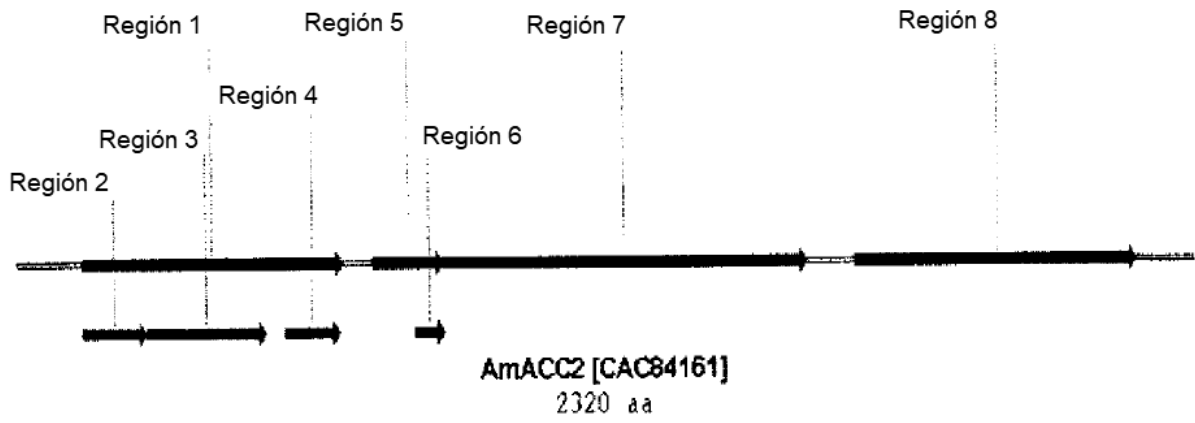


FIGURA 1B

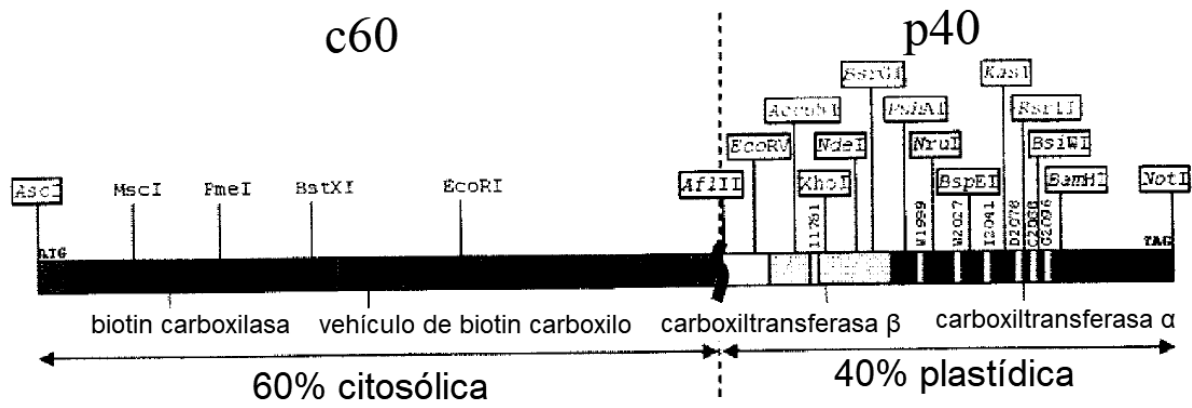


FIGURA 2A

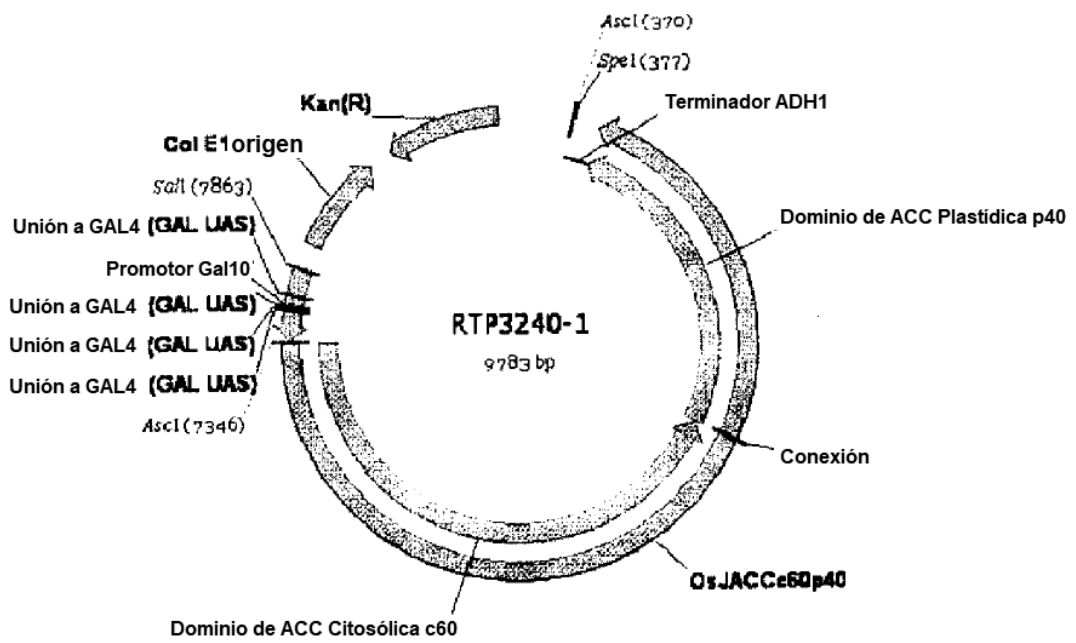


FIGURA 2B

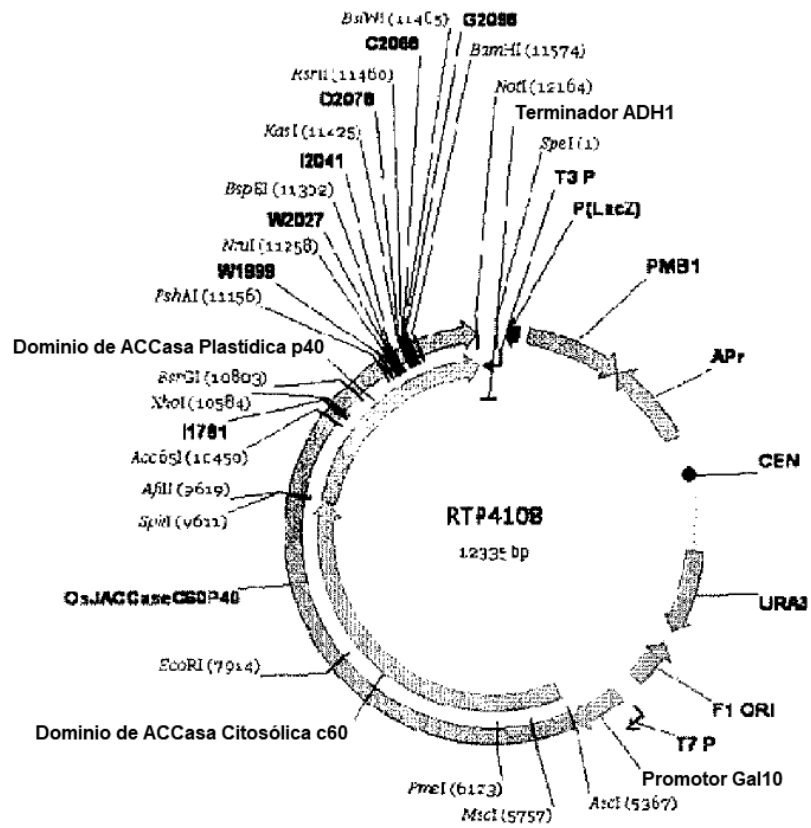


FIGURA 2C

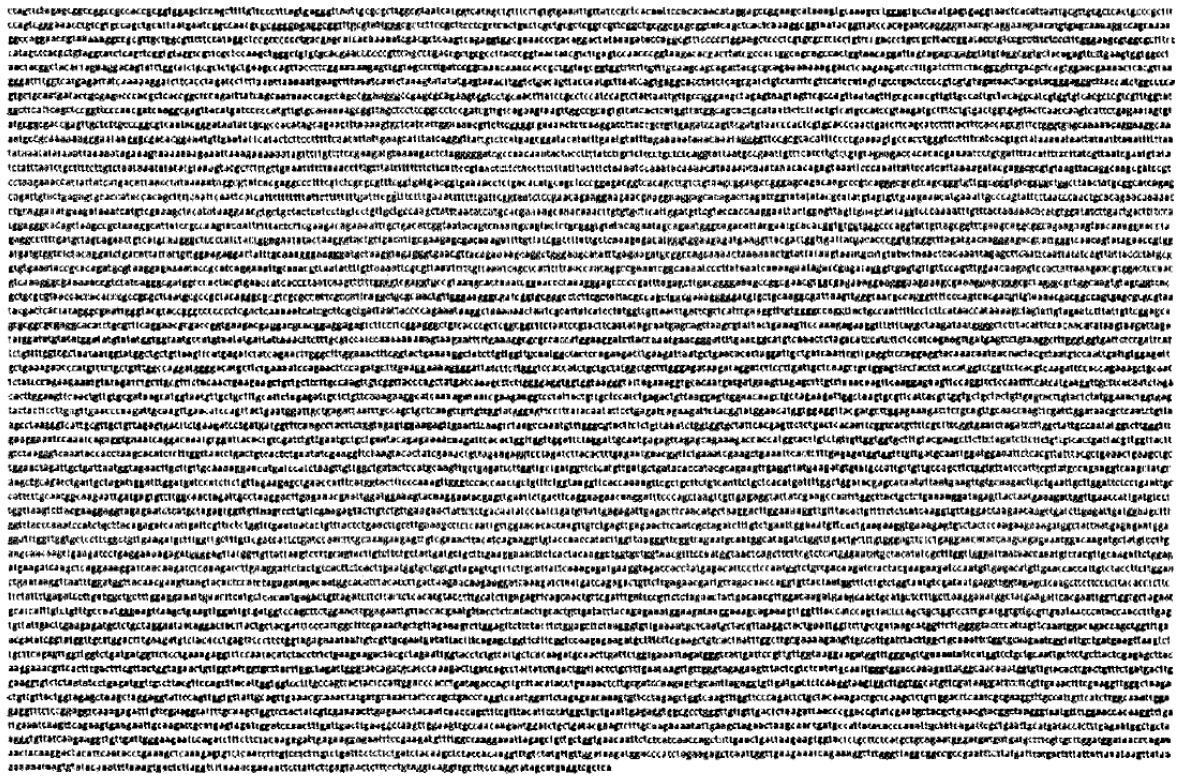


FIGURA 3A

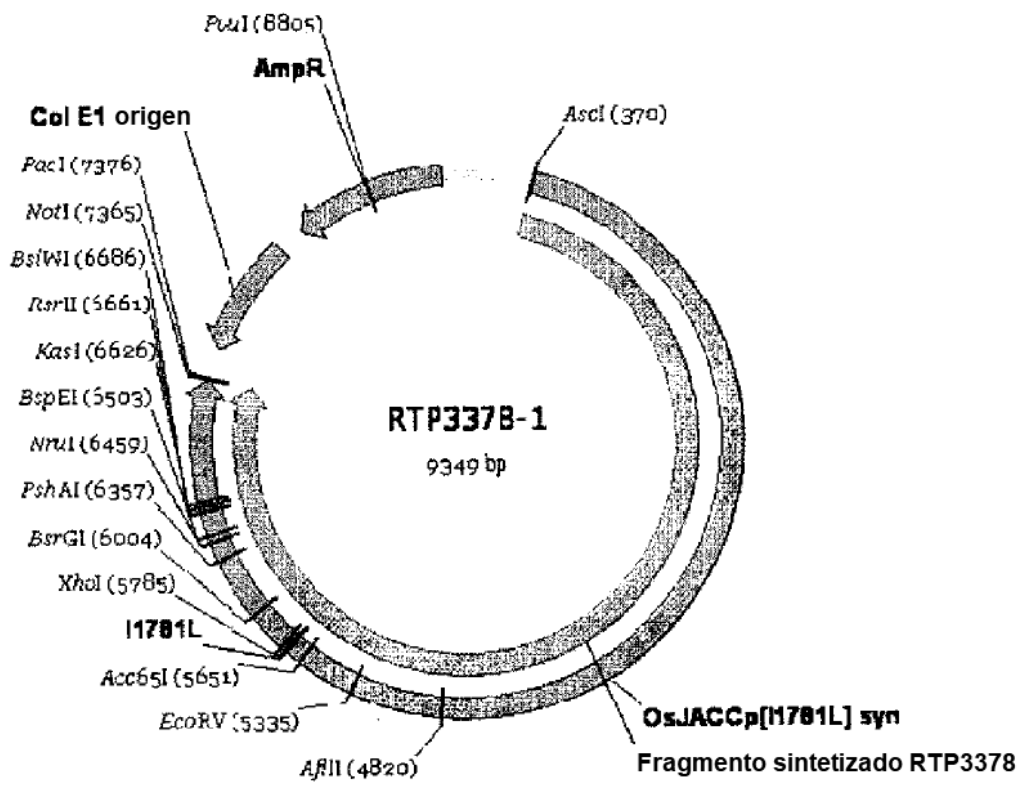
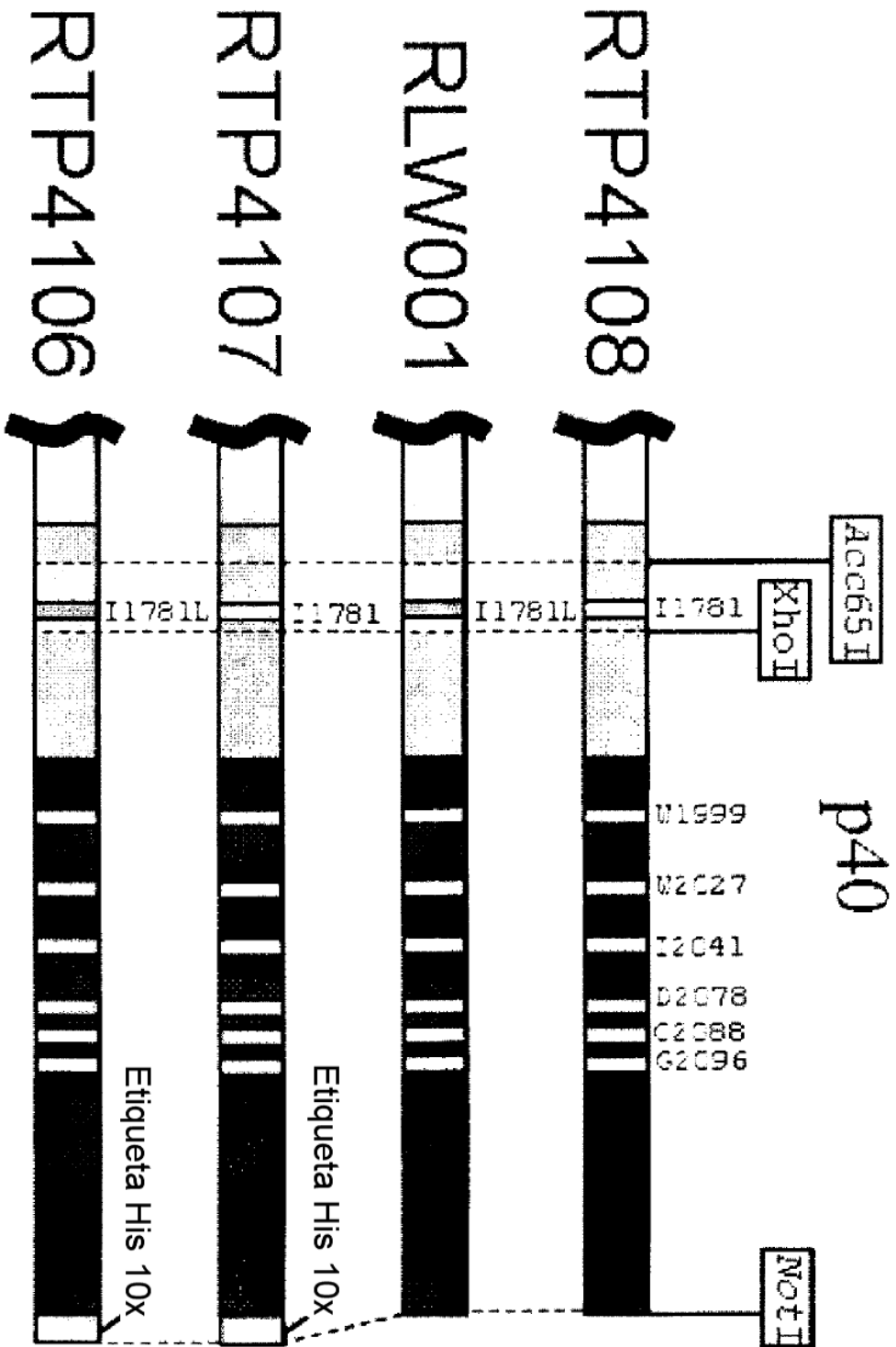


FIGURA 3B

FIGURA 3B

FIGURA 4



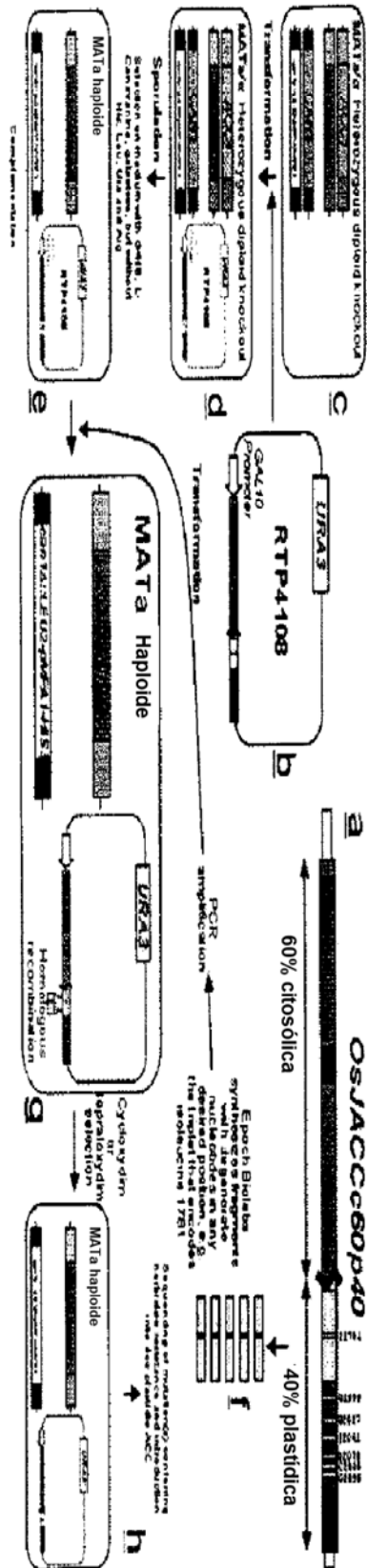


FIGURA 5

FIGURA 6

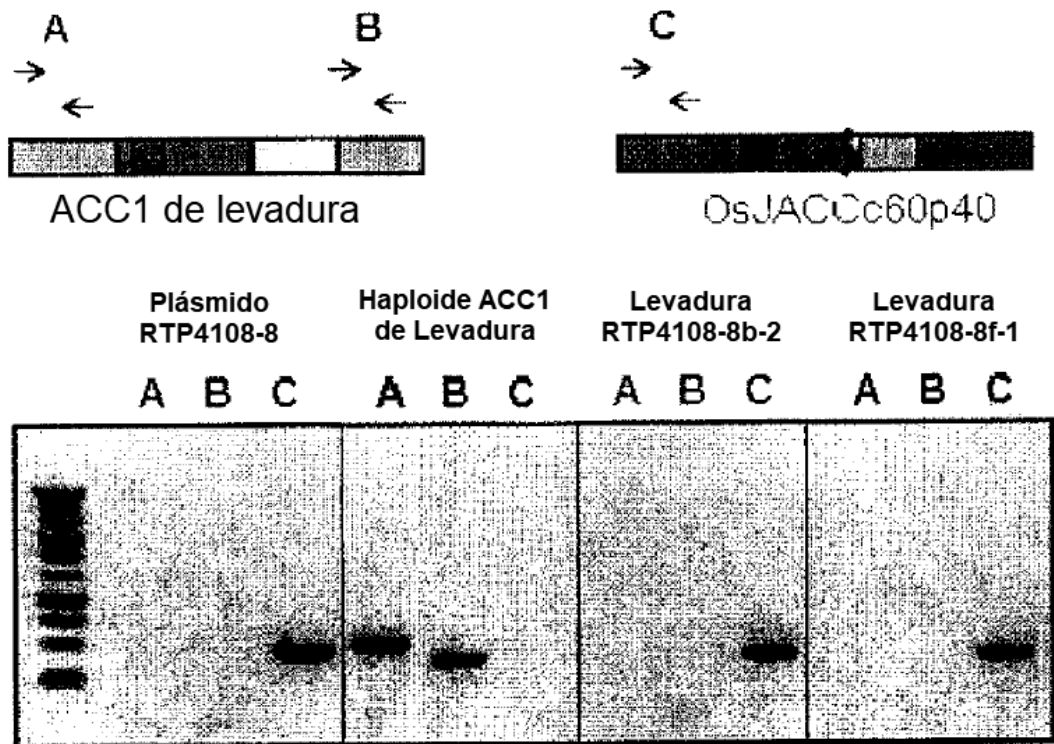
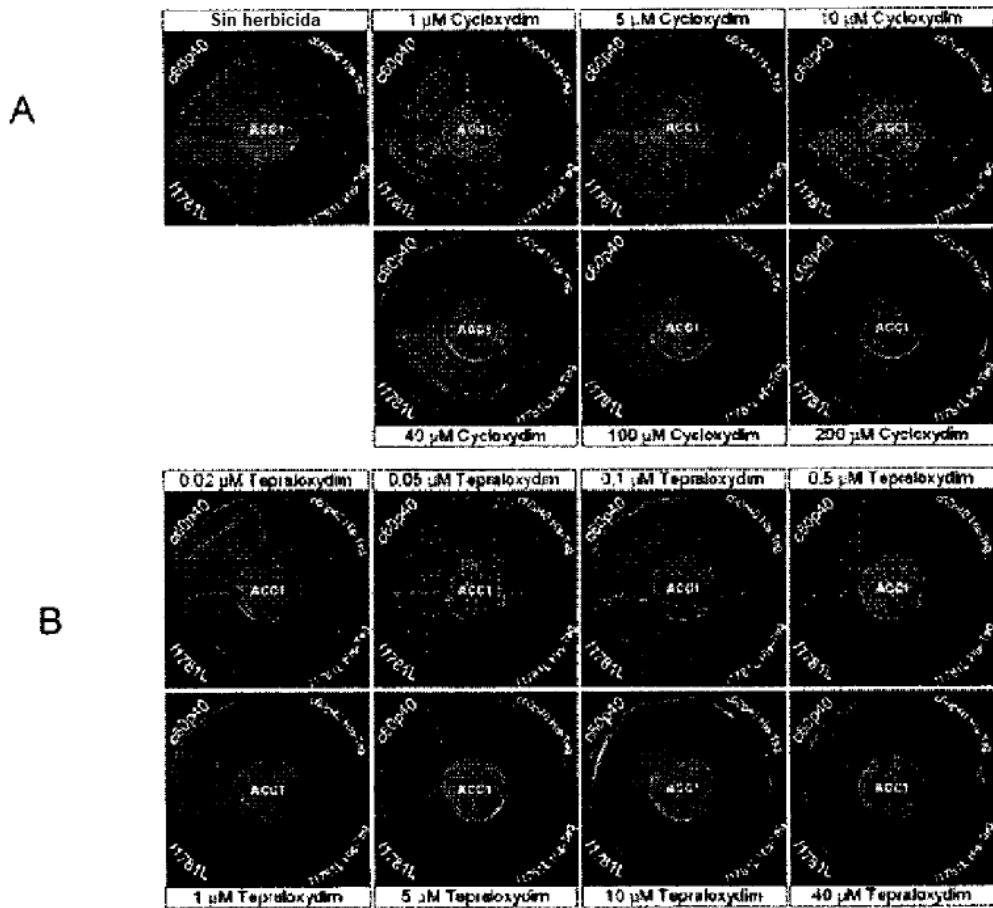


FIGURA 7



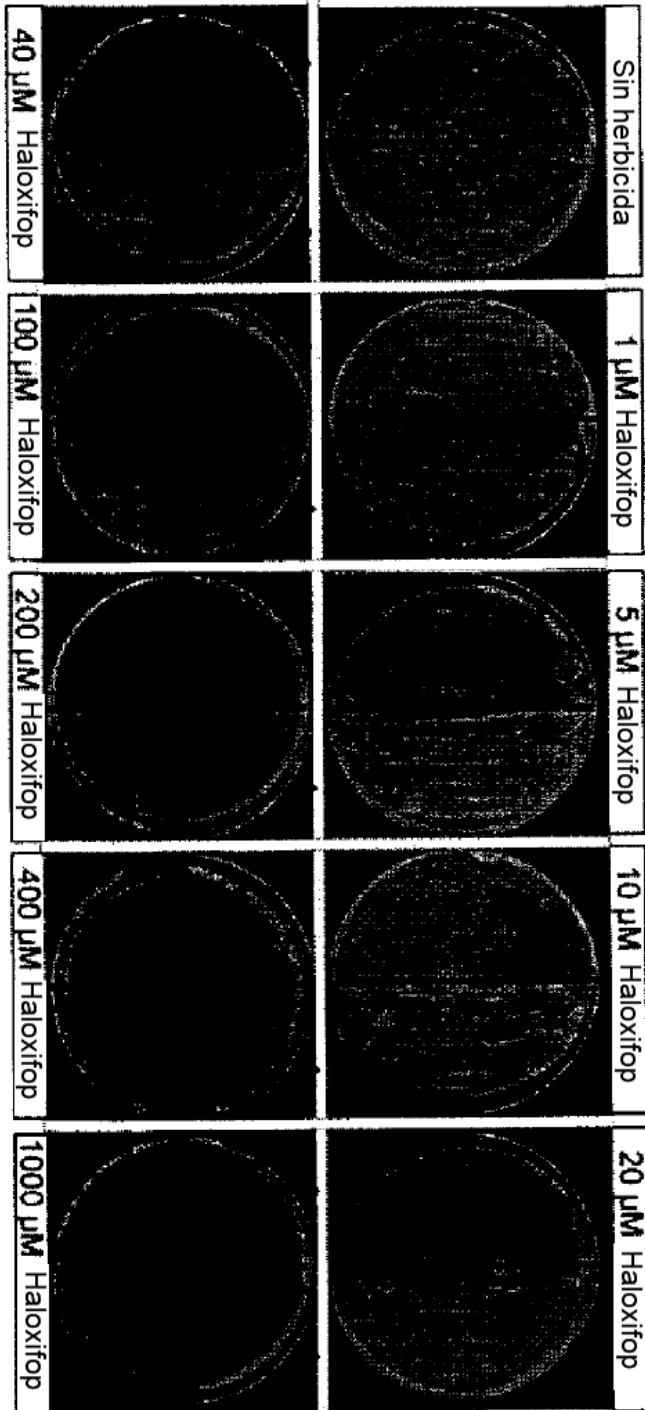


FIGURA 7C

FIGURA 8

Mutación pretendida + selección = (transformación)	Mutación observada	W1 control C 100	W1 control T1	H17B1X C 100	H17B1X T1	W1999X C 100	W1999X T1	V2049X C 100	V2049X T1	V2075X C 100	V2075X T1	D2078X C 100	D2078X T1	V2098X C 100	V2098X T1
V2098C + C2098W															
V2098S															
V2098P															
V2098H															
V2098G + C2098V															
V2098G + C2098T															
V2098G + C2098S															
V2098G + C2098L															
V2098G + C2098H															
V2098G + C2098I															
V2098G + C2098O															
V2098G															
V2098A + C2098T															
V2098A + C2098L															
V2098A + C2098K															
V2098A + C2098H															
V2098A + C2098F															
V2098A															
Q2098S															
Q2098A															
C2098W															
C2098R															
AK2080 AI2081															
D2078G + D2041V															
D2078G + C2098G															
D2078G + A2098V															
D2078G + E2079P															
D2078C + E2039G															
D2078T															
D2078O															
V2078M + K2093E															
V2078M + K2088E															
V2078M															
V2075L															
V2049L + V2098A															
V2049T + D2078G															
V2049S + D2078G															
V2049C + M2085T + D2078G															
V2049C + D2078G															
V2049A + D2078G															
V2049F															
W1999G															
H1781N															
A1786P															
A1785G															
H1781L + H1780D															
H1781V															
H1781L															

FIGURA 9

Mutación observada	↓													Mutación pretendida + selección = (transformación)	
I2041X C100	3	1	1		2			8		1	15	1	4	8	
I2041X T1	3				8	1	11	3	3	1	1		3	5	
W2027X C100	4			1	1			3	1		1	8	1		1
W2027X T1	1				5	1	13	1				1		6	4

FIGURA 10

Mutación observada ↓ Transformación											
		11781L V2049F	11781L V2075L	11781L E2088A V2075L	11781L duplV2075	V1864F W1999G	W1999G V2075L	W1999G V2075L	W1999G D2078G	W1999G G2096A	W1999G V2098A
acceptor	donor										
11781L	W2027C				1						
11781L	I2041H										
11781L	V2075L	20	1								
11781L	G2096A										
11781L	V2098G	2									
W1999G	11781L						1			1	
W1999G	W2027C										
W1999G	W2027R										
W1999G	I2041H										
W1999G	V2049F						1				
W1999G	V2075L						3			1	
W1999G	D2078G							5			
W1999G	C2088R				1		1				
W1999G	G2096A							1			
W1999G	V2098A								1		
W1999G	V2098G						1				
D2078G	11781L										
C2088R	11781L										
C2088R	V2049F										
V2098A	11781L										
V2098A	V2049F										
V2098A	V2075L										
V2098G	V2049F										
V2098G	V2075L										

	Segunda mutación ganada											Mutantes simples en placas								
11781L	1											10	17	14						
11781T	1																			
A1785G																				
A1786P																				
W1999G								1												
V2049F									1											
W2074L																				
V2075I																				
V2075L																				
V2075M																				
D2078G																				
D2078T																				
AK2080I2081																				
C2088R																				
C2088W																				
V2098A																				
V2098G																				
V2098H																				
V2049P																				
V2098S																				

FIGURA 11

FIGURA 12

ACC1

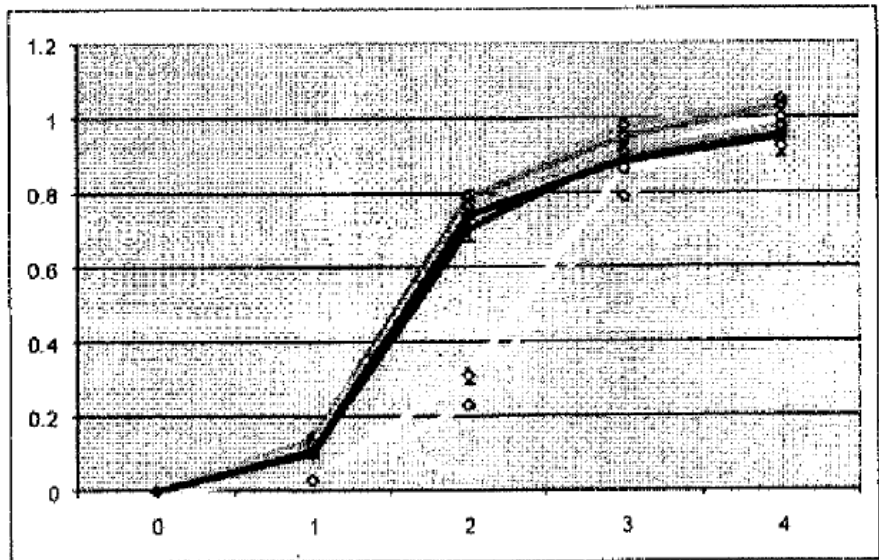


FIGURA 13

c60p40

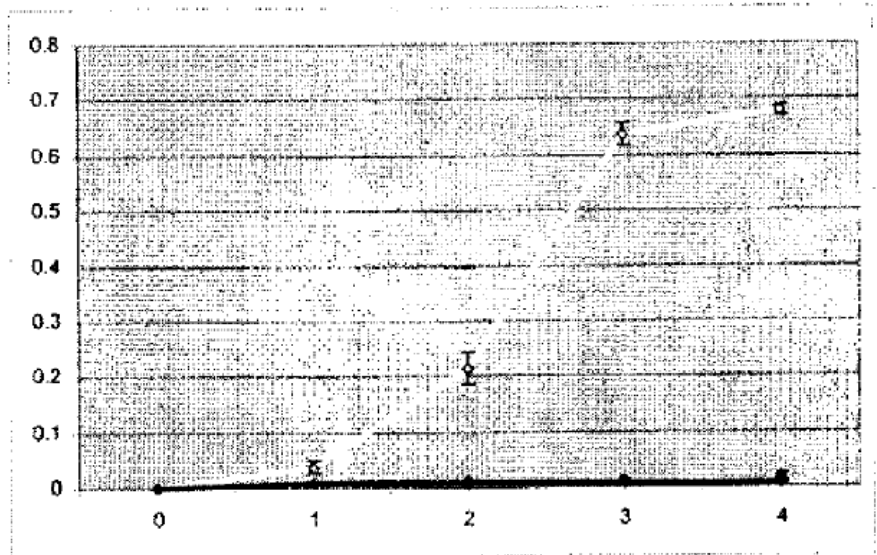


FIGURA 14

W1999G

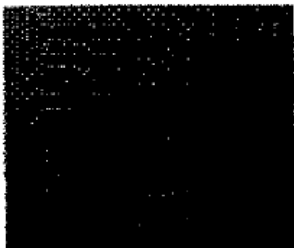
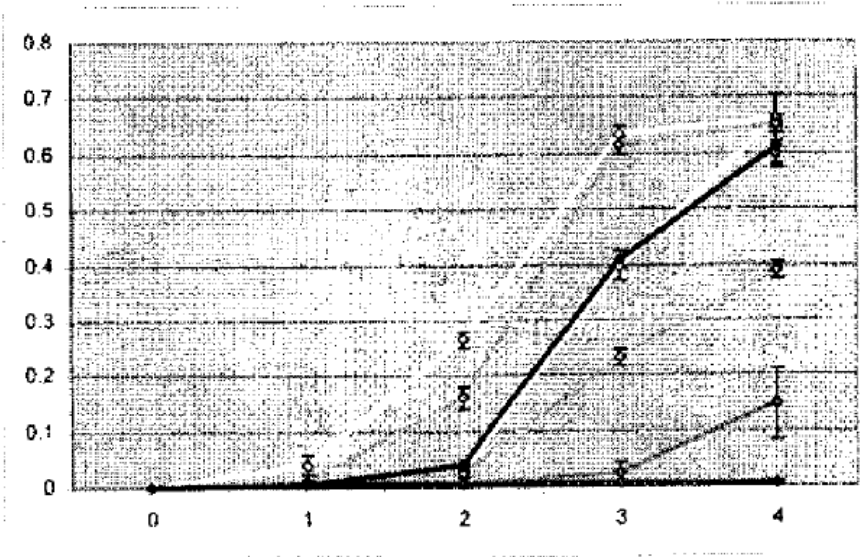


FIGURA 15

W1999G

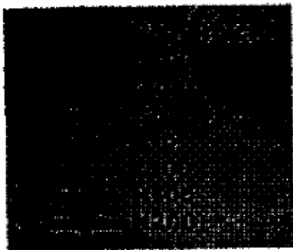
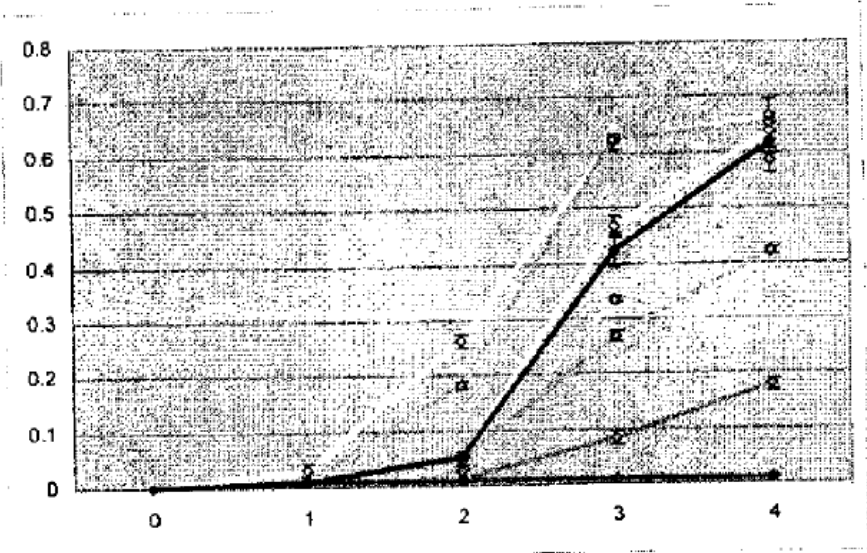


FIGURA 16

V2098A

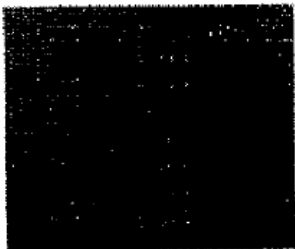
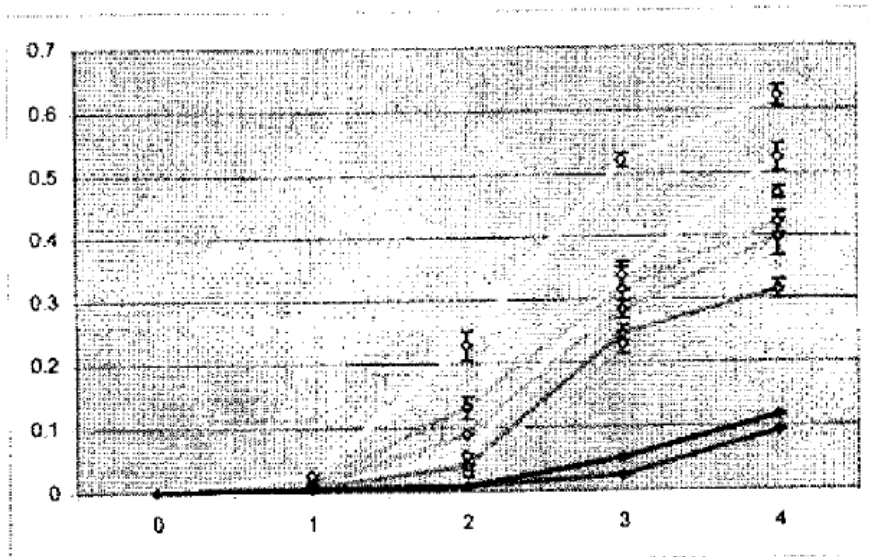


FIGURA 17

V2098A

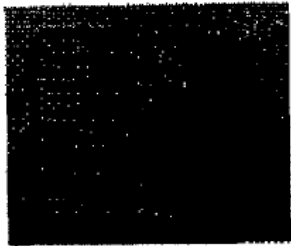
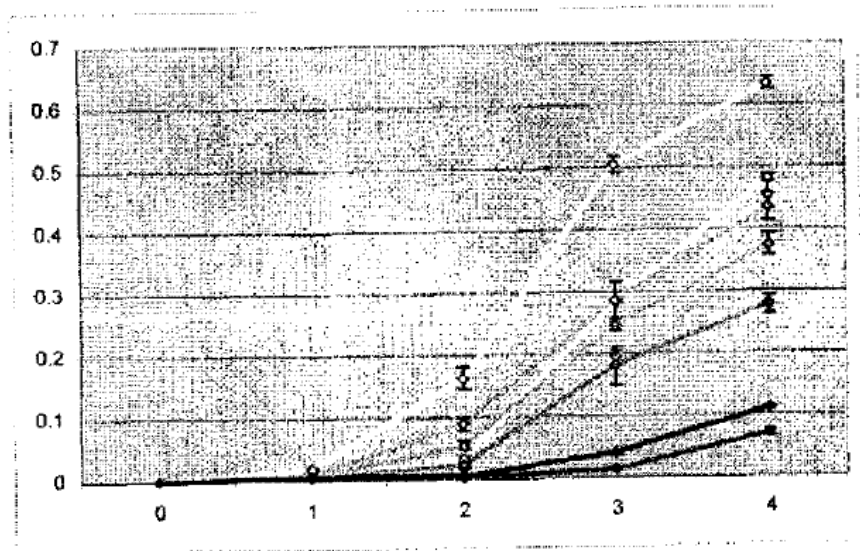


FIGURA 18

V2098A

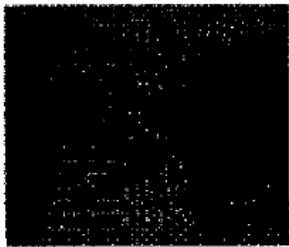
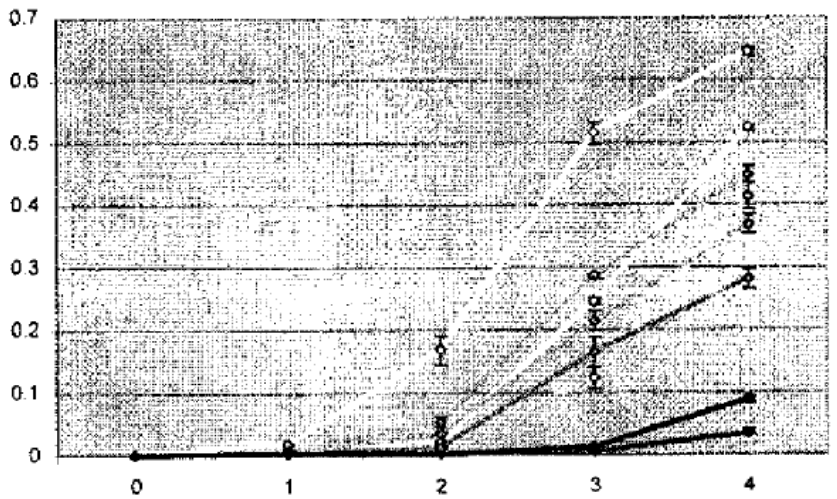


FIGURA 19

W1999G

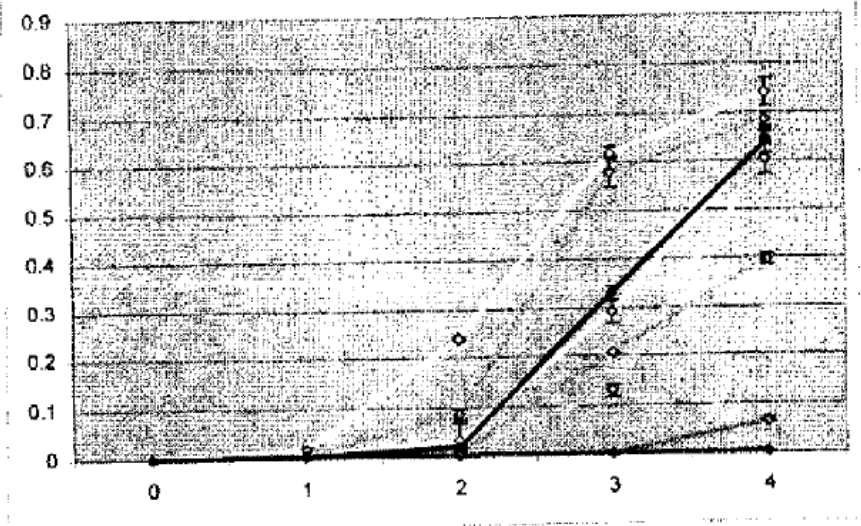


FIGURA 20

I1781L

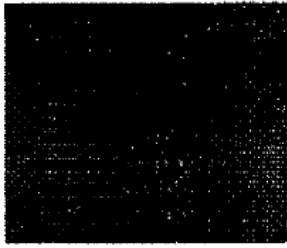
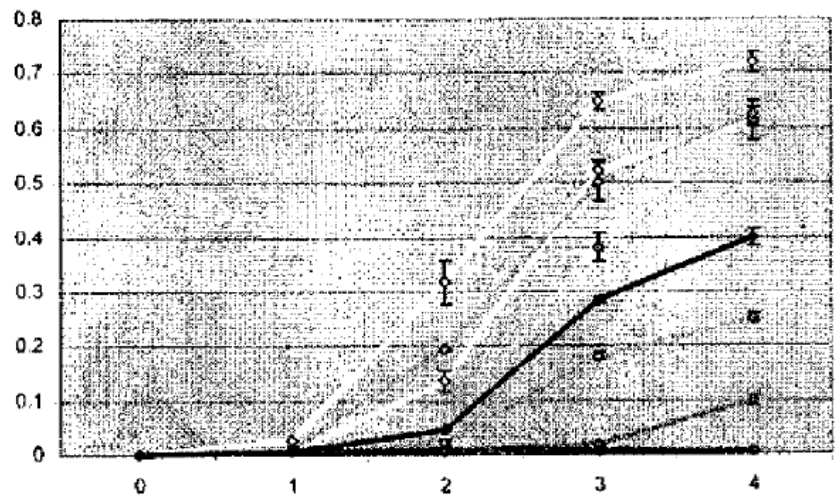


FIGURA 21

I1781L

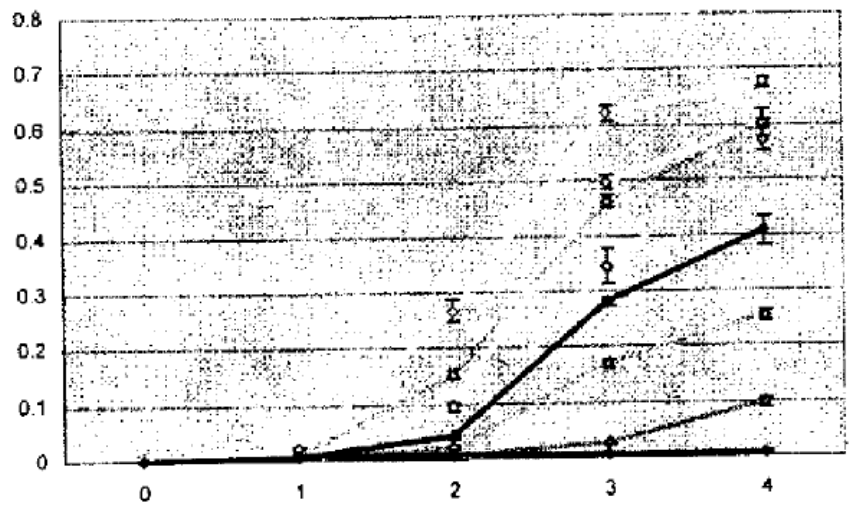


FIGURA 22

I1781L

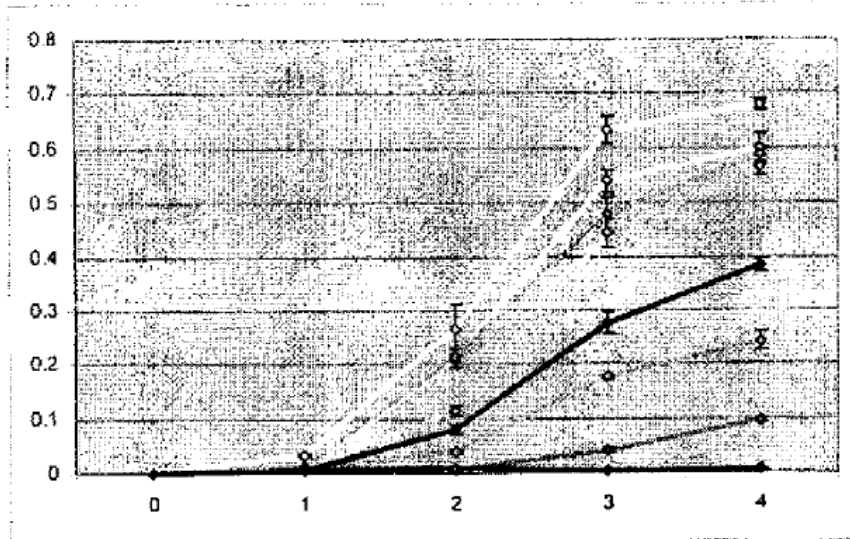


FIGURA 23
V2075L

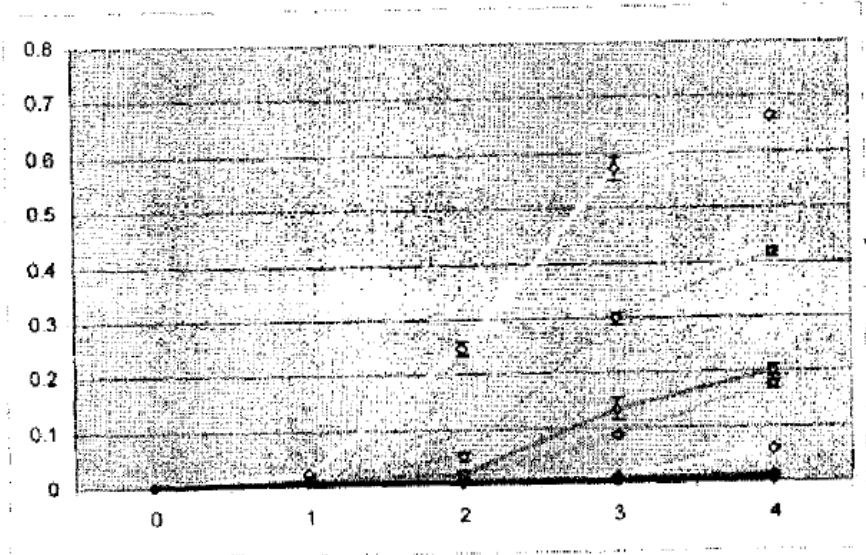


FIGURA 24
D2078G

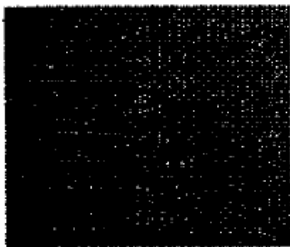
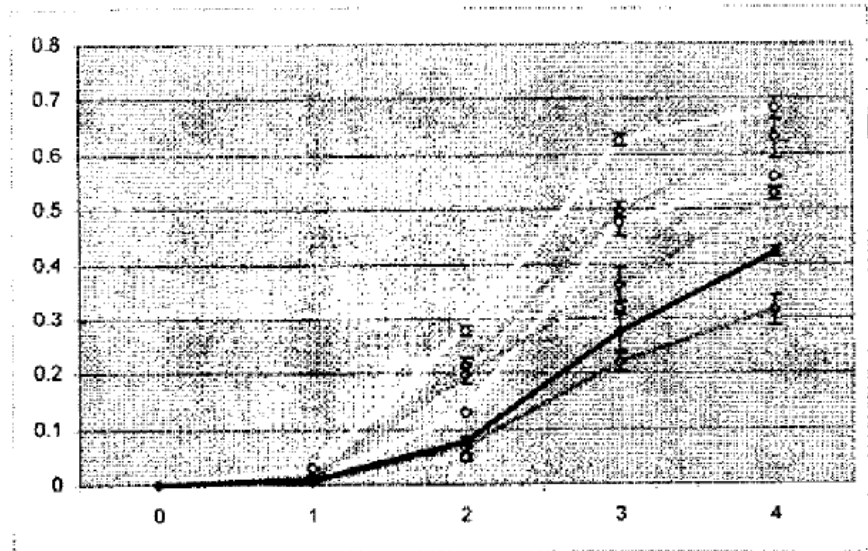


FIGURA 25

C2088R

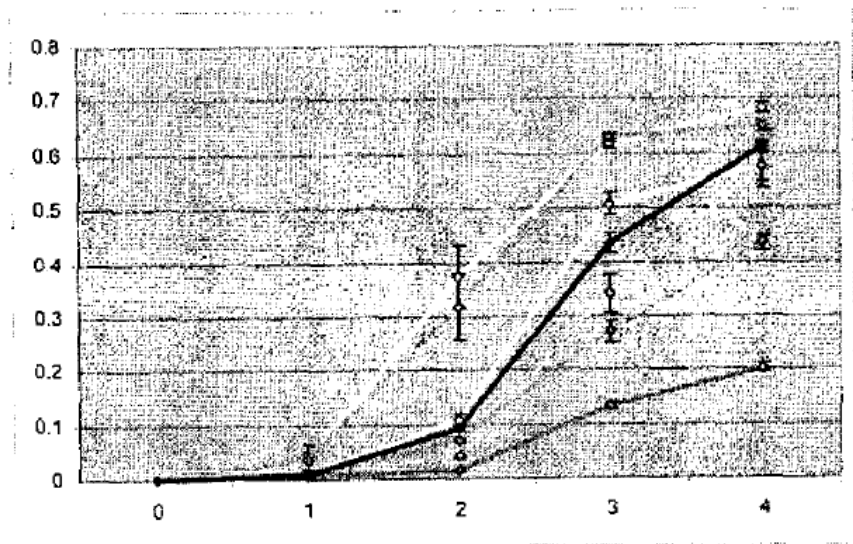


FIGURA 26
G2096A

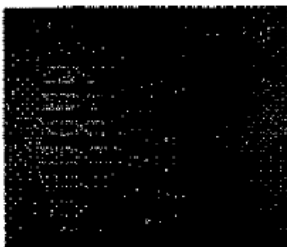
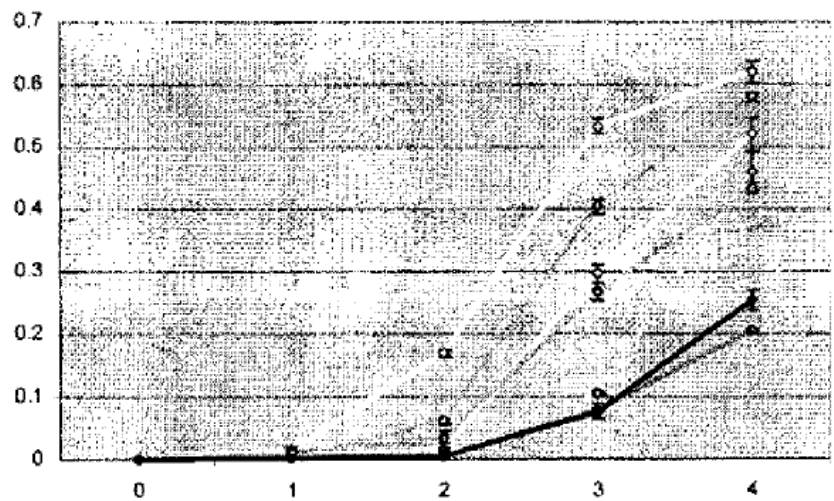


FIGURA 27

G2096S

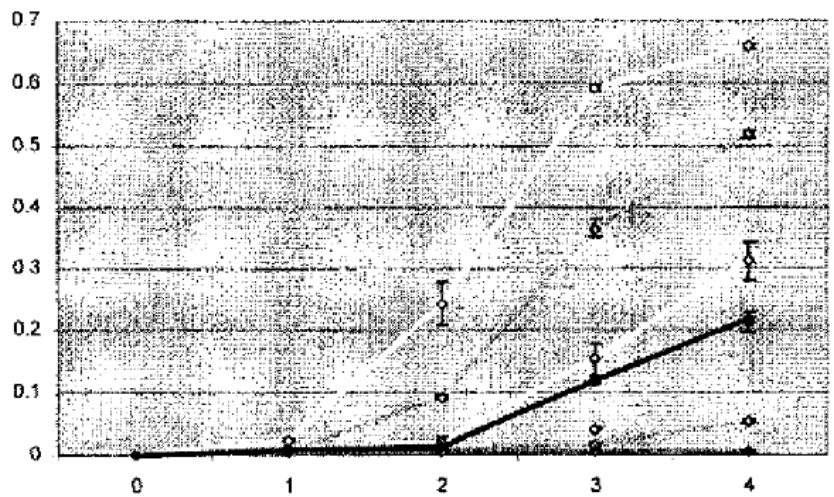


FIGURA 28

I1811N

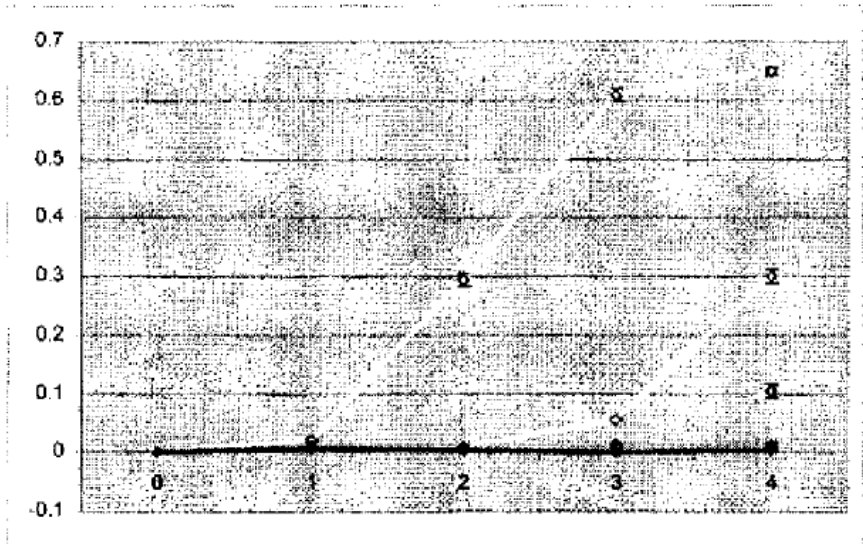


FIGURA 29
A1786P

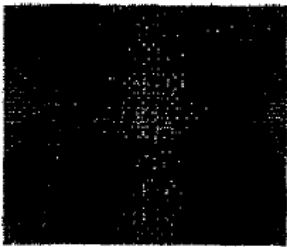
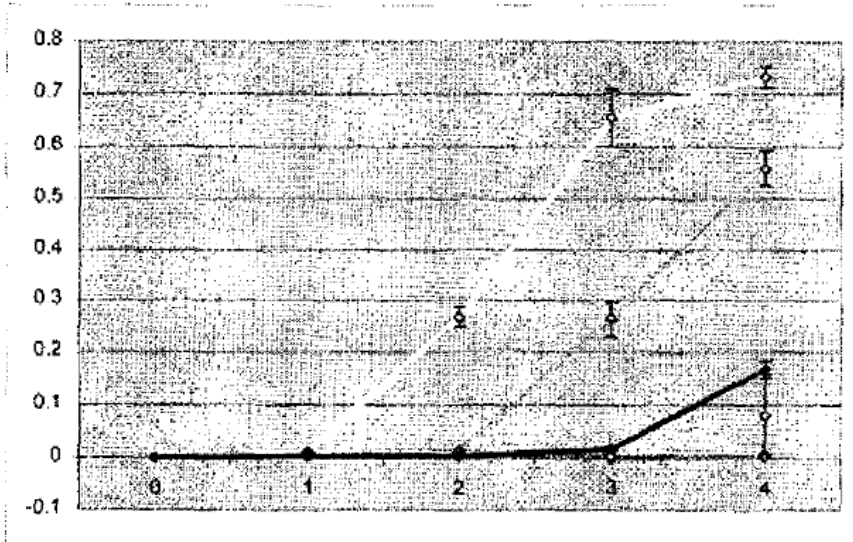


FIGURA 30
I1781V

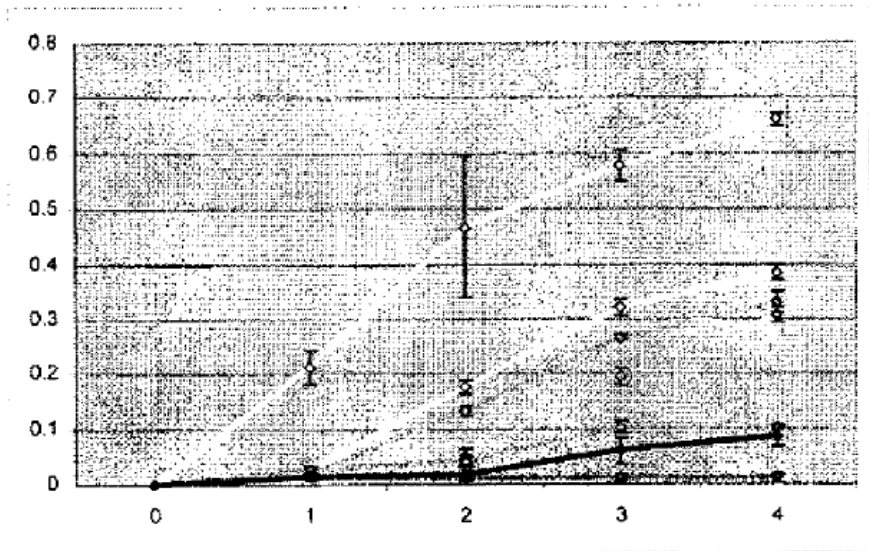


FIGURA 31
D2078T

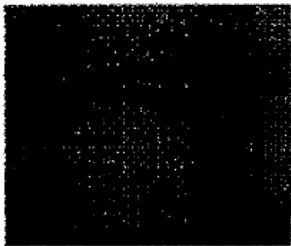
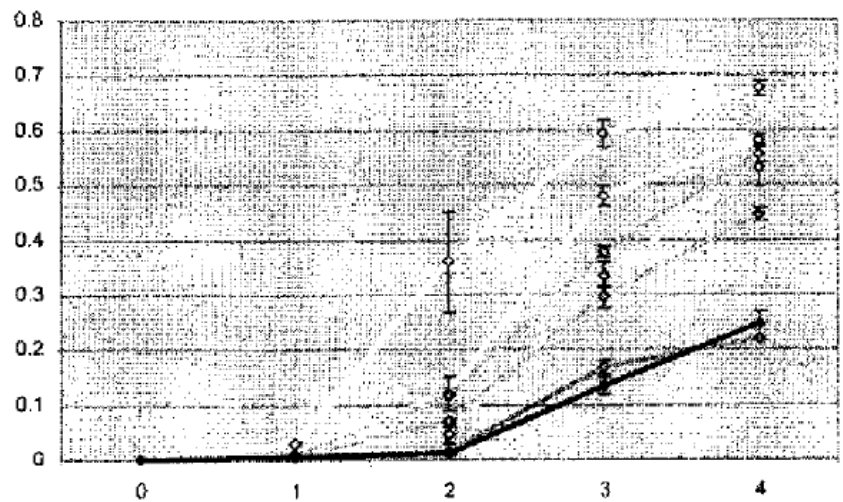


FIGURA 32

V2098H

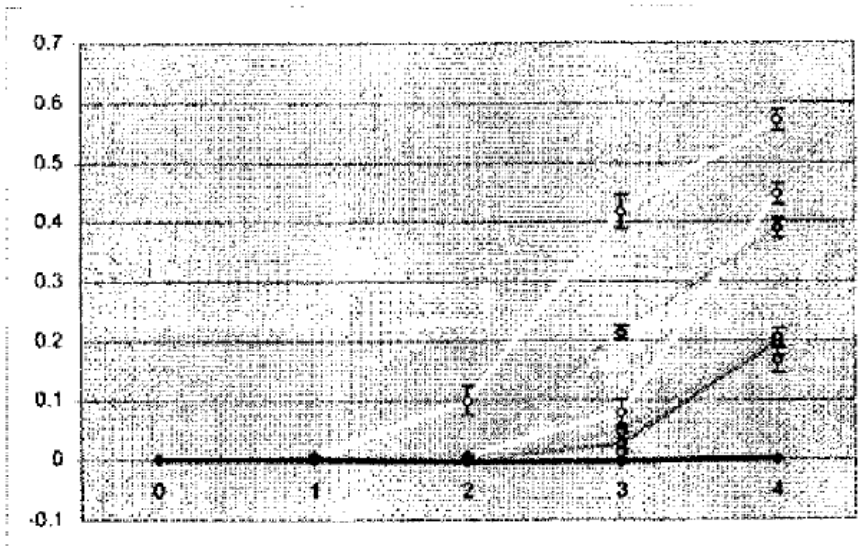


FIGURA 33

W2074L

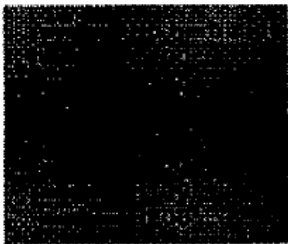
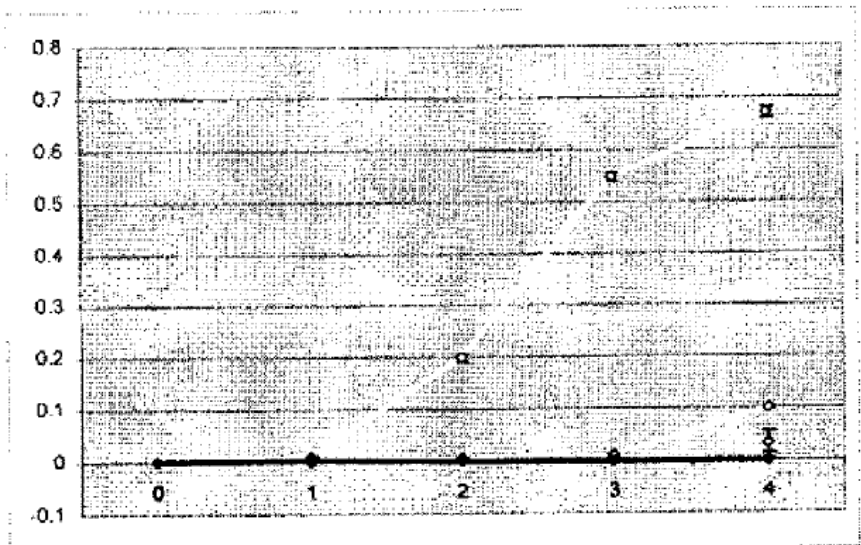


FIGURA 34

I1781T

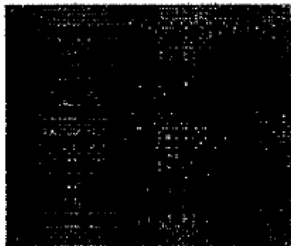
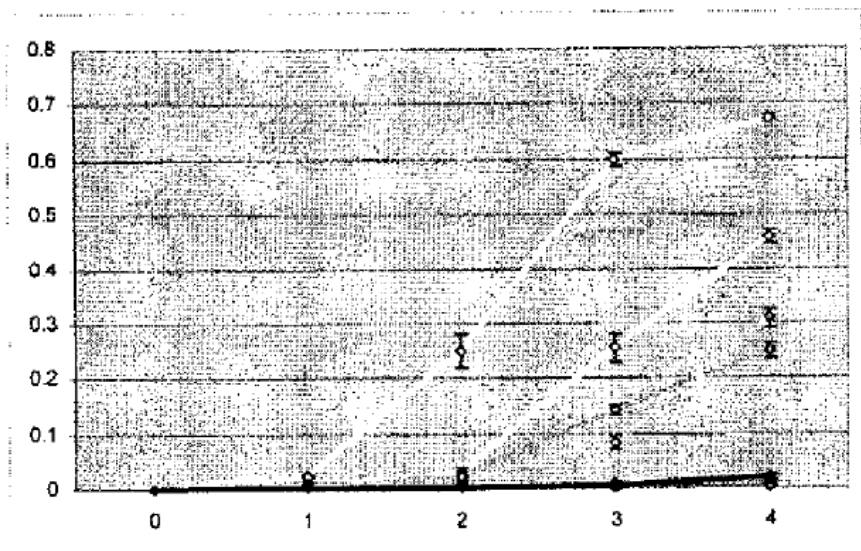


FIGURA 35

C2088W

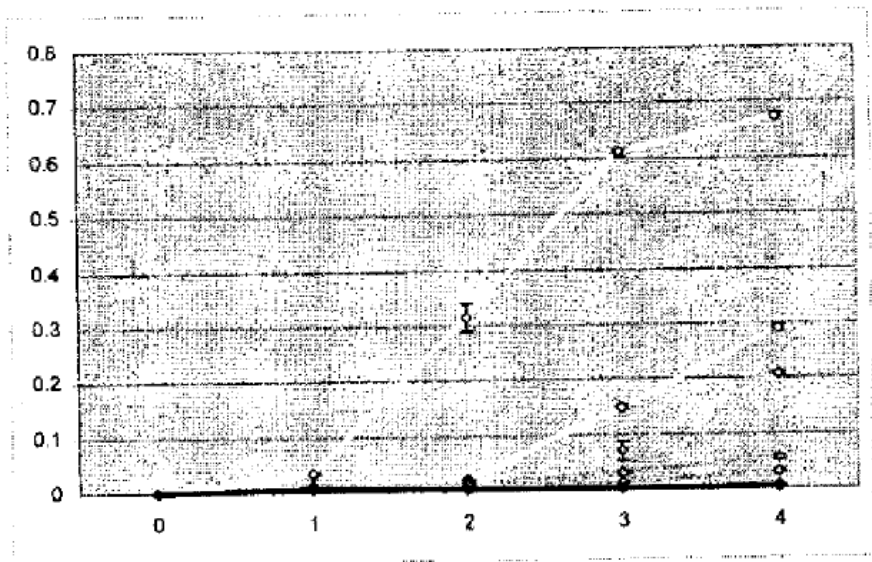


FIGURA 36

$\Delta K2080\Delta I2081$

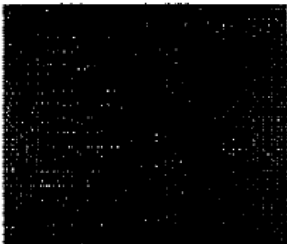
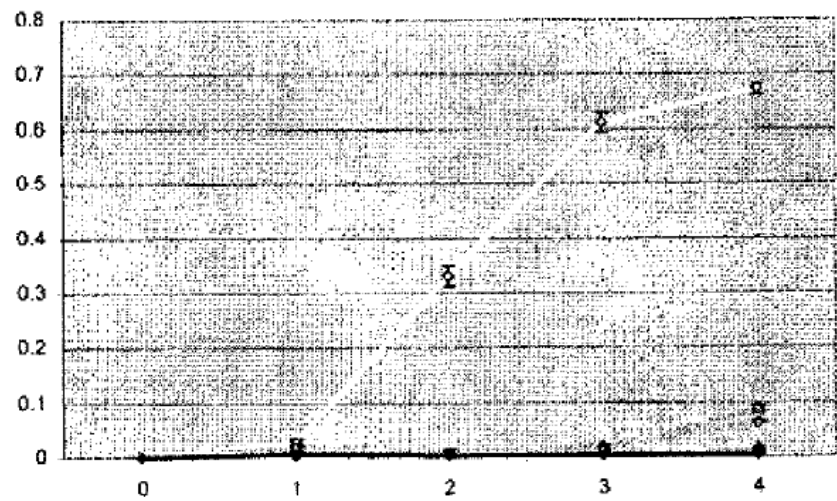


FIGURA 37

A1785G

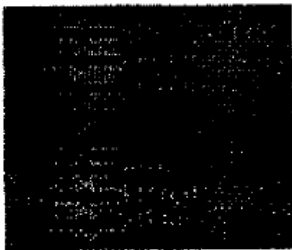
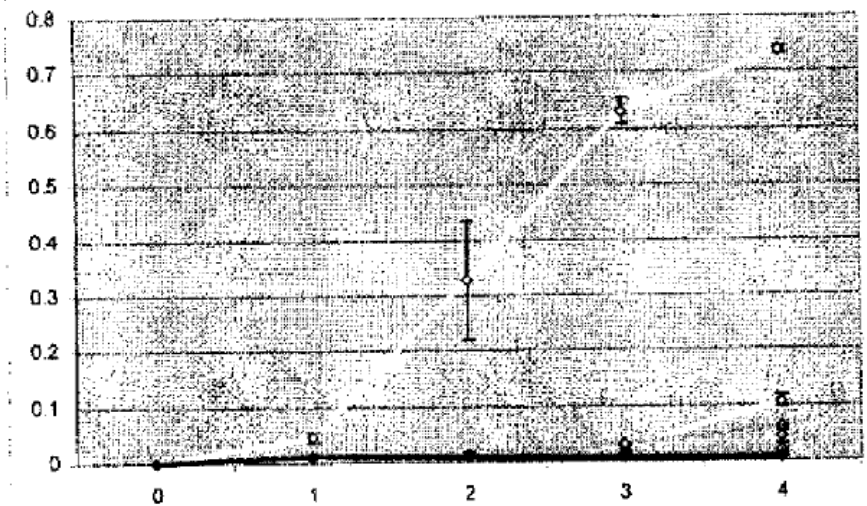


FIGURA 38

V2075I

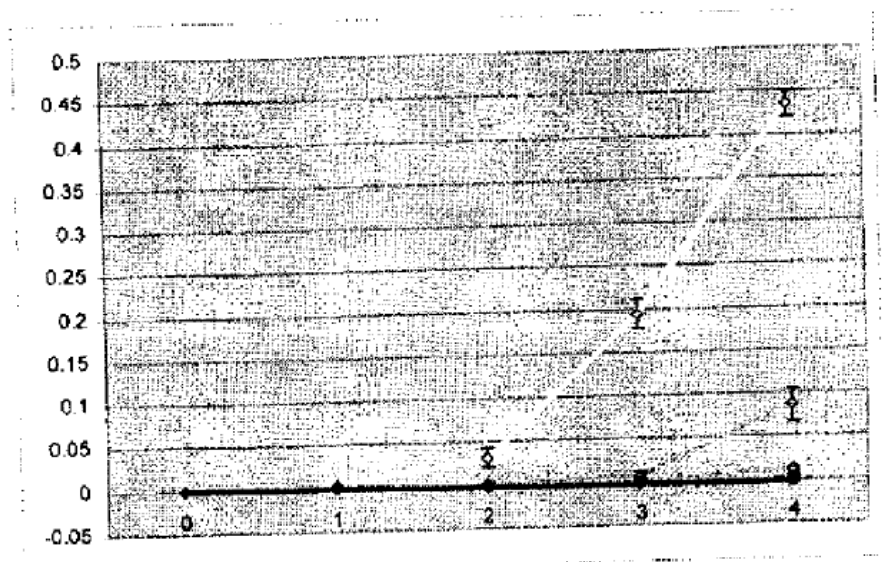


FIGURA 39

V2075M

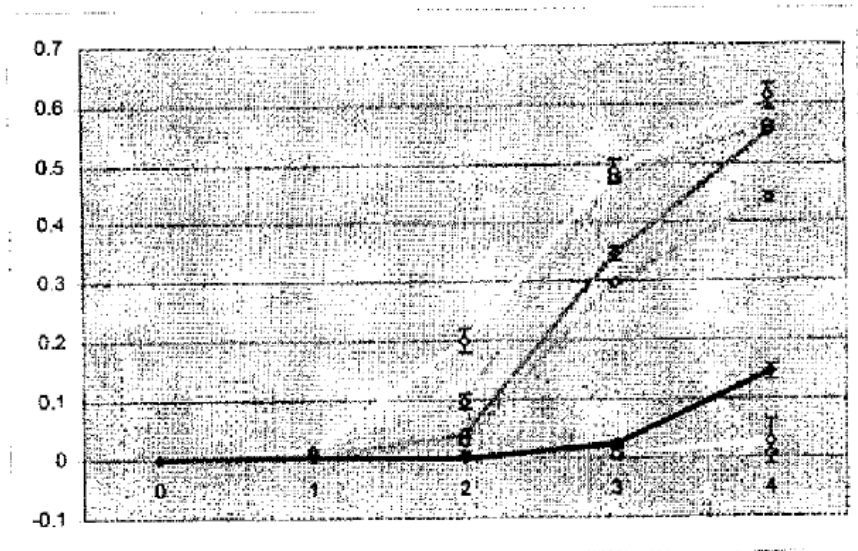


FIGURA 40

V2098S

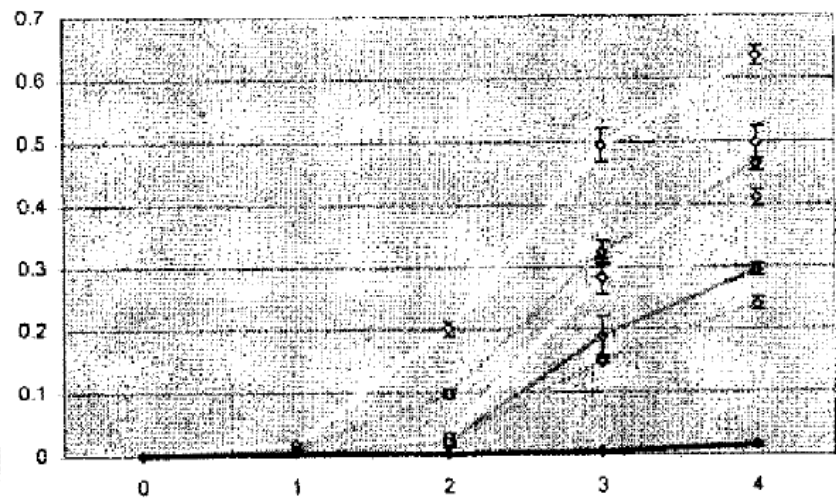


FIGURA 41

V2098G

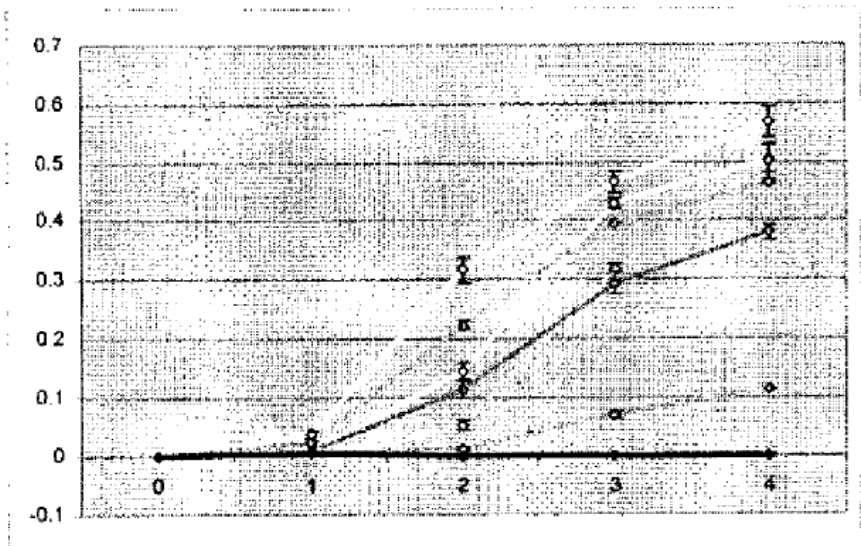


FIGURA 42

V2098P

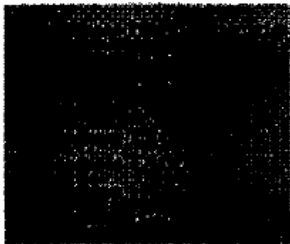
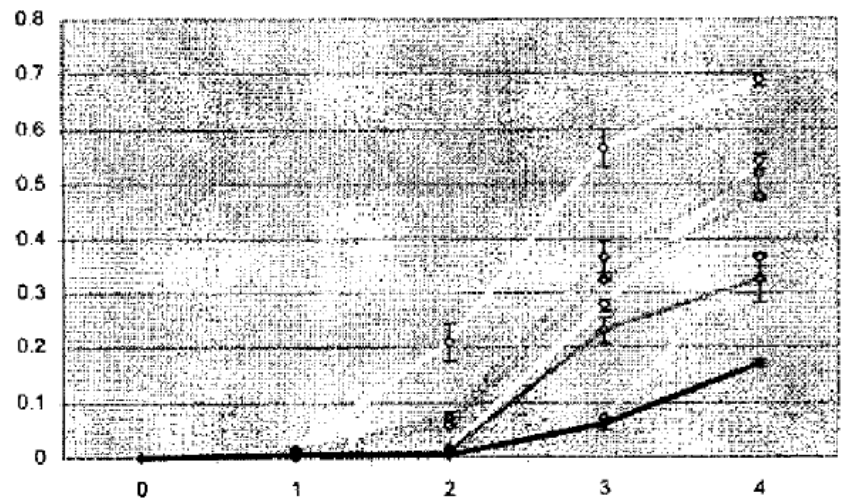


FIGURA 43

V2049F

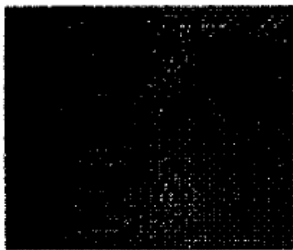
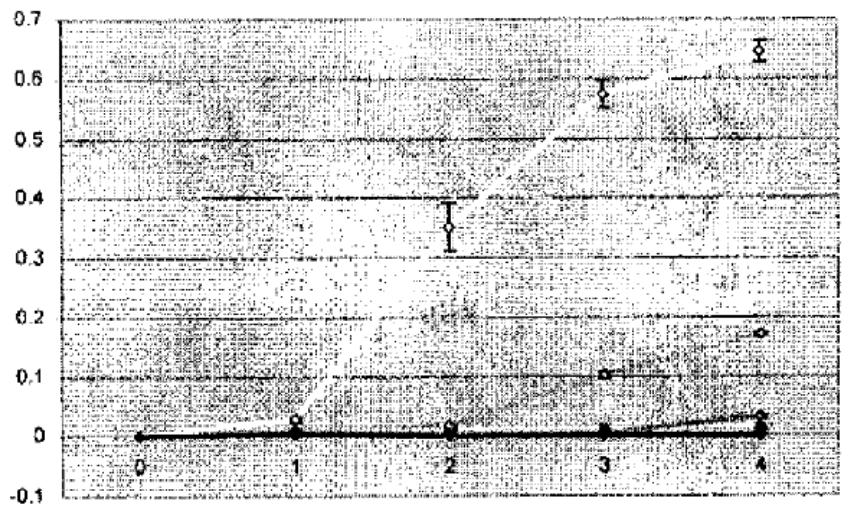


FIGURA 44

G1783C

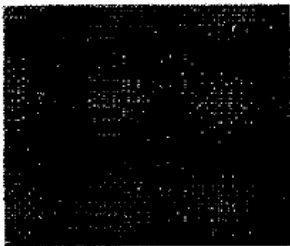
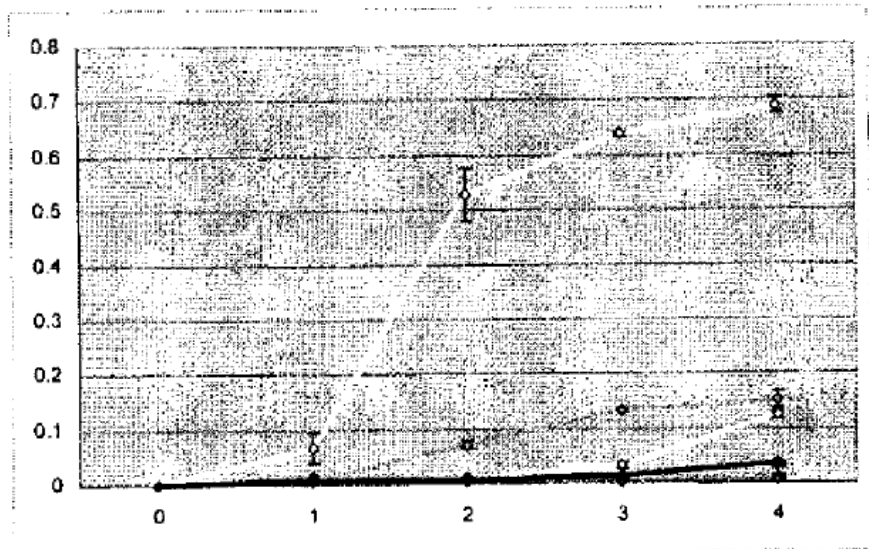


FIGURA 45

V2075G

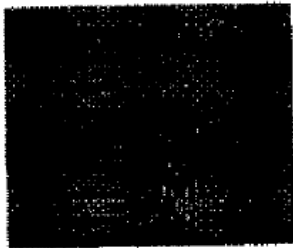
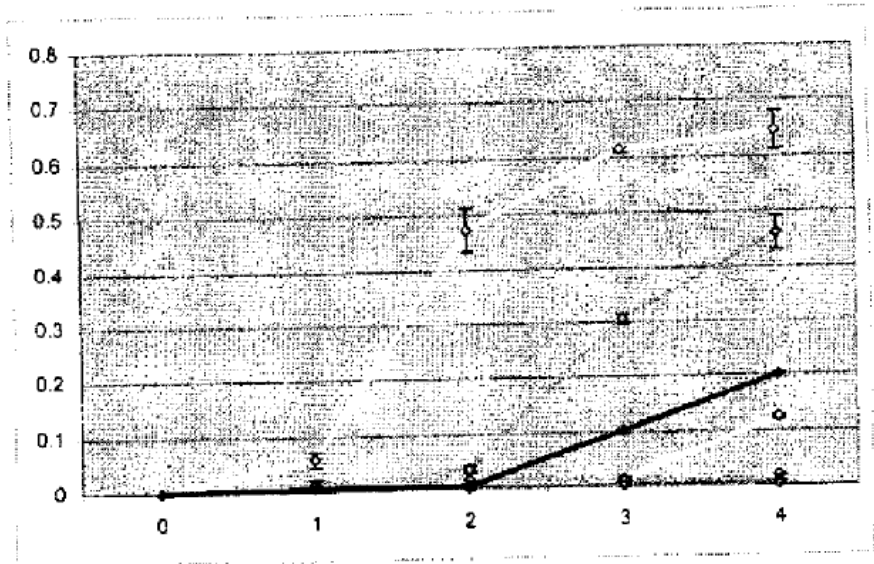


FIGURA 46

Q1824P D2078G

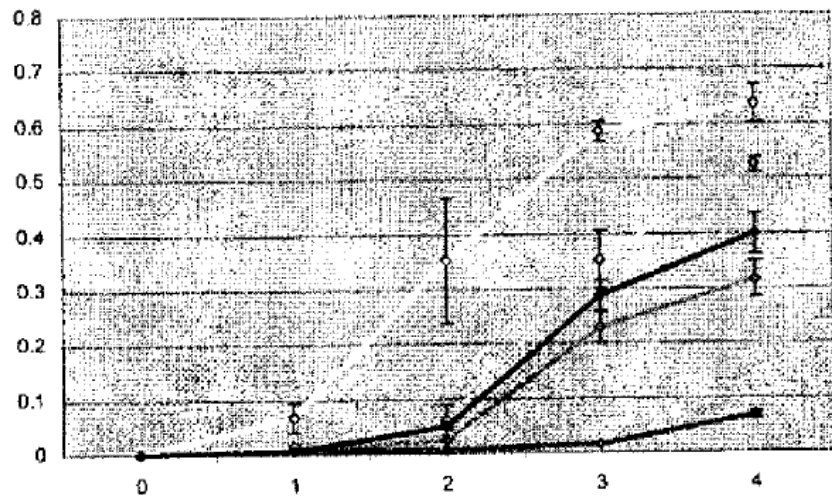


FIGURA 47

I1781L Q1824P

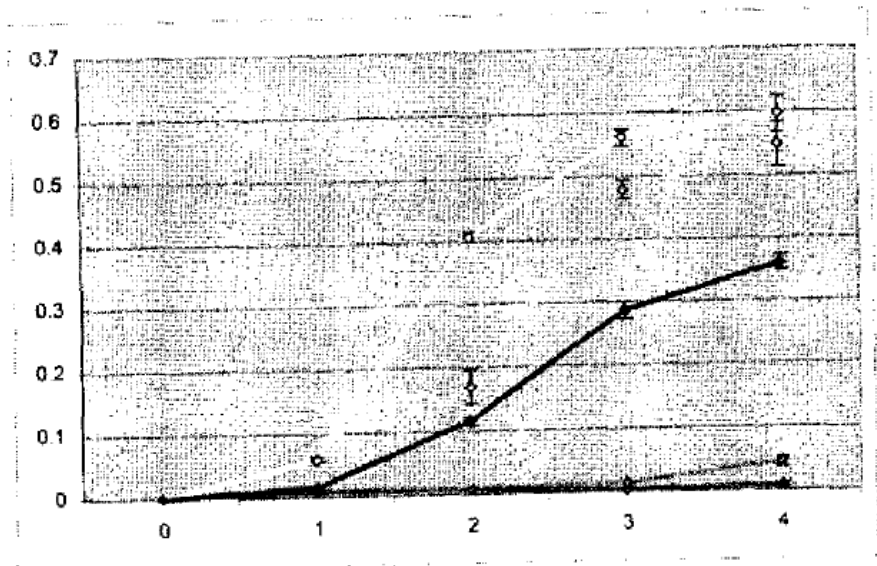


FIGURA 48

I1781L W2027R

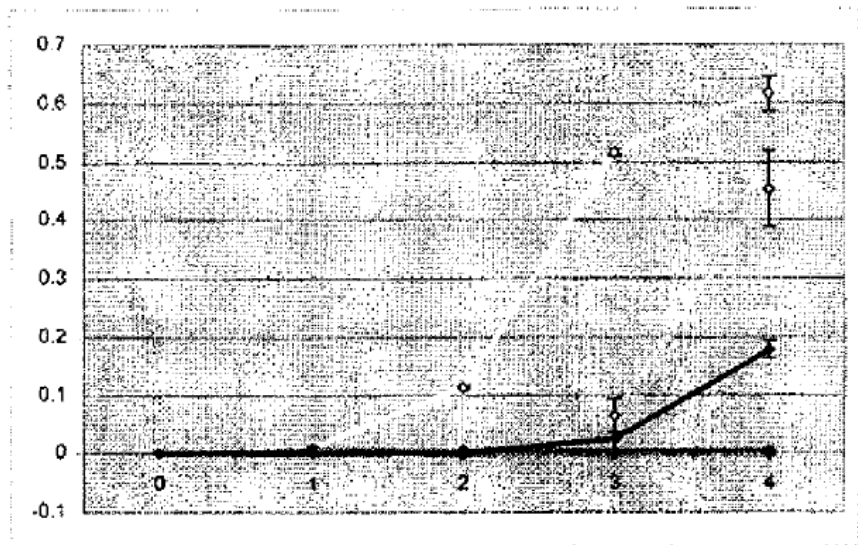


FIGURA 49

D2078G S2079P

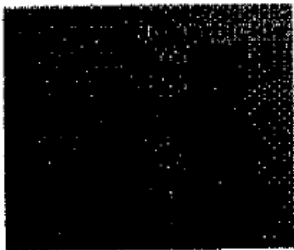
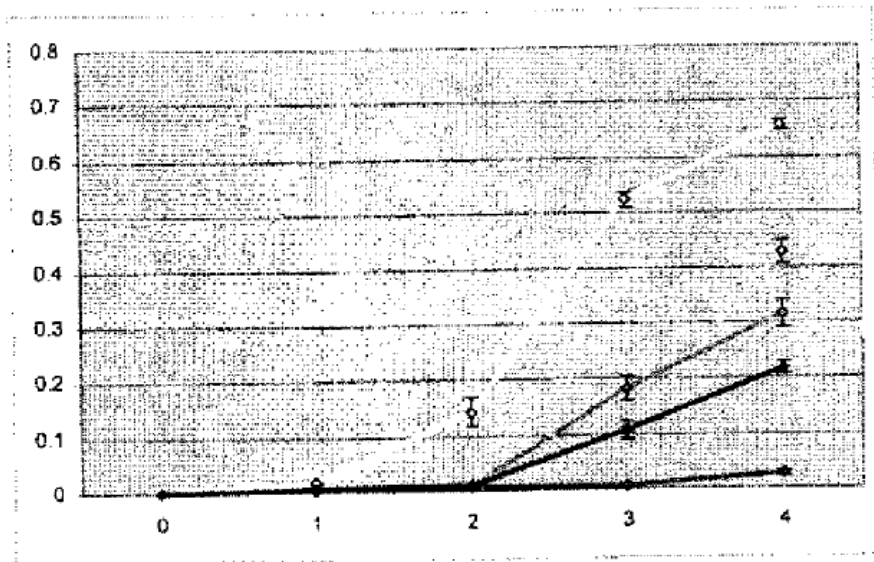


FIGURA 50

D2078G S2079F

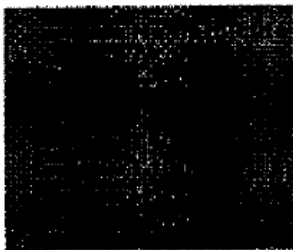
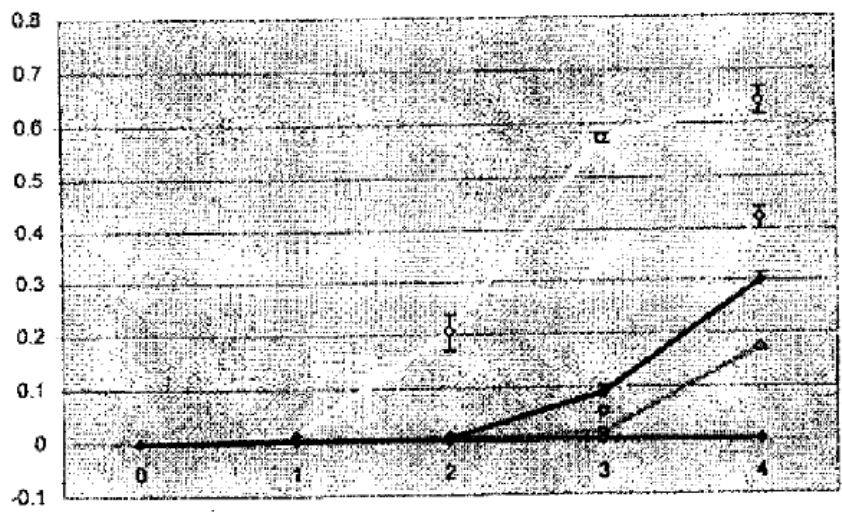


FIGURA 51

E2039G D2078G

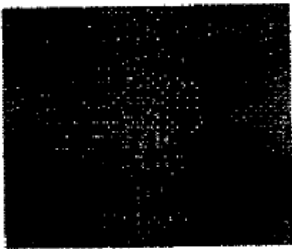
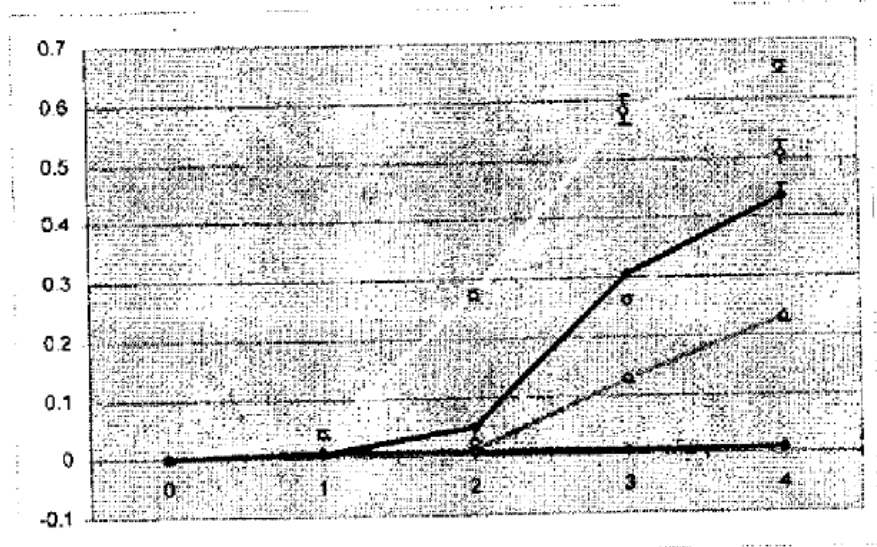


FIGURA 52

C2088K V2098A

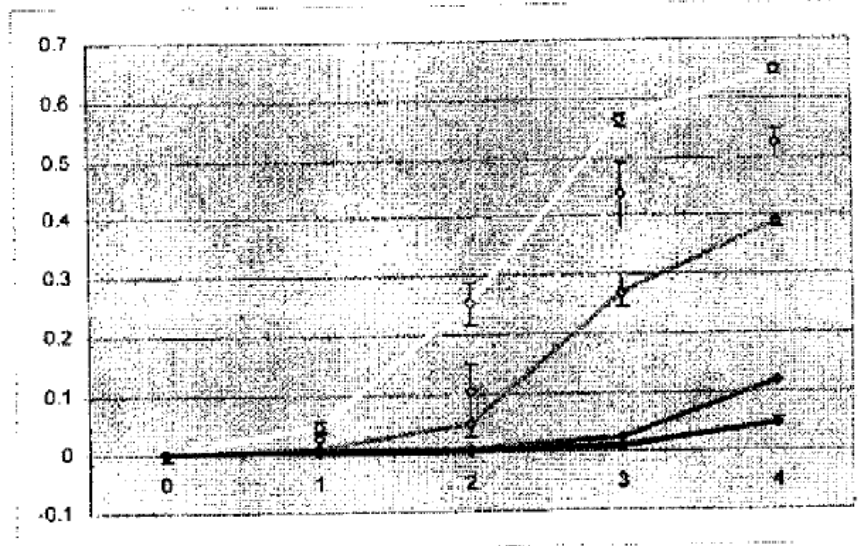


FIGURA 53

C2088L V2098G

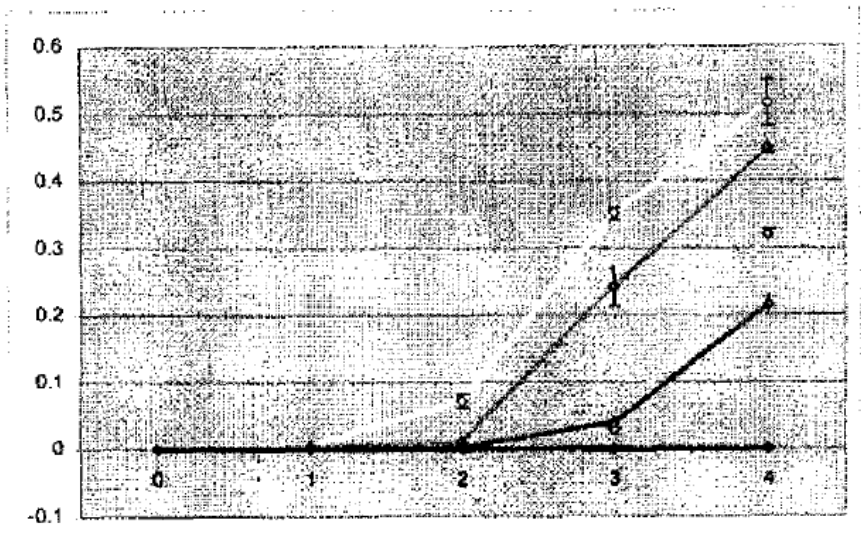


FIGURA 54

C2088S V2098G

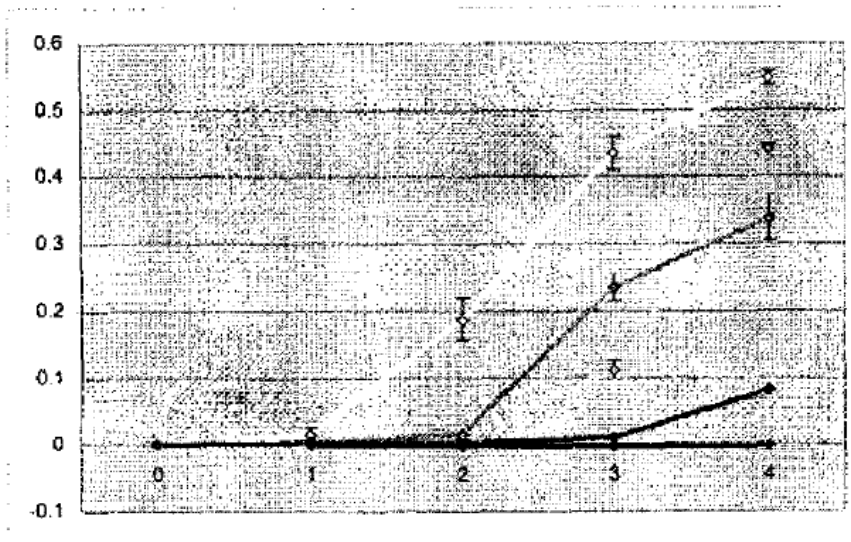


FIGURA 55

C2088L V2098A

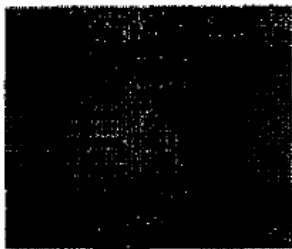
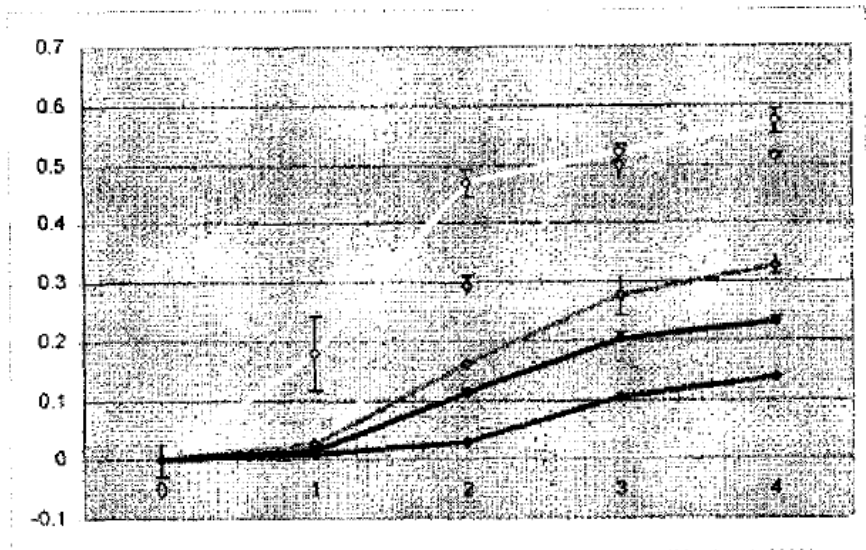


FIGURA 56

C2088V V2098G

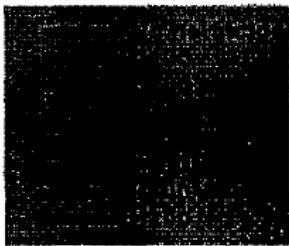
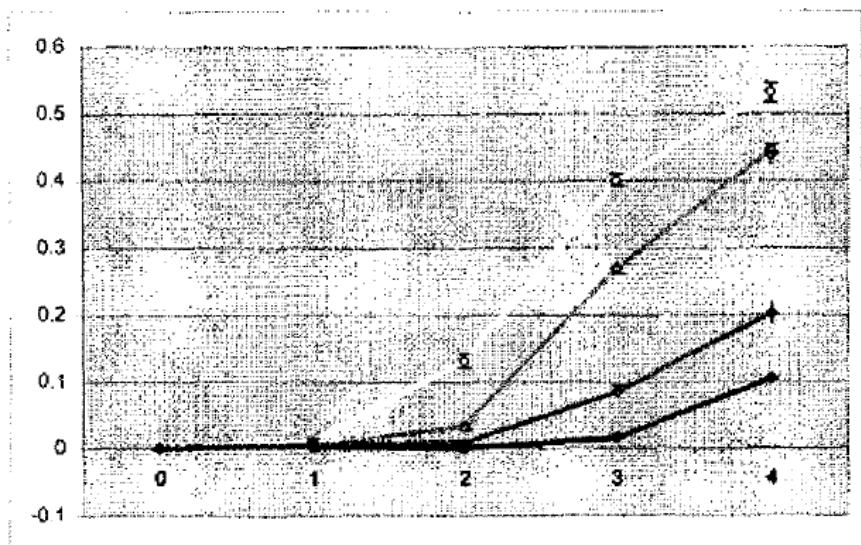


FIGURA 57

C2088H V2098A

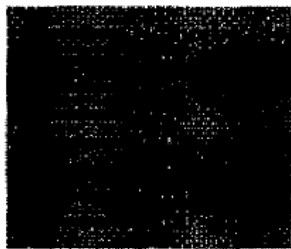
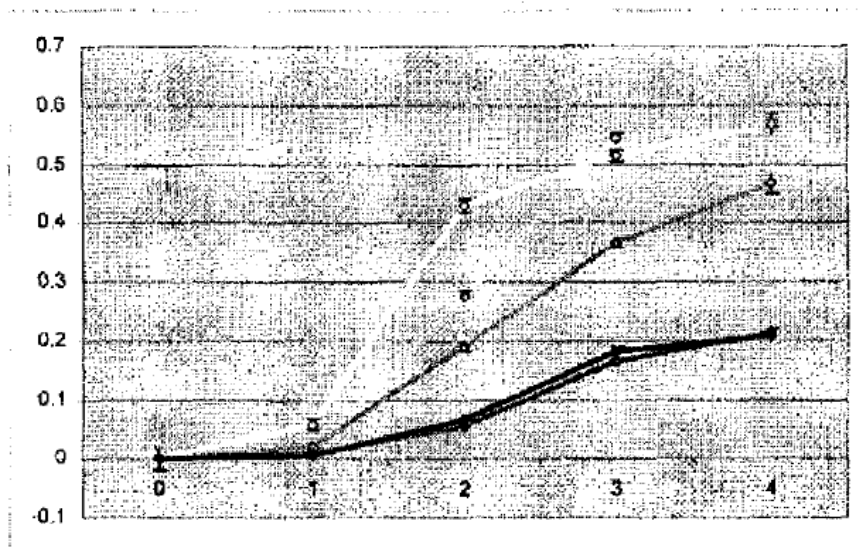


FIGURA 58

C2088G V2098G

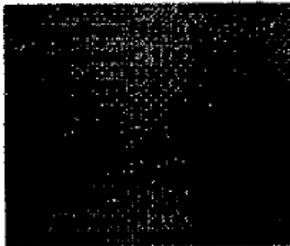
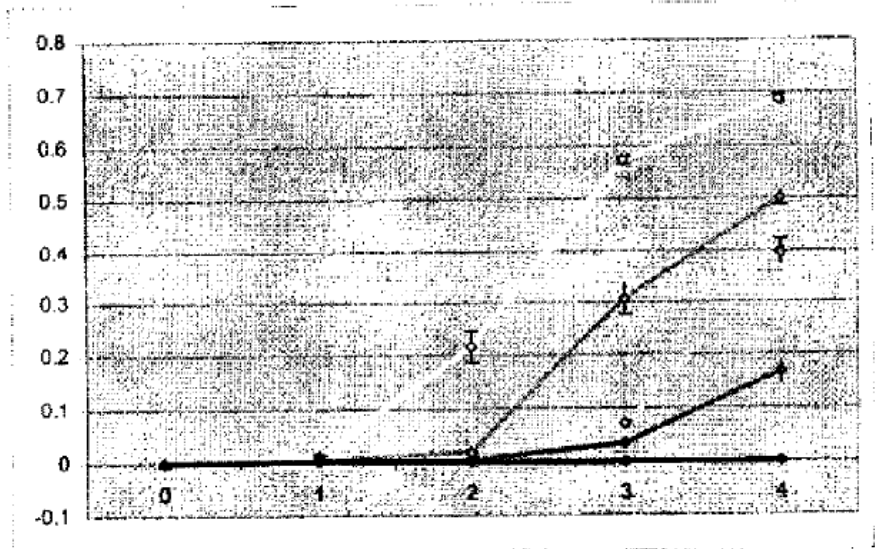


FIGURA 59

C2088T V2098G

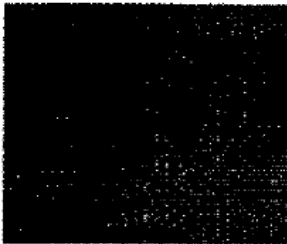
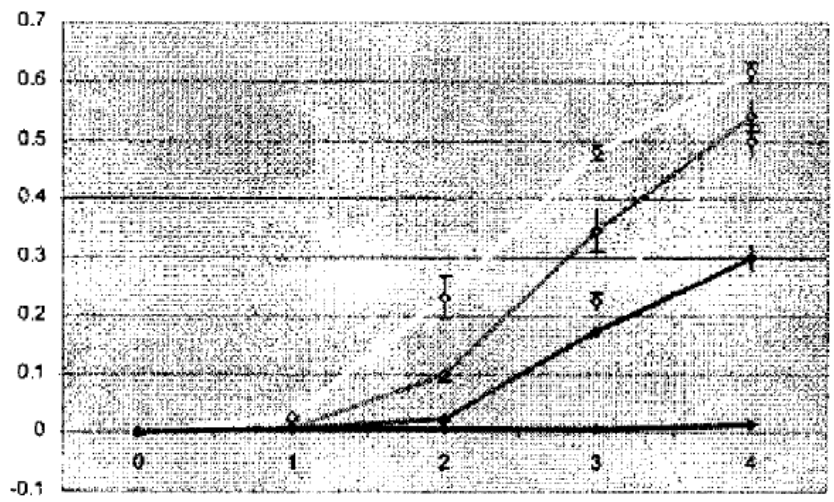


FIGURA 60

V2049T D2078G

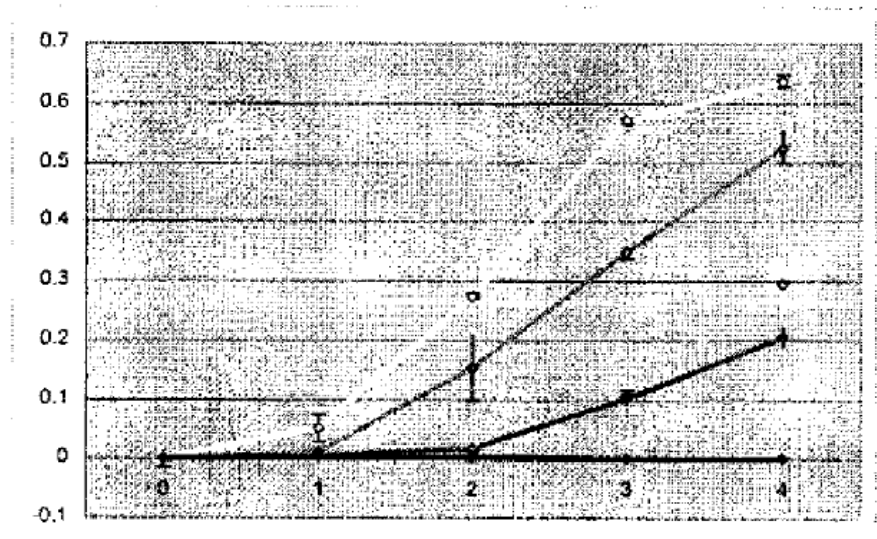


FIGURA 61

V2049L V2098A

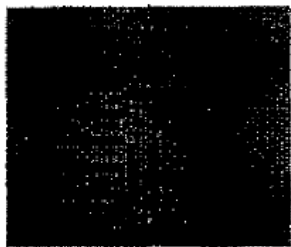
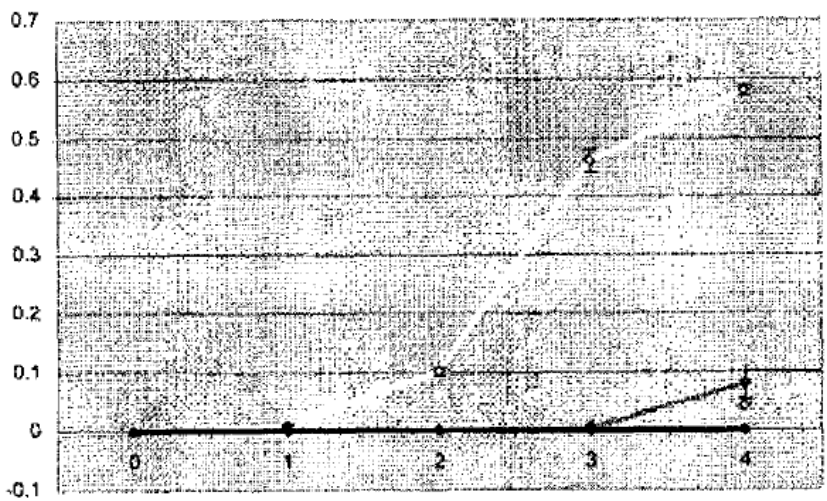


FIGURA 62

V2075M K2080E

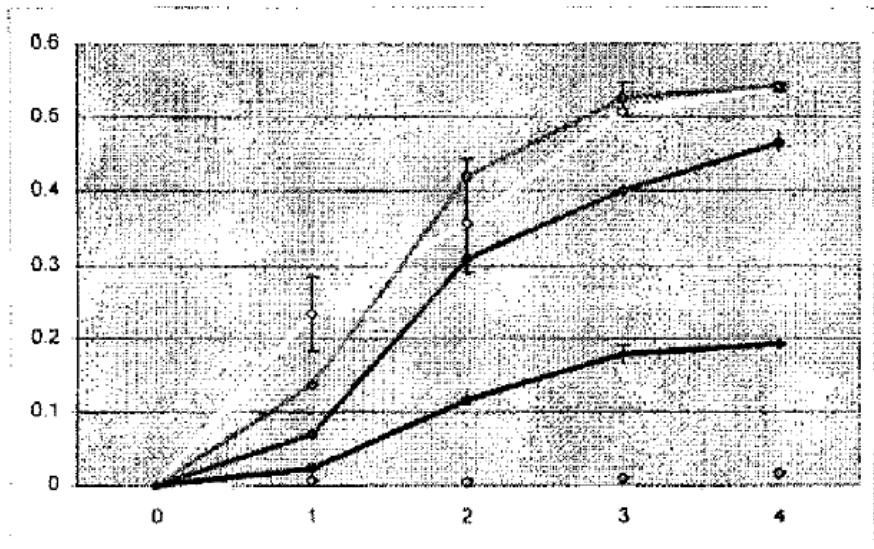


FIGURA 63

V2075M K2095E

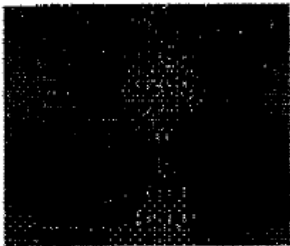
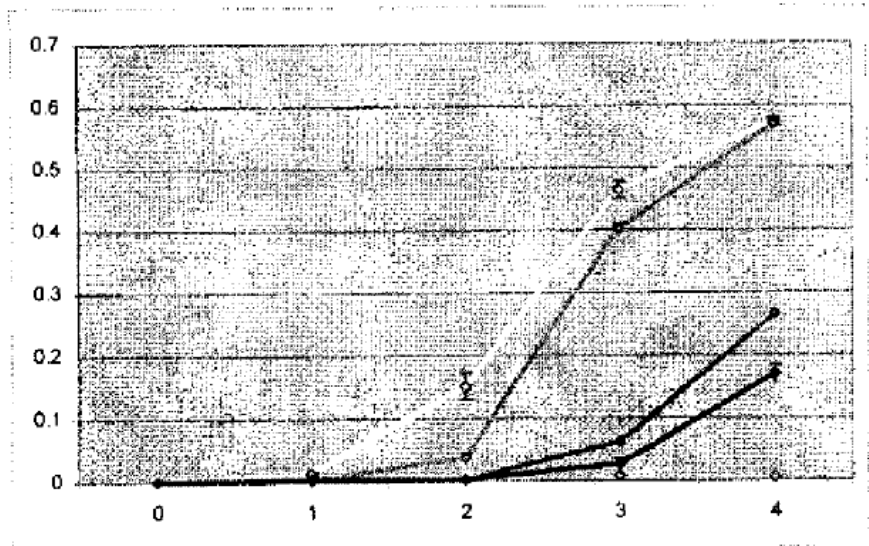


FIGURA 64

D2078G C2088G

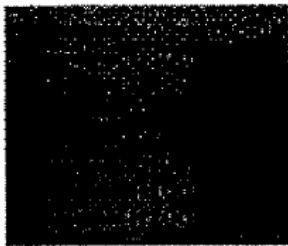
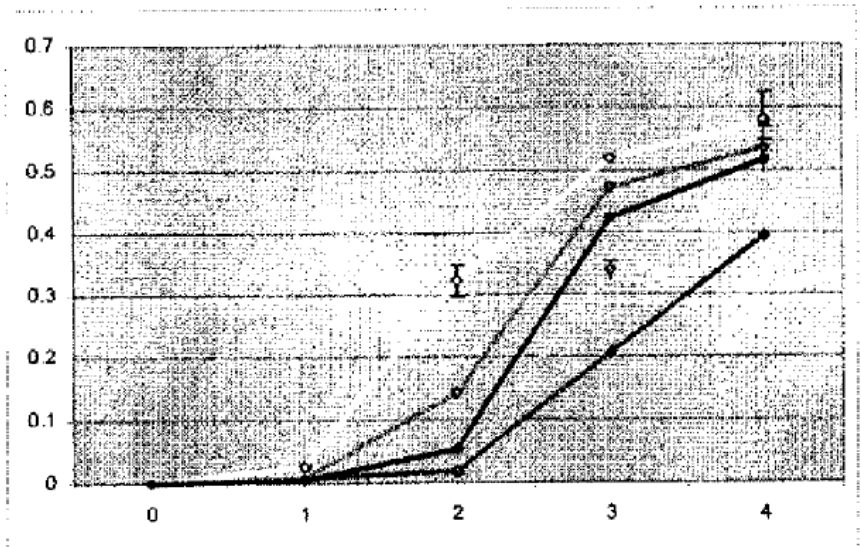


FIGURA 65

I2041V D2078G

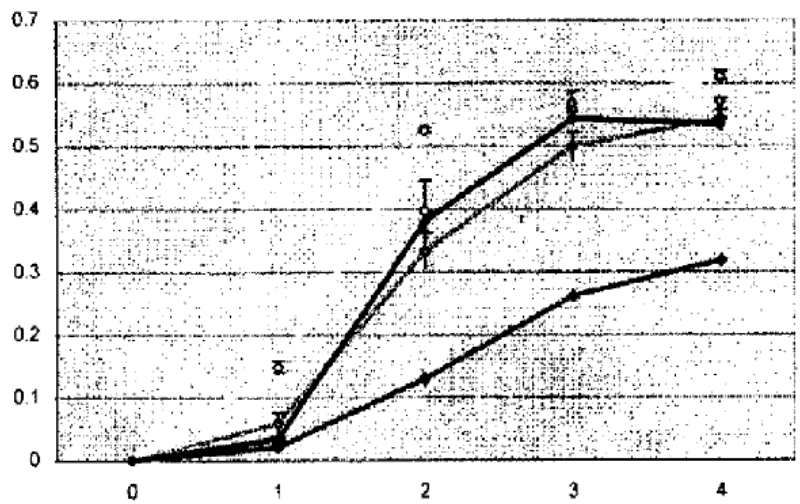


FIGURA 66

C2088W V2098C

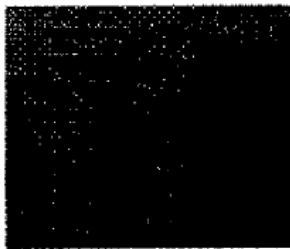
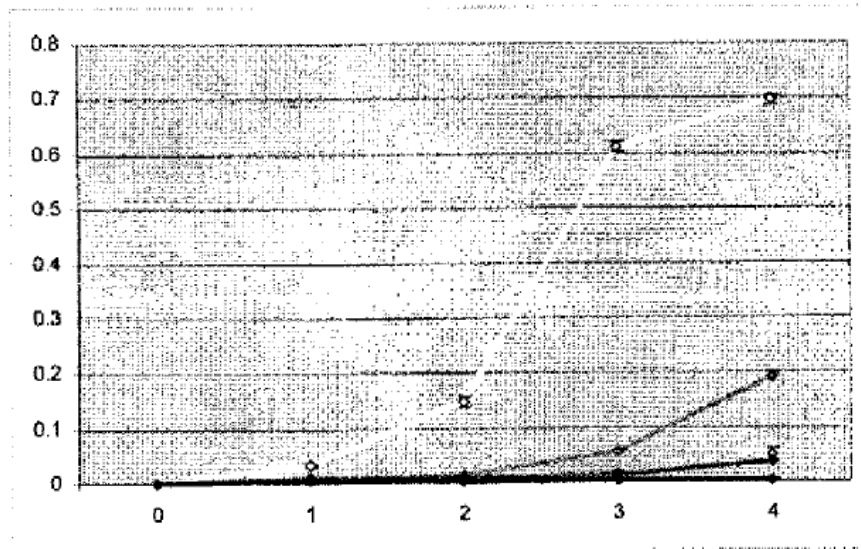


FIGURA 67

C2088H V2098G

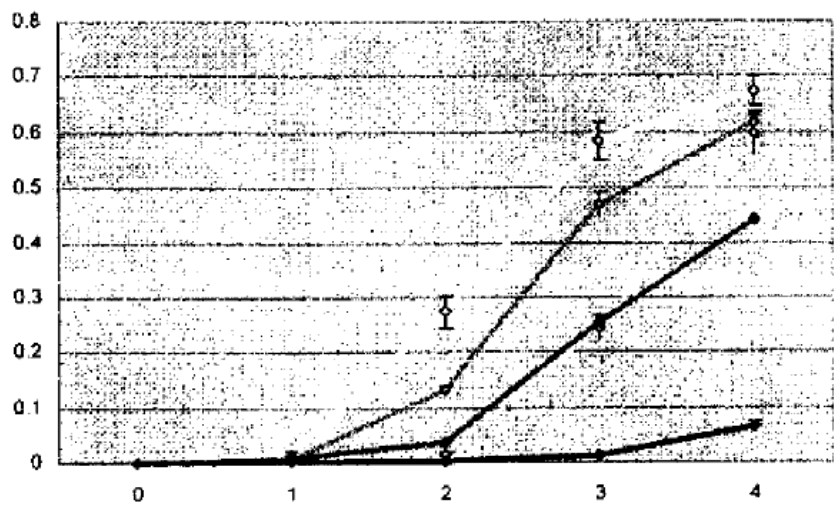


FIGURA 68

C2088F V2098A

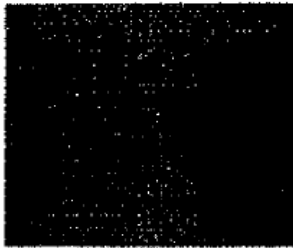
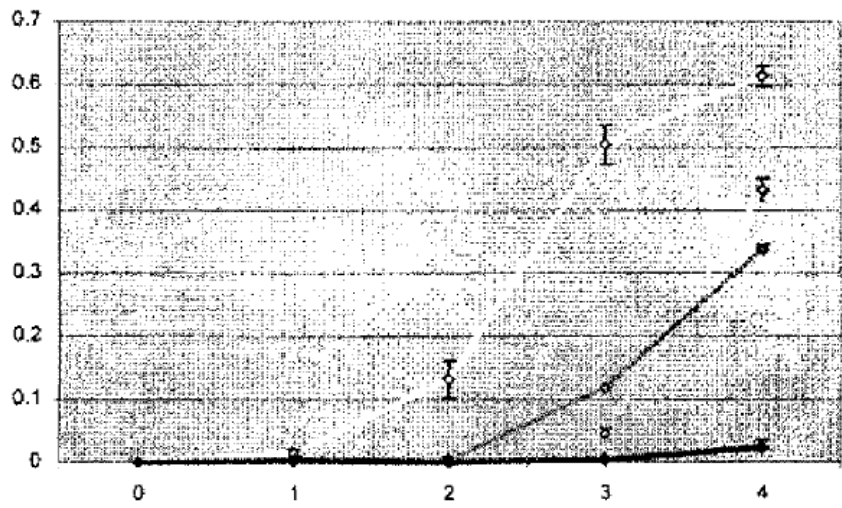


FIGURA 69

W1999G V2098A

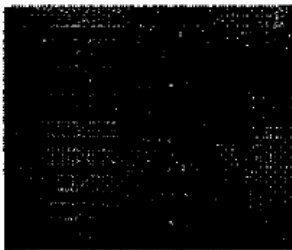
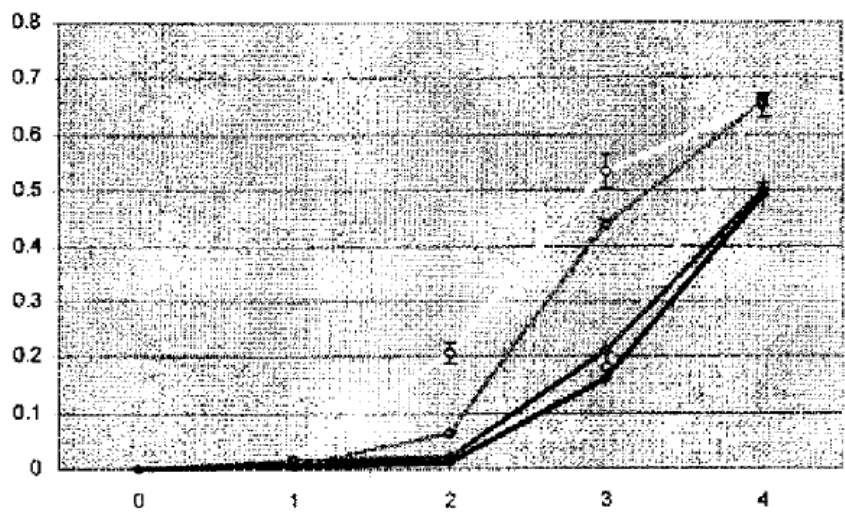


FIGURA 70

W1999G V2075L

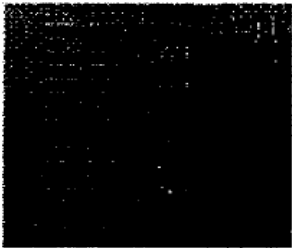
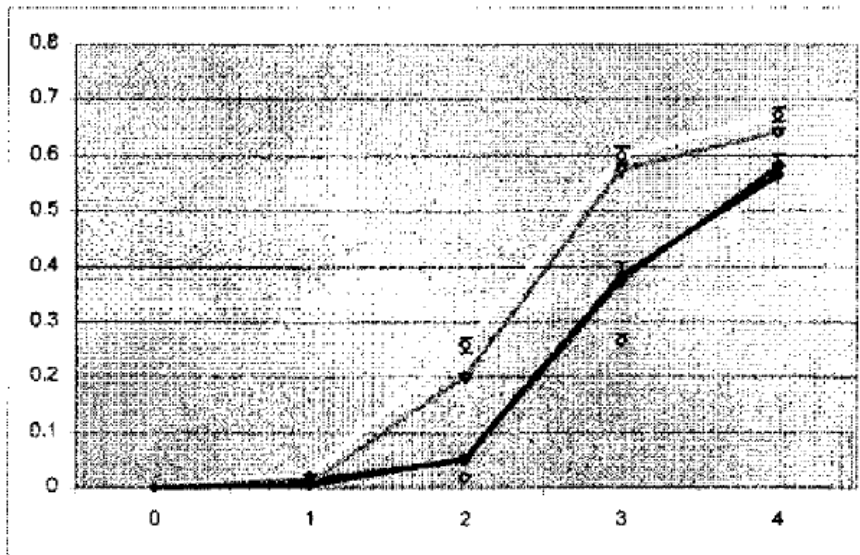


FIGURA 71

I1781L V2075L

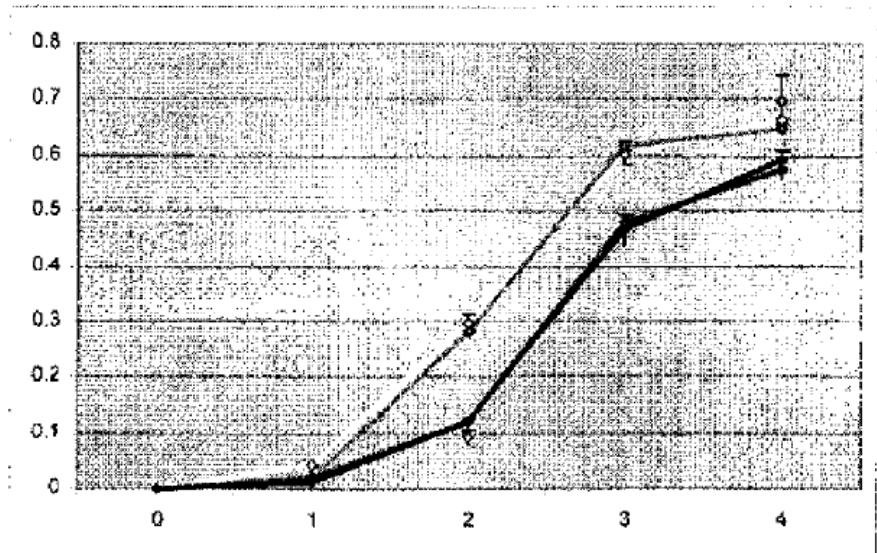


FIGURA 72

I1781L V2075L

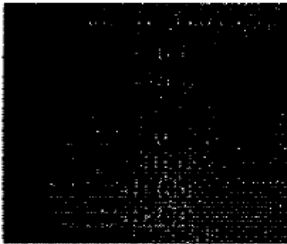
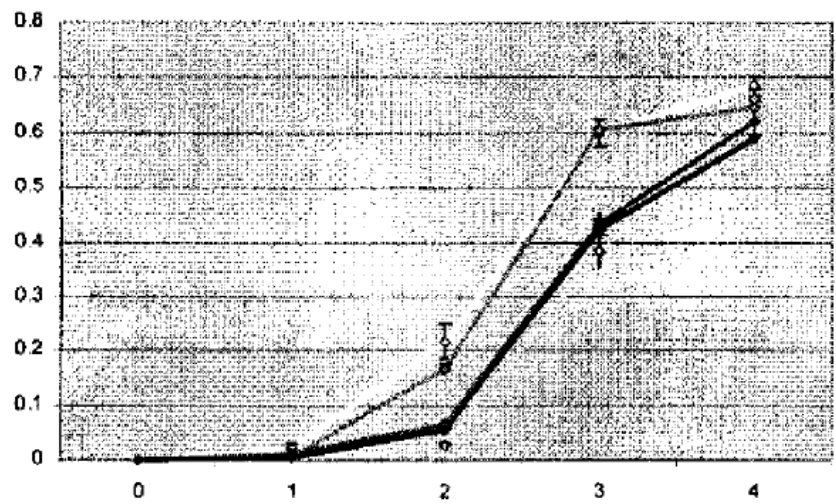


FIGURA 73

I1781L V2075L

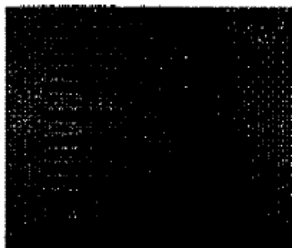
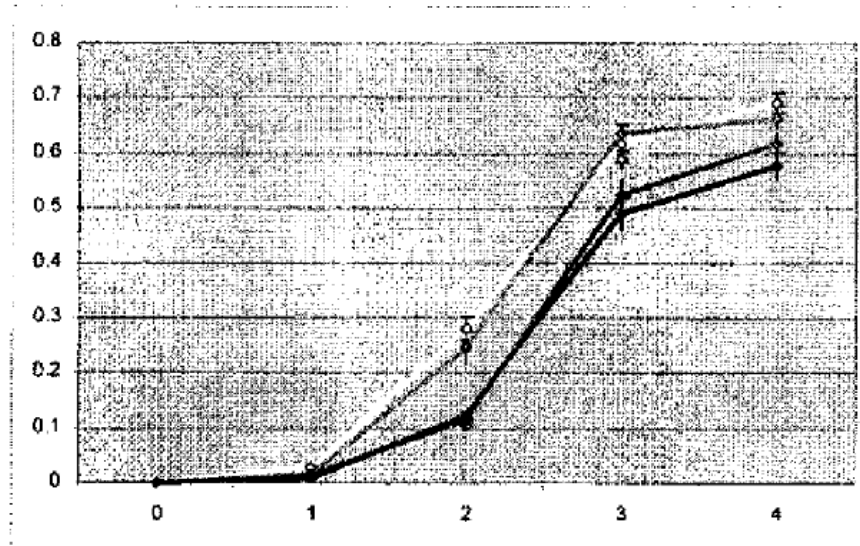


FIGURA 74

I1781L V2049F

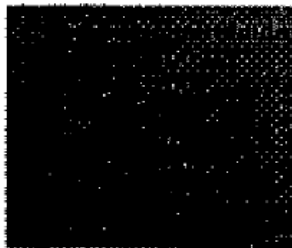
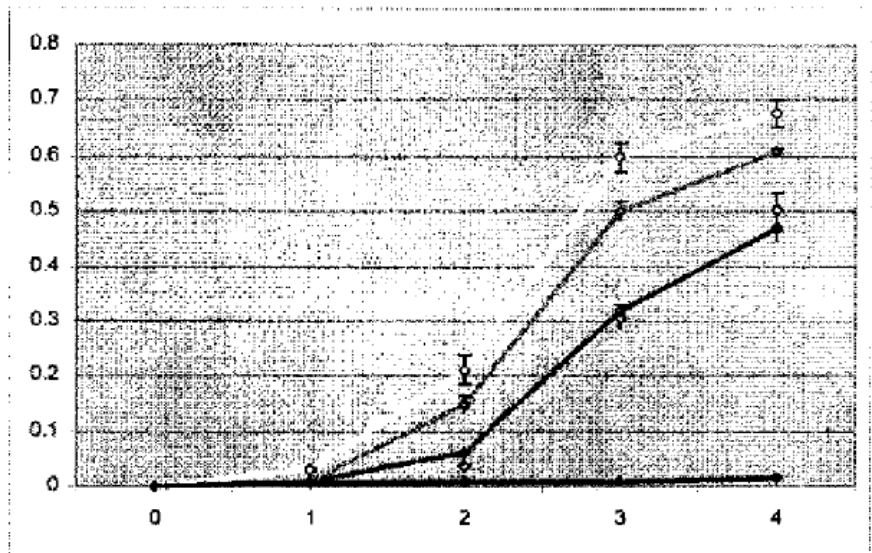


FIGURA 75

W1999G V2075I

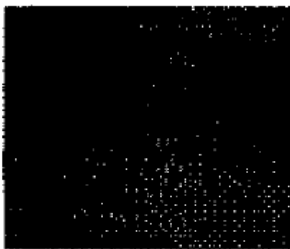
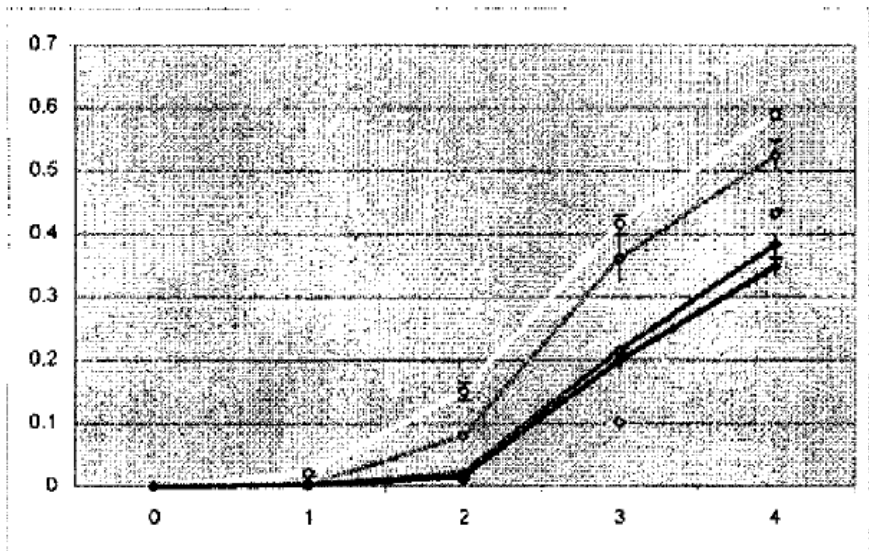


FIGURA 76

W1999G V2075L

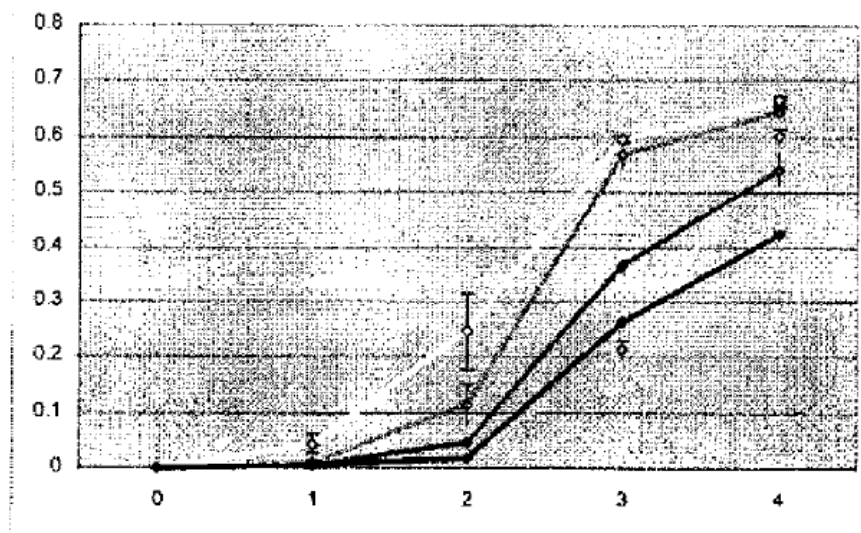


FIGURA 77

W1999G V2075L

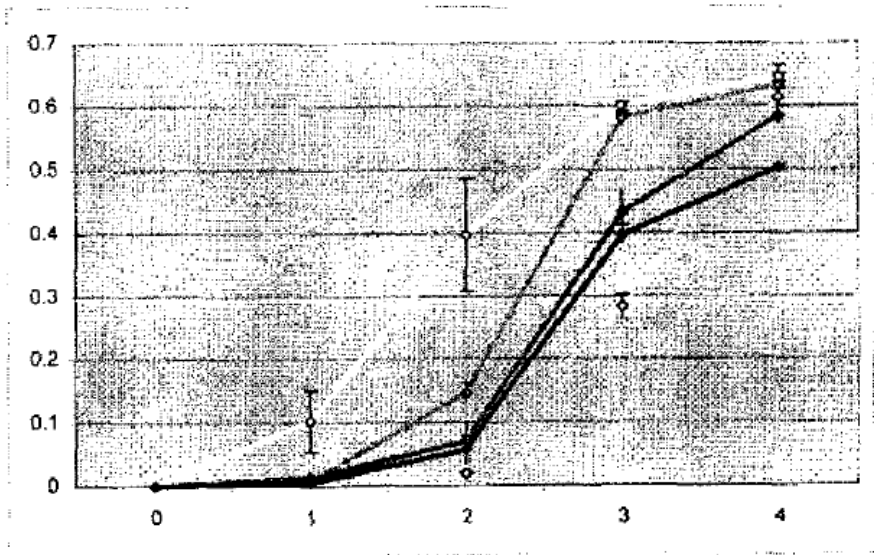


FIGURA 78

V1864F W1999G

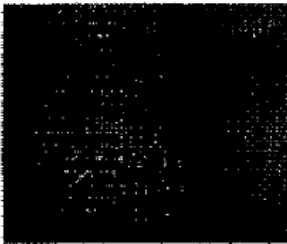
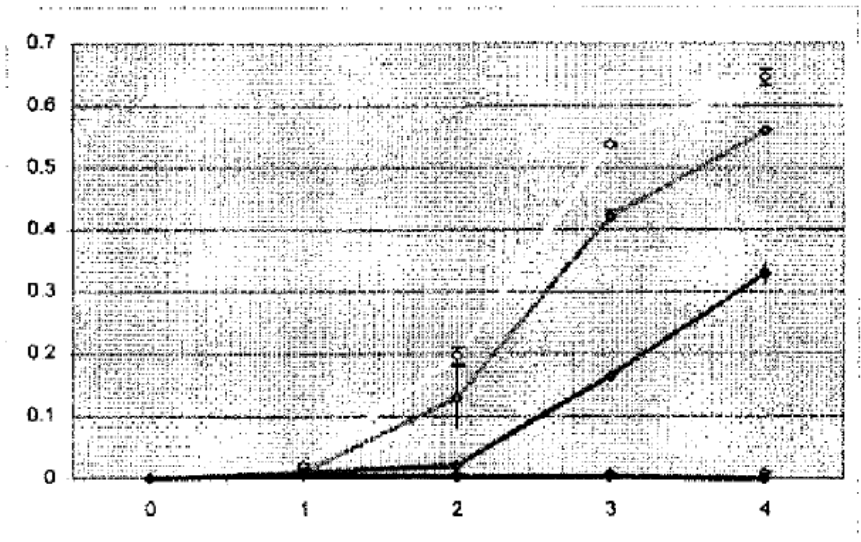


FIGURA 79

W1999G V2098A

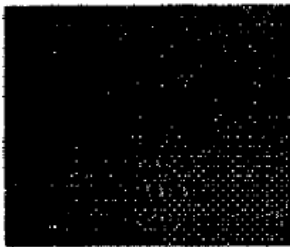
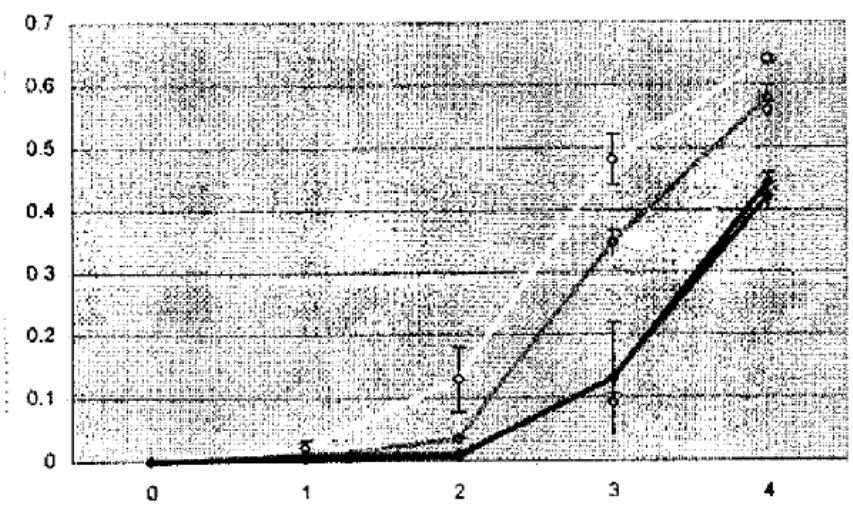


FIGURA 80

W1999G V2098A

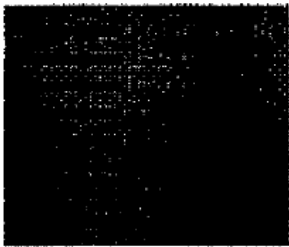
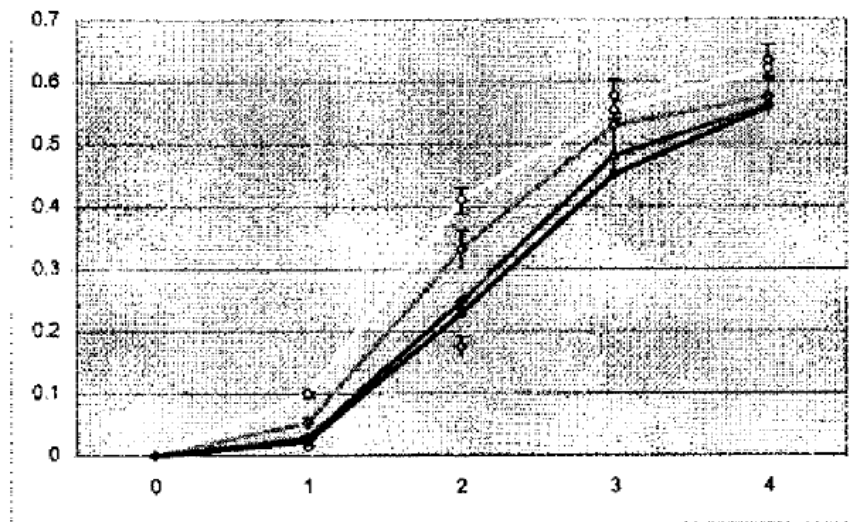


FIGURA 81

I1781L V2098A

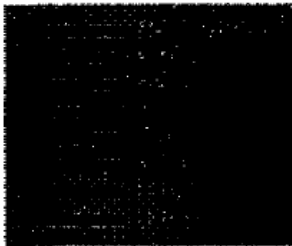
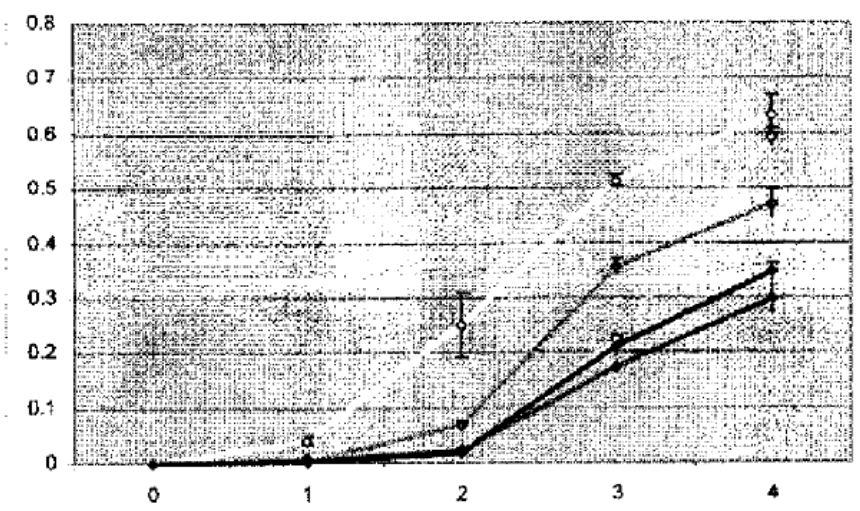


FIGURA 82

I1781L dupIV2075

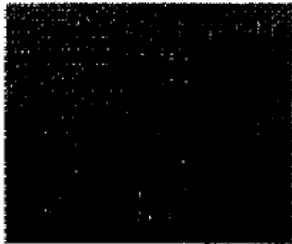
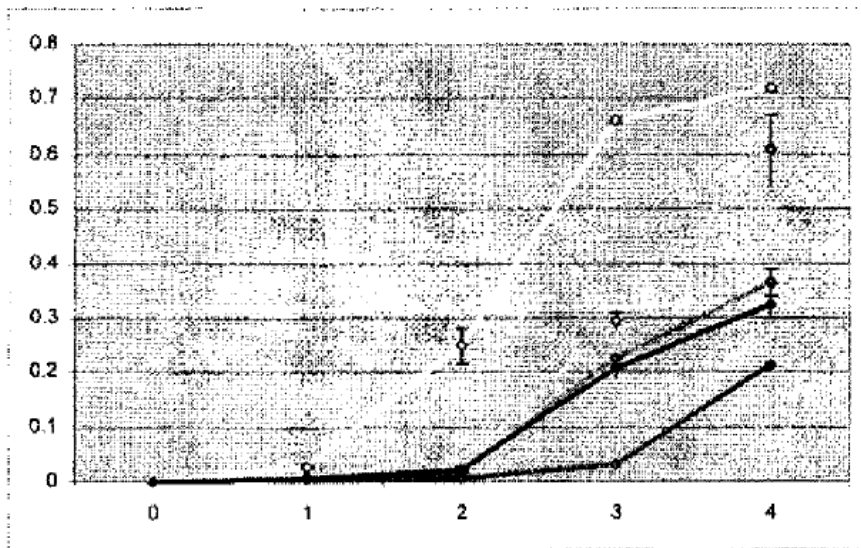


FIGURA 83

I1781L V1864F

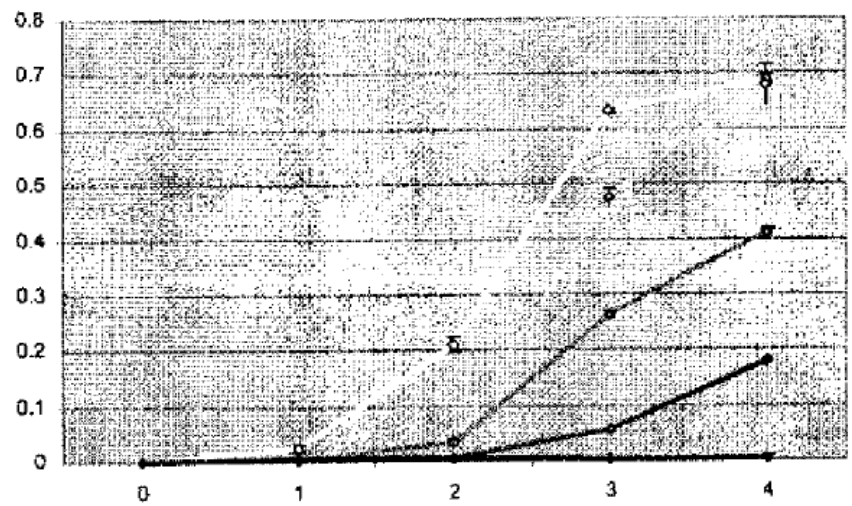


FIGURA 84

I1781L V2098G

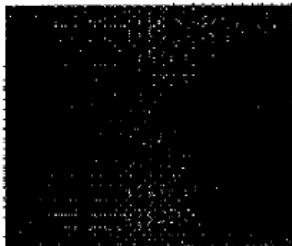
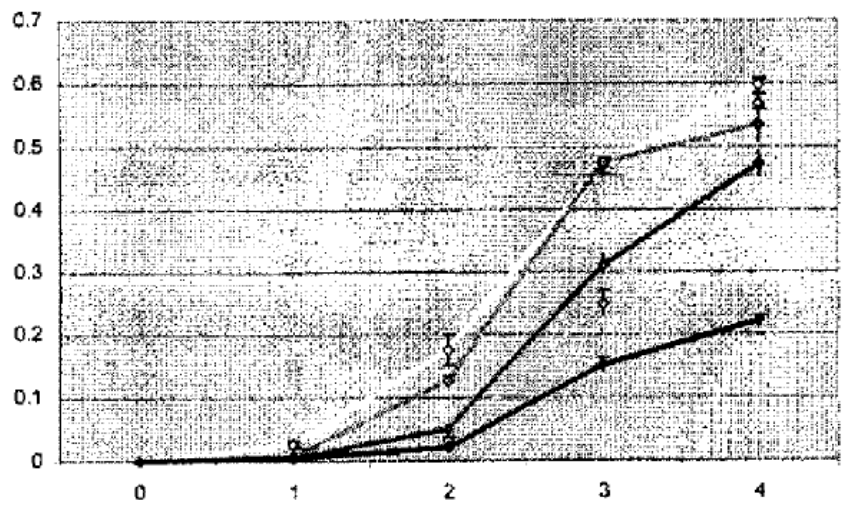


FIGURA 85

W1999G V2049I

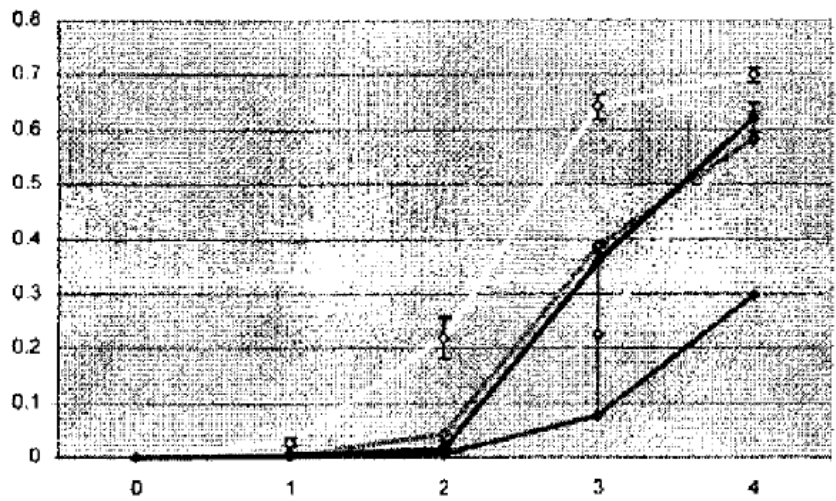


FIGURA 86

W1999G D2078G

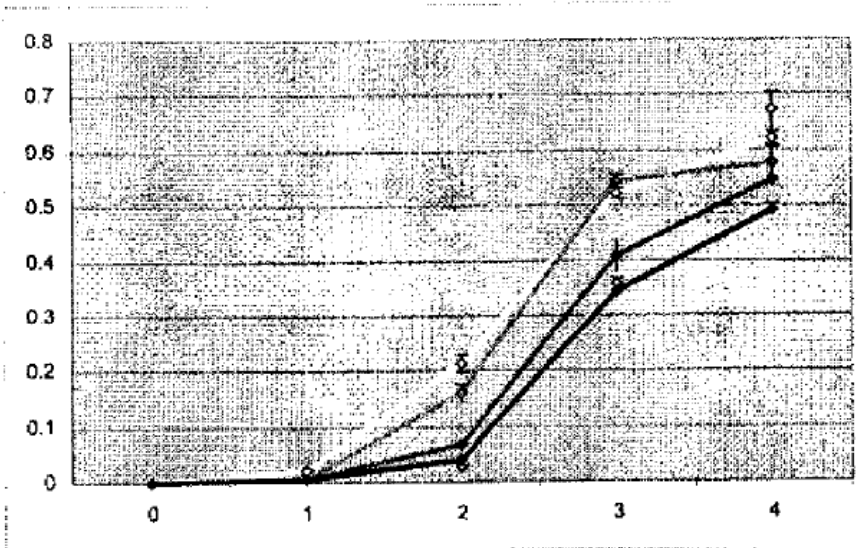


FIGURA 87

W1999G G2096A

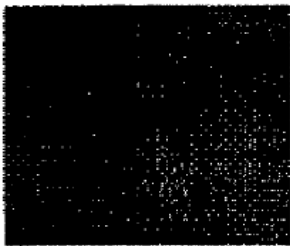
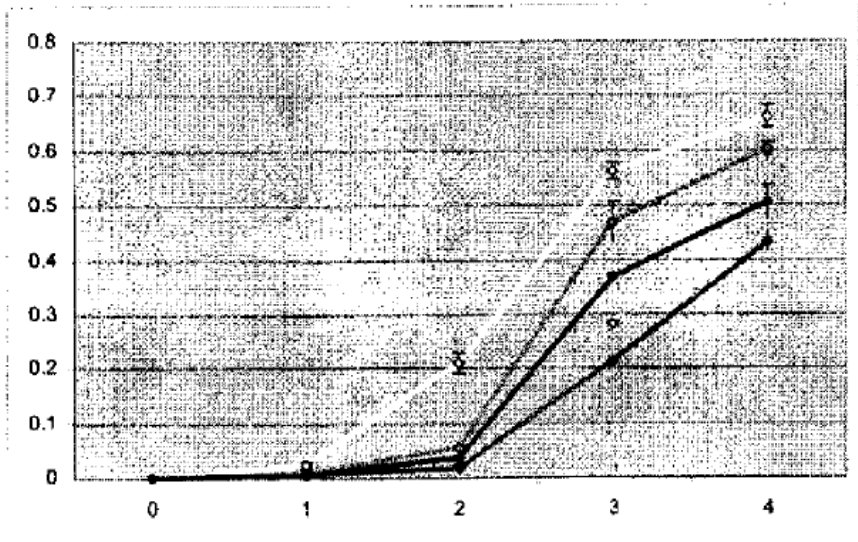


FIGURA 88

A1837V V2075I

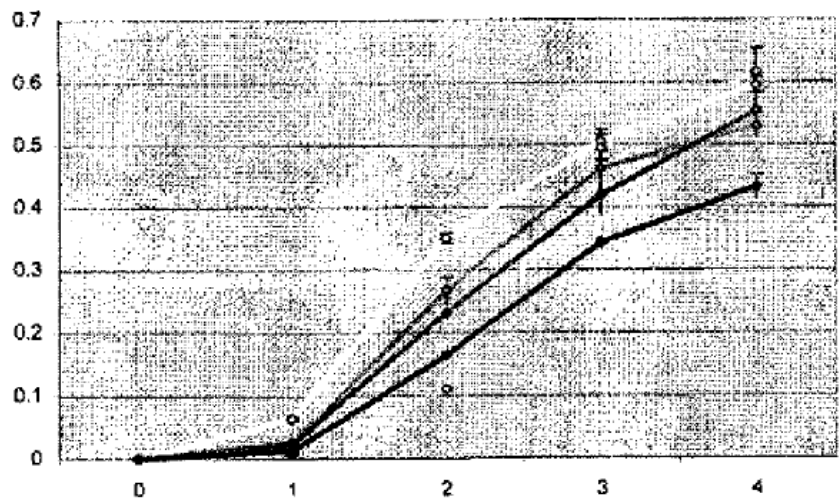


FIGURA 89

W1999C V2075I

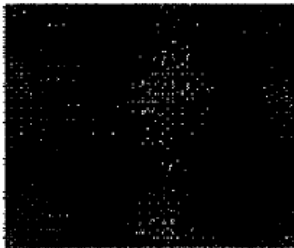
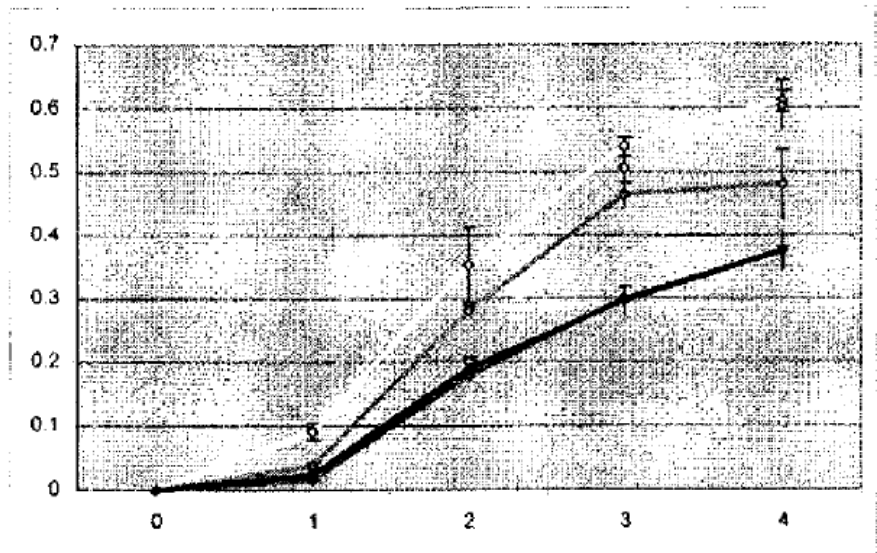


FIGURA 90

V2049C D2078G

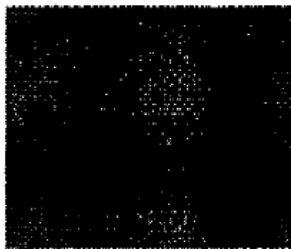
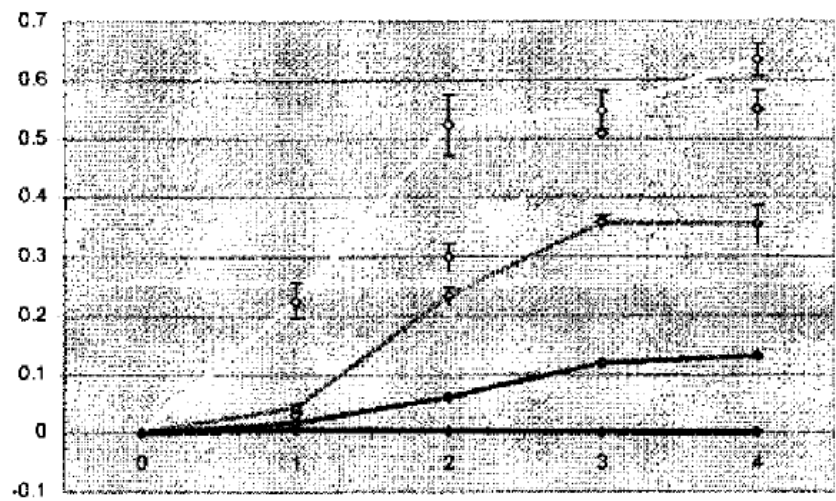


FIGURA 91

D2078G C2088W

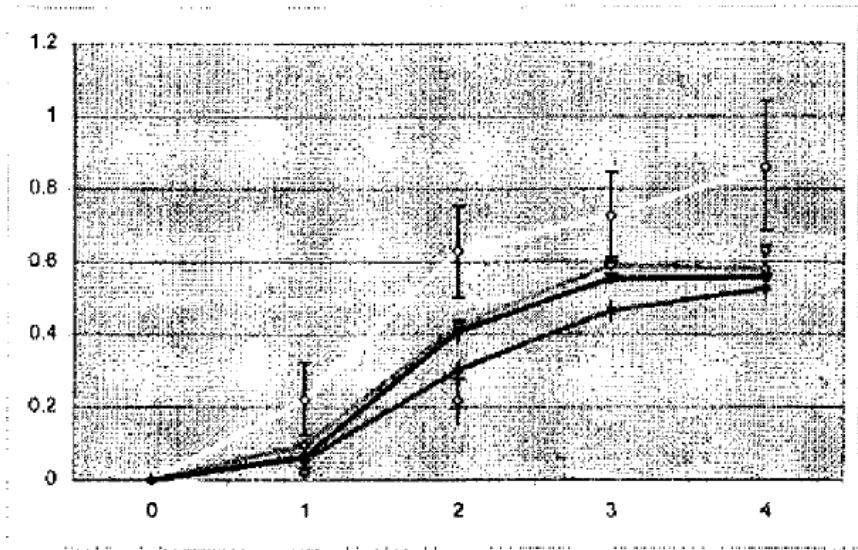


FIGURA 92

I1781L

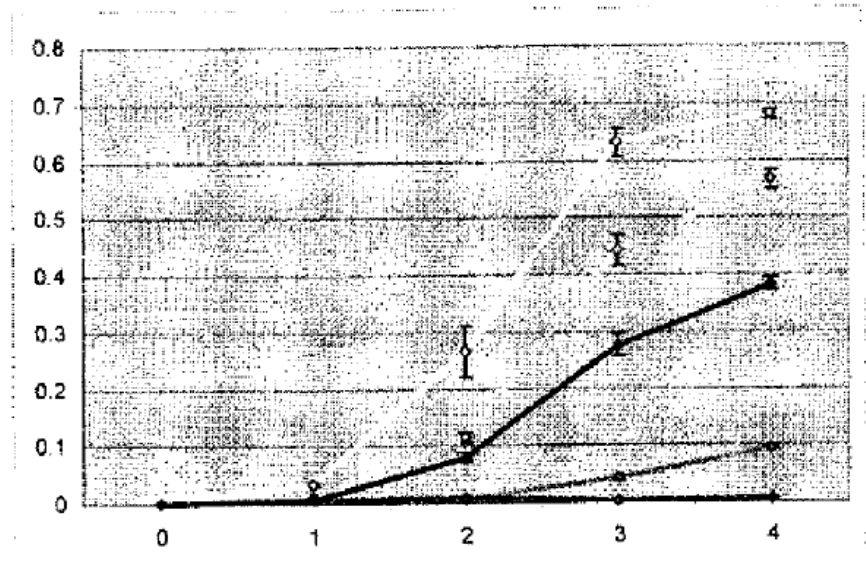


FIGURA 93

W1999G

