

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 585**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2008.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2013 PCT/US2013/036980**
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13158766**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2013 E 13778008 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2846623**

54 Título: **Péptidos de tránsito sintéticos de cloroplastos procedentes de Brassica**

30 Prioridad:

17.04.2012 US 201261625222 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2020

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, IN 46268, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 738 585 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos de tránsito sintéticos de cloroplastos procedentes de *Brassica*

Campo técnico

- Esta descripción se refiere a composiciones y métodos para codificar genéticamente y expresar polipéptidos que están dirigidos a plastos de células que contienen plastos. En algunas realizaciones, la descripción se refiere a secuencias de aminoácidos que dirigen polipéptidos a cloroplastos (p. ej., de plantas superiores) y/o moléculas de ácido nucleico que las codifican. En algunas realizaciones, la descripción se refiere a polipéptidos híbridos que comprenden una secuencia de aminoácidos que controla el tránsito de los polipéptidos híbridos a plastos, y/o a moléculas de ácido nucleico que los codifican. En especial, la descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una proteína híbrida, comprendiendo el polinucleótido: una secuencia de nucleótidos sintética procedente de *Brassica* que codifica un solo péptido híbrido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua de un primer péptido en tránsito de cloroplastos (CTP) de *Brassica*, comprendiendo además el péptido híbrido una secuencia de aminoácidos contigua de un segundo CTP diferente, en donde el péptido híbrido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés operativamente unido a la secuencia de nucleótidos sintética procedente de *Brassica*. Además la descripción se refiere a un material vegetal transgénico que comprende dicha molécula de ácido nucleico, un producto básico producido a partir de dicho material vegetal así como a un método para producir un material vegetal transgénico.

Antecedentes

- Las células vegetales contienen distintos orgánulos subcelulares, denominados generalmente "plastos", que están delimitados por sistemas de membrana característicos y realizan funciones especializadas dentro de la célula. Determinados plastos son responsables de la fotosíntesis, así como de la síntesis y almacenamiento de determinados compuestos químicos. Todos los plastos proceden de proplastos que están presentes en las regiones meristemáticas de la planta. Los proplastos pueden desarrollarse, por ejemplo, en cloroplastos, etioplastos, cromoplastos, gerontoplastos, leucoplastos, amiloplastos, elaioplastos y proteinoplastos. Los plastos existen en modo semiautónomo dentro de la célula, conteniendo su propio sistema genético y su maquinaria de síntesis de proteínas, pero dependiendo de una estrecha cooperación con el sistema nucleo-citoplásmico en su desarrollo y actividades biosintéticas.

- En las células fotosintéticas de la hoja de las plantas superiores, los plastos más conocidos son los cloroplastos. La función más esencial de los cloroplastos es el desempeño de las reacciones de fotosíntesis impulsadas por la luz. Pero, los cloroplastos también llevan a cabo muchos otros procesos biosintéticos de importancia para la célula vegetal. Por ejemplo, todos los ácidos grasos de las células están compuestos por enzimas situadas en el estroma del cloroplasto, utilizando el ATP, el NADPH y los carbohidratos que están disponibles allí. Además, el poder reductor de los electrones activados por la luz impulsa la reducción del nitrato (NO_2^-) a (NH_3) en el cloroplasto: este amoníaco proporciona a la planta el nitrógeno requerido para la síntesis de aminoácidos y nucleótidos.

- El cloroplasto también participa en procesos de particular importancia en la industria agroquímica. Por ejemplo, se sabe que muchos herbicidas actúan mediante funciones de bloqueo que se realizan dentro del cloroplasto. Estudios recientes han identificado el objetivo específico de varios herbicidas. Por ejemplo, los herbicidas procedentes de la triazina inhiben la fotosíntesis al desplazar una molécula de plastoquinona de su sitio de unión en el polipéptido de 32 kD del fotosistema II. Este polipéptido de 32 kD está codificado en el genoma del cloroplasto y sintetizado por la maquinaria del orgánulo. Se han obtenido plantas mutantes que son resistentes a los herbicidas de triazina. Estas plantas contienen un polipéptido mutante de 32 kD del cual la plastoquinona ya no puede ser desplazada por los herbicidas de triazina. Las sulfonilureas inhiben la acetolactato sintasa en el cloroplasto. La acetolactato sintasa participa en la síntesis de isoleucina y valina. El glifosato inhibe la función de la 5-enol piruvil-3-fosfohikimato sintasa (EPSPS), que es una enzima involucrada en la síntesis de aminoácidos aromáticos. Todas estas enzimas están codificadas por el genoma nuclear, pero se desplazan en el cloroplasto donde tiene lugar la síntesis real de aminoácidos.

- La mayoría de las proteínas del cloroplasto se codifican en el núcleo de la célula vegetal, se sintetizan como proteínas precursoras más grandes en el citosol y se importan después de la traducción al cloroplasto. La importación a través de las membranas de la envoltura externa e interna en el estroma es el medio principal para la entrada de proteínas destinadas al estroma, a la membrana tilacoidal y al lumen tilacoidal. La localización de proteínas precursoras importadas en la membrana tilacoidal y el lumen tilacoidal se realiza por cuatro mecanismos distintos, incluidos dos que son homólogos a los sistemas de transporte de proteínas bacterianas. Por lo tanto, los mecanismos para la localización de proteínas en el cloroplasto proceden, en parte, del endosimbionte procarionta. Cline y Henry (1996), *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12: 1-26.

Las proteínas precursoras destinadas a la expresión cloroplástica contienen extensiones terminal Nes conocidas como péptidos de tránsito al cloroplasto (CTP). El péptido de tránsito es instrumental para el reconocimiento específico de la superficie del cloroplasto y para mediar en el desplazamiento tras la traducción de pre-proteínas a

través de la envoltura cloroplástica y, por lo tanto, a los diversos compartimentos dentro del cloroplasto (p. ej., estroma, tilacoide y membrana tilacoidal). Estas secuencias peptídicas de tránsito terminal Nes contienen toda la información necesaria para la importación de la proteína del cloroplasto en plastos; las secuencias peptídicas de tránsito son necesarias y suficientes para la importación de plastos.

- 5 Los genes de plantas descritos que tienen secuencias de péptidos de tránsito codificadas de forma natural en su terminal N incluyen la pequeña subunidad de cloroplasto de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RuBisCo) (de Castro Silva-Filho *et al.* (1996), *Plant Mol. Biol.* 30:769-80; Schnell *et al.* (1991), *J. Biol. Chem.* 266: 3335-42); EPSPS (véase, p. ej., Archer *et al.* (1990), *J. Bioenerg. and Biomemb.* 22: 789-810, y las patentes de los EE.UU. n° 6.867.293, n° 7.045.684 y Re. n° 36.449); triptófano sintasa (Zhao *et al.* (1995), *J. Biol. Chem.* 270:6081-7);
 10 plastocianina (Lawrence *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.* 272: 20357-63); corismato sintasa (Schmidt *et al.* (1993), *J. Biol. Chem.* 268: 27447-57); la proteína de unión a/b de clorofila (LHBP) que capta la luz (Lamppa *et al.* (1988), *J. Biol. Chem.* 263: 14996-14999); y la proteína cloroplasto de *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.* (2008), *Plant Cell* 20:1603-22). La publicación de la patente de EE.UU. n° US 2010/0071090 proporciona determinados péptidos objetivo del cloroplasto de *Chlamydomonas* sp. La publicación internacional WO 2013/116758 A1 describe péptidos
 15 de tránsito sintéticos de cloroplastos procedentes de *Brassica* y se refiere a composiciones y métodos para dirigir péptidos, polipéptidos y proteínas a plastos de células que contienen plastos.

Sin embargo, los requisitos estructurales para la información codificada por los péptidos dirigidos a cloroplastos siguen siendo esquivos, debido a su alto nivel de diversidad de secuencias y a la falta de motivos de secuencia comunes o de consenso, aunque es posible que haya distintos subgrupos de péptidos dirigidos al cloroplasto con
 20 motivos estructurales independientes. Lee *et al.* (2008), anteriormente. Además, no todas estas secuencias han sido útiles en la expresión heteróloga de proteínas dirigidas a cloroplastos en plantas superiores.

Descripción

En la presente memoria se describen composiciones y métodos para la orientación de polipéptidos al plasto en una planta. En algunas realizaciones, una composición comprende una molécula de ácido nucleico que comprende al
 25 menos una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de tránsito sintético al cloroplasto procedente de *Brassica* (p. ej., un péptido TraP8 y un péptido TraP9) operativamente unido a una secuencia de nucleótidos de interés. En determinadas realizaciones, dichas moléculas de ácido nucleico pueden ser útiles para la expresión y dirección de un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de interés en una planta monocotiledónea o dicotiledónea. Además, se describen vectores que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende al
 30 menos una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de tránsito sintético de cloroplasto de *Brassica* operativamente unido a una secuencia de nucleótidos de interés.

En concreto, la descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una proteína híbrida, comprendiendo el polinucleótido: una secuencia de nucleótidos sintética procedente de
 35 *Brassica* que codifica un péptido híbrido único que comprende una secuencia de aminoácidos contigua de un primer péptido de tránsito de cloroplasto (CTP) de *Brassica*, comprendiendo además el péptido híbrido una secuencia de aminoácidos contigua de un segundo CTP diferente, en donde el péptido híbrido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3 o a la SEQ ID NO: 4; y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés operativamente unida a la secuencia de nucleótidos sintética procedente de *Brassica*. Además, la descripción se refiere a un material vegetal transgénico que comprende dicha
 40 molécula de ácido nucleico, un producto básico vegetal transgénico producido a partir de dicho material vegetal, así como a un método para producir un material vegetal transgénico.

En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* puede ser una secuencia de nucleótidos que procede de una secuencia de nucleótidos de referencia obtenida a partir de un
 45 gen de *Brassica* sp. (p. ej., *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea* y *B. carinata*). En algunos ejemplos, una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* puede ser una secuencia de nucleótidos híbrida que comprende una secuencia de nucleótidos parcial que codifica CTP de un gen de *Brassica* sp., o una de sus variantes funcionales. En realizaciones específicas, una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* puede contener secuencias de nucleótidos contiguas obtenidas de cada una de las siguientes: CTP de *Brassica* sp. de referencia y un CTP de un gen diferente de la *Brassica* sp., una *Brassica* sp.
 50 diferente, o un organismo diferente (p. ej., una planta, procarionta, y eucariota fotosintética inferior). En determinadas realizaciones, se puede obtener una secuencia de nucleótidos contigua a partir de una secuencia de nucleótidos ortóloga del CTP de *Brassica* de referencia que se obtiene de un ortólogo de un organismo diferente del gen de la *Brassica* sp. de referencia (p. ej., un genoma de *Brassica* sp. diferente). En estas y otras realizaciones, una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* puede ser una secuencia de
 55 nucleótidos híbrida que comprende más de una secuencia de nucleótidos que codifica CTP.

En algunos ejemplos, una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* puede ser una secuencia de nucleótidos híbrida que comprende una secuencia parcial de nucleótidos de CTP de *B. napus* y *B. rapa* o una de sus variantes funcionales. En ejemplos específicos, una secuencia de nucleótidos que codifica un
 60 CTP sintético procedente de *Brassica* puede contener secuencias de nucleótidos contiguas obtenidas de cada uno de *B. napus* y *B. rapa*, o una de sus variantes funcionales.

En algunas realizaciones, una composición comprende una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un medio procedente de *Brassica* para dirigir un polipéptido a un cloroplasto. Además, se describen moléculas de ácido nucleico que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un medio procedente de *Brassica* para dirigir un polipéptido a un cloroplasto operativamente unido a una secuencia de nucleótidos de interés.

- 5 En determinadas realizaciones, dichas moléculas de ácido nucleico pueden ser útiles para la expresión y dirección de un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de interés en una planta monocotiledónea o dicotiledónea. A los efectos de la presente descripción, un medio procedente de *Brassica* para dirigir un polipéptido a un cloroplasto se refiere a determinadas secuencias de nucleótidos sintéticas. En determinadas realizaciones, un medio procedente de *Brassica* para dirigir un polipéptido a un cloroplasto se selecciona del grupo que consiste en
- 10 secuencias nucleotídicas que codifican los polipéptidos mencionados en la presente memoria como TraP8 y TraP9.

En la presente memoria también se describen materiales vegetales (por ejemplo, y sin limitación, plantas, tejidos vegetales y células vegetales) que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* operativamente unido a una secuencia de nucleótidos de interés. En algunas realizaciones, un material vegetal puede tener dicha molécula de

15 ácido nucleico integrada de forma estable en su genoma. En algunas realizaciones, un material vegetal puede expresar transitoriamente un producto de una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* operativamente unida a una secuencia de nucleótidos de interés. En algunas realizaciones, el material vegetal es una célula vegetal a partir de la cual una planta no puede regenerarse.

- 20 También se describen métodos para expresar una secuencia de nucleótidos en una célula que contiene plastos (p. ej., una planta) en un plasto (p. ej., un cloroplasto) de la célula que contiene plastos. En determinadas realizaciones, se puede usar una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético de *Brassica* operativamente unida a una secuencia de nucleótidos de interés para transformar una célula vegetal, de tal manera que un polipéptido precursor de fusión que comprende el CTP sintético procedente de
- 25 *Brassica* fusionado a un producto de expresión de la secuencia de nucleótidos de interés se produce en el citoplasma de la célula vegetal, y el polipéptido de fusión se transporta entonces *in vivo* en un cloroplasto de la célula vegetal. En algunas realizaciones, la célula vegetal no es capaz de regenerarse para una planta.

Además, se describen métodos para la producción de una planta transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de

30 *Brassica* operativamente unida a una secuencia de nucleótidos de interés. También se describen productos vegetales básicos (p. ej., semillas) producidos a partir de dichas plantas transgénicas. En algunas realizaciones, estas plantas transgénicas o productos básicos vegetales contienen células transgénicas a partir de las cuales una planta no puede regenerarse.

- Lo anterior y otras características se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias
- 35 realizaciones, que procede haciendo referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 ilustra una molécula de ARNm que es representativa de ejemplos concretos de secuencias de nucleótidos codificadoras de CTP sintéticos procedentes de *Brassica* (por ejemplo, para TraP8 y TraP9) operativamente unidas a una secuencia de nucleótidos de interés. En algunas realizaciones, una molécula de ARNm (como la que la

40 mostrada) puede transcribirse a partir de una molécula de ADN que comprende un marco de lectura abierto incluida la secuencia codificadora de CTP sintético procedente de *Brassica* operativamente unida a la secuencia de nucleótidos de interés. La secuencia de nucleótidos de interés puede ser, en algunas realizaciones, una secuencia que codifica un péptido de interés, por ejemplo y sin limitación, un producto de gen marcador o un péptido que se dirige a un plasto.

- 45 La FIG. 2 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB101977.

La FIG. 3 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB101908.

La FIG. 4 incluye una imagen al microscopio que demuestra que TraP8-YFP infiltrado en el tejido de la hoja del tabaco se desplazó a los cloroplastos del tejido de la hoja del tabaco.

- La FIG. 5 incluye una imagen al microscopio que demuestra que TraP9-YFP infiltrado en el tejido de la hoja del
- 50 tabaco se desplazó a los cloroplastos del tejido de la hoja del tabaco.

La FIG. 6 incluye una imagen al microscopio que demuestra que las referencias de YFP no dirigidas que se infiltraron en el tejido de la hoja del tabaco no se incorporaron en los cloroplastos del tejido de la hoja del tabaco.

La FIG. 7 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB106597.

- La FIG. 8 incluye una imagen al microscopio del montaje TraP8-YFP transformado en protoplastos de maíz que
- 55 muestra el desplazamiento en los cloroplastos del protoplasto de maíz.

- La FIG. 9 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB105526.
- La FIG. 10 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB105527.
- La FIG. 11 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB109807.
- La FIG. 12 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB107687.
- 5 La FIG. 13 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB111481.
- La FIG. 14 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB111479.
- La FIG. 15 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB111338.
- La FIG. 16 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB112710.
- La FIG. 17 incluye una alineación de los péptidos de tránsito de cloroplastos susodichos para la proteína EPSPS de *Brassica napus* (SEQ ID NO: 1) y *Brassica rapa* (SEQ ID NO: 2). El asterisco indica dónde se dividieron las secuencias y se recombinaron para formar TraP8 y Trap9.
- 10 La FIG. 18 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB107527.
- La FIG. 19 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB105530.
- La FIG. 20 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB105531.
- 15 La FIG. 21 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB105532.
- La FIG. 22 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB105533.
- La FIG. 23 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB105534.
- La FIG. 24 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB107532.
- La FIG. 25 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB107534.
- 20 La FIG. 26 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB107533.
- La FIG. 27 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB4104.
- La FIG. 28 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB102715.
- La FIG. 29 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB102716.
- La FIG. 30 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB102717.
- 25 La FIG. 31 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB102785.
- La FIG. 32 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB102719.
- La FIG. 33 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB102718.
- La FIG. 34 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB107663.
- La FIG. 35 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB107664.
- 30 La FIG. 36 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB107665.
- La FIG. 37 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB107666.
- La FIG. 38 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB109812.
- La FIG. 39 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB101556.
- La FIG. 40 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB107698.
- 35 La FIG. 41 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB108384.
- La FIG. 42 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB108385.
- La FIG. 43 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB108386.

La FIG. 44 ilustra una cartografía plasmídica de pDAB108387.

Listado de secuencias

- Las secuencias de ácido nucleico enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras habituales para bases de nucleótidos, como se define en 37 C.F.R. § 1.822. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena mostrada. En el listado de secuencias adjunto:
- 5 La SEQ ID n°: 1 muestra el aminoácido de un péptido de tránsito de cloroplasto EPSPS de *Brassica napus*.
- La SEQ ID n°: 2 muestra el aminoácido de un péptido de tránsito de cloroplasto EPSPS de *Brassica rapa*.
- La SEQ ID n°: 3 muestra el aminoácido de un péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP8.
- 10 La SEQ ID n°: 4 muestra el aminoácido de un péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP9.
- La SEQ ID n°: 5 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP8.
- La SEQ ID n°: 6 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP9.
- 15 La SEQ ID n°: 7 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de enlazador.
- La SEQ ID n°: 8 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP8 v2.
- La SEQ ID n°: 9 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP9 v2.
- 20 La SEQ ID n°: 10 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica un gen *cry2aa*.
- La SEQ ID n° 11 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica un gen *vip3ab1v6*.
- La SEQ ID n°: 12 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica un gen *vip3ab1v7*.
- La SEQ ID n°: 13 muestra un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos, Ser-Val-Ser-Leu.
- 25 La SEQ ID NO: 14 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito del cloroplasto EPSPS de *Brassica napus* de la SEQ ID NO: 1.
- La SEQ ID NO: 15 muestra una secuencia polinucleotídica que codifica el péptido de tránsito del cloroplasto EPSPS de *Brassica rapa* de la SEQ ID NO: 2.
- La SEQ ID n°: 16 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica *dgt-28 v5*.
- La SEQ ID n°: 17 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica *dgt-28 v6*.
- 30 La SEQ ID n°: 18 muestra la secuencia de polinucleótidos del codón *dgt-1* optimizado.
- La SEQ ID n°: 19 muestra la secuencia de polinucleótidos del codón *dgt-3 v2* optimizado (G173A).
- La SEQ ID n°: 20 muestra la secuencia de polinucleótidos del codón *dgt-3 v3* optimizado (G173A; P178S).
- La SEQ ID n°: 21 muestra la secuencia de polinucleótidos del codón *dgt-3 v4* optimizado (T174I; P178S).
- La SEQ ID n°: 22 muestra la secuencia de polinucleótidos del codón *dgt-7 v4* optimizado (T168I; P172S).
- 35 La SEQ ID n°: 23 muestra la secuencia de polinucleótidos del codón *dgt-32 v3* optimizado.
- La SEQ ID n°: 24 muestra la secuencia de polinucleótidos del codón *dgt-33 v3* optimizado.
- La SEQ ID n°: 25 muestra la secuencia de polinucleótidos del codón *dgt-31 v3* optimizado.
- La SEQ ID n°: 26 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito TraP4 v2.
- La SEQ ID n°: 27 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito TraP5 v2.
- 40 La SEQ ID n°: 28 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito TraP8 v2.
- La SEQ ID n°: 29 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito TraP9 v2.

ES 2 738 585 T3

- La SEQ ID nº: 30 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito TraP12 v2.
- La SEQ ID nº: 31 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito TraP13 v2.
- La SEQ ID nº: 32 muestra la secuencia de polinucleótidos de TraP4 v2: *dgt-28 v5*.
- La SEQ ID nº: 33 muestra la secuencia de polinucleótidos de TraP5 v2: *dgt-28 v5*.
- 5 La SEQ ID nº: 34 muestra la secuencia de polinucleótidos de TraP8 v2: *dgt-28 v5*.
- La SEQ ID nº: 35 muestra la secuencia de polinucleótidos de TraP9 v2: *dgt-28 v5*.
- La SEQ ID nº: 36 muestra la secuencia de polinucleótidos de TraP12 v2: *dgt-28 v5*.
- La SEQ ID nº: 37 muestra la secuencia de polinucleótidos de TraP13 v2: *dgt-28 v5*.
- La SEQ ID nº: 38 muestra la secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito TraP14 v2.
- 10 La SEQ ID nº: 39 muestra la secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito TraP23 v2.
- La SEQ ID nº: 40 muestra la secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito TraP24 v2.
- La SEQ ID nº: 41 muestra la secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito *dgt-32 v3* fusionado a TraP14 v2.
- La SEQ ID nº: 42 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito *dgt-33 v3* fusionado a TraP24 v2.
- 15 La SEQ ID nº: 43 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido de tránsito *dgt-31 v3* fusionado a TraP23 v2.
- La SEQ ID nº: 44 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador DSM2A.
- La SEQ ID nº: 45 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador DSM2S.
- 20 La SEQ ID nº: 46 muestra la secuencia de oligonucleótidos de la sonda Cy5 de DSM2.
- La SEQ ID nº: 47 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador DGT28F.
- La SEQ ID nº: 48 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador DGT28R.
- La SEQ ID nº: 49 muestra la secuencia de oligonucleótidos de la sonda TAFFY-HEX.
- La SEQ ID nº: 50 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador TAFII15-F.
- 25 La SEQ ID nº: 51 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador TAFII15-R.
- La SEQ ID nº: 52 muestra la secuencia de oligonucleótidos del oligo directo utilizado para la confirmación del casete de expresión del gen *dgt-28*.
- La SEQ ID nº: 53 muestra la secuencia de oligonucleótidos del oligo inverso utilizado para la confirmación del casete de expresión del gen *dgt-28*.
- 30 La SEQ ID nº: 54 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador AT26410LP.
- La SEQ ID nº: 55 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador AT26410RP.
- La SEQ ID nº: 56 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador DGT28F.
- La SEQ ID nº: 57 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador DGT28R.
- La SEQ ID nº: 58 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador GAAD1F.
- 35 La SEQ ID nº: 59 muestra la secuencia de oligonucleótidos de la sonda GAAD1P.
- La SEQ ID nº: 60 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador GAAD1R.
- La SEQ ID nº: 61 muestra la secuencia de oligonucleótidos de la sonda IV.
- La SEQ ID nº: 62 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador de IVF-Taq.
- La SEQ ID nº: 63 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador IVR-Taq.

La SEQ ID nº: 64 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador zmDGT28 F.

La SEQ ID nº: 65 muestra la secuencia de oligonucleótidos de la sonda zmDGT28 FAM.

La SEQ ID nº: 66 muestra la secuencia de oligonucleótidos del cebador zmDGT28 R.

Descripción detallada

5 1. Compendio de varias realizaciones

Un péptido de tránsito de cloroplasto (CTP) (o péptido de tránsito de plasto) funciona durante la traducción o tras la traducción para dirigir un polipéptido que comprende el CTP a un plasto (p. ej., un cloroplasto). En algunas realizaciones de la invención, las proteínas de cloroplasto endógenas o las proteínas heterólogas pueden dirigirse a un cloroplasto mediante la expresión de dicha proteína como un polipéptido precursor mayor que comprende un CTP. En determinadas realizaciones, el CTP puede proceder de una secuencia de nucleótidos obtenida de un gen de *Brassica* sp., por ejemplo y sin limitación, incorporando al menos una secuencia contigua de un gen ortólogo obtenido de un organismo diferente.

En una realización ejemplar, se aislaron secuencias de ácido nucleico, cada una de las cuales codificaba un CTP, a partir de secuencias del gen EPSPS obtenidas de *Brassica napus* (nº de registro P17688 en la base de datos del NCBI) y de *Brassica rapa* (nº de registro AAS80163 en la base de datos del NCBI). Las secuencias de ácido nucleico que codifican CTP se aislaron al analizar la secuencia del gen EPSPS con el servidor de predicción ChloroP. Emanuelsson *et al.* (1999), *Protein Science* 8: 978-84 (disponible en cbs.dtu.dk/services/ChloroP). Los productos proteicos predichos de las secuencias codificadoras de CTP aisladas son péptidos de tránsito de aproximadamente 60-70 aminoácidos de longitud. En este ejemplo, el CTP natural de *B. napus* se usó como secuencia de referencia para diseñar ejemplos de CTP sintéticos procedentes de *Brassica* mediante la fusión de secuencias contiguas de los otros CTP en una posición determinada en el CTP de *B. napus*. Este proceso de diseño ilustra el desarrollo de un nuevo CTP sintético, según algunos aspectos, a partir de una secuencia de ácido nucleico de *Brassica* sp. A estos CTP sintéticos ejemplares procedentes de *Brassica* se les hace referencia en esta descripción como TraP8 y TraP9. En estos TraP sintéticos ejemplares se probó la función de direccionamiento al plasto y se constató que presentan el direccionamiento al plasto que era al menos tan favorable como la observada para cada una de las secuencias naturales de *Brassica*.

En otra realización ejemplar adicional, las secuencias de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica un péptido TraP sintético de la invención, se sintetizaron de forma independiente y operativamente unidas a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína amarilla fluorescente (YFP) para producir moléculas de ácido nucleico sintéticas, que codifica cada una un polipéptido de fusión TraP:YFP híbrido. Dichas moléculas de ácido nucleico, que codifica cada una un polipéptido de fusión TraP:YFP híbrido, se introdujeron cada una en un vector binario, de manera que cada secuencia de ácido nucleico que codifica TraP:YFP estaba operativamente unida a un activador AtUbi10.

En otra realización ejemplar más, los vectores binarios que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica TraP:YFP operativamente unido a un activador AtUbi10 se transformaron cada uno independientemente, transitoriamente en tabaco (*Nicotiana benthamiana*) mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. La microscopía confocal y el análisis de transferencia Western confirmaron que cada TraP logró dirigir YFP a los cloroplastos de tabaco.

En una realización ejemplar adicional, las secuencias de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica un péptido TraP sintético de la invención, se sintetizaron de forma independiente y operativamente unidas a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia génica de importancia agronómica. Las secuencias de TraP se fusionaron a atributos tolerantes a herbicidas (p. ej., *dgt-28* y *dgt-14*) para producir moléculas sintéticas de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica un polipéptido de fusión híbrido TraP:DGT-28 o TraP:DGT-14. Dichas moléculas de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica un polipéptido híbrido TraP:DGT-28 o TraP:DGT-14, se introdujeron en un vector binario, de manera que cada secuencia de ácido nucleico que codifica TraP:dgt-28 o TraP:dgt-14 estaba operativamente unida a un activador y otros elementos reguladores de genes. El binario que contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica TraP:dgt-28 o TraP:dgt-14 se utilizó para transformar varias especies vegetales.

En una realización ejemplar adicional, las secuencias de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica un péptido TraP sintético de la invención, se sintetizaron de forma independiente y operativamente unidas a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia génica de importancia agronómica. Las secuencias de TraP se fusionaron a genes que confieren rasgos de tolerancia a insectos (p. ej., *cry2Aa* y *vip3ab1*) para producir moléculas de ácido nucleico sintético, cada una de las cuales codifica un polipéptido de fusión híbrido TraP:Cry2Aa o TraP:Vip3Ab1. Dichas moléculas de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica un polipéptido híbrido TraP:Cry2Aa o TraP:Vip3Ab1, se introdujeron en un vector binario, de modo que cada secuencia de ácido nucleico que codifica TraP:Cry2Aa o TraP:Vip3Ab1 se unió operativamente a un activador y otros elementos reguladores de genes. El binario que contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica TraP:Cry2Aa o TraP:Vip3Ab1 se usó para transformar varias especies vegetales. Las plantas transgénicas se sometieron a un bioanálisis para determinar la resistencia a los insectos como resultado de la expresión y el desplazamiento de las enzimas Cry2Aa o Vip3Ab1 al

cloroplasto.

En vista de los ejemplos de trabajo detallados anteriormente mencionados, las secuencias de CTP sintéticas procedentes de *Brassica* de la invención, y los ácidos nucleicos que las codifican, pueden usarse para dirigir cualquier polipéptido a un plasto en una amplia gama de células que contienen plastos. Por ejemplo, mediante métodos puestos a disposición de los expertos en la técnica por la presente descripción, un polipéptido híbrido que comprende una secuencia de CTP sintética procedente de *Brassica* fusionada al terminal N de cualquier segunda secuencia peptídica puede introducirse (o expresarse en) una célula anfitriona que contiene plastos para dirigir el plasto de la segunda secuencia peptídica. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, un péptido TraP de la invención puede proporcionar una mayor eficacia de importación y tratamiento de un péptido para el que se desea la expresión de plasto, cuando se compara con un CTP natural.

II. Abreviaturas

CTP	Péptido de tránsito de cloroplasto
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EPSPS	3-enolpiruvilshikimato-5-fosfato sintetasa
15 YFP	Proteína fluorescente amarilla
T _i	inductor de tumores (plásmidos procedentes de <i>A. tumefaciens</i>)
ADN-t	ADN de transferencia

III. Terminología

Para facilitar el análisis de las diversas realizaciones de la descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos y expresiones específicos:

Péptido de tránsito de cloroplasto: Como se emplea en la presente memoria, la expresión "péptido de tránsito de cloroplasto" (CTP) (o "péptido de tránsito de plasto") puede referirse a una secuencia de aminoácidos que, cuando está presente en el terminal N de un polipéptido, dirige la importación del polipéptido en un plasto de una célula que contiene plasto (p. ej., una célula vegetal, como en una planta completa o en un cultivo de células vegetales). Un CTP es generalmente necesario y suficiente para dirigir la importación de una proteína a un plasto (p. ej., un plastido primario, secundario o terciario, como un cloroplasto) de una célula hospedadora. Un péptido supuesto de tránsito de cloroplasto puede identificarse por uno de varios algoritmos disponibles (p. ej., PSORT y ChloroP (disponible en cbs.dtu.dk/services/ChloroP)). ChloroP puede proporcionar una predicción particularmente buena de los CTP. Emanuelsson *et al.* (1999), *Protein Science* 8:978-84. Sin embargo, la predicción de los CTP funcionales no se logra con una eficiencia del 100% por ningún algoritmo existente. Por lo tanto, es importante verificar que un supuesto CTP identificado funciona efectivamente como se pretende, p. ej., en una metodología *in vitro* o *in vivo*.

Los péptidos de tránsito de cloroplastos pueden estar situados en el terminal N de un polipéptido que se importa en un plasto. El CTP puede facilitar el transporte a la vez o después de la traducción de un polipéptido que comprende el CTP en el plasto. Los péptidos de tránsito de cloroplastos generalmente comprenden entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 aminoácidos, y se ha observado que dichos CTP contienen algunas características comunes. Por ejemplo: los CTP contienen muy pocos, si alguno, aminoácidos cargados negativamente (tales como ácido aspártico, ácido glutámico, asparaginas o glutamina); las regiones del terminal N de los CTP carecen de aminoácidos cargados, glicina y prolina; la región central de un CTP también es probable que contenga una proporción muy alta de aminoácidos básicos o hidroxilados (como serina y treonina); y la región del terminal C de un CTP es probable que sea rica en arginina, y tenga capacidad para comprender una estructura de hoja beta anfipática. Las proteasas plastídicas pueden escindir el CTP del resto de un polipéptido que comprende el CTP después de la importación del polipéptido en el plasto.

Contacto: Como se emplea en la presente memoria, la expresión "contacto con" o "absorción por" una célula, tejido u organismo (p. ej., una célula vegetal, tejido vegetal y planta), con respecto a una molécula de ácido nucleico, incluye la interiorización de la molécula de ácido nucleico en el organismo, por ejemplo y sin limitación: poner en contacto el organismo con una composición que comprende la molécula de ácido nucleico; e impregnación de organismos con una solución que comprende la molécula de ácido nucleico.

Endógeno: Como se emplea en la presente memoria, el término "endógeno" se refiere a sustancias (p. ej., moléculas de ácido nucleico y polipéptidos) que se originan dentro de un determinado organismo, tejido o célula. Por ejemplo, un polipéptido "endógeno" expresado en una célula vegetal puede referirse a un polipéptido que normalmente se expresa en células del mismo tipo de plantas no genéticamente modificadas por ingeniería genética de la misma especie. En algunos ejemplos, un gen endógeno (p. ej., un gen EPSPS) de una *Brassica* sp. puede usarse para obtener una secuencia de CTP de *Brassica* de referencia.

Expresión: Como se emplea en la presente memoria, "expresión" de una secuencia de codificación (por ejemplo, un

gen o un transgén) se refiere al proceso mediante el cual la información codificada de una unidad de transcripción de ácido nucleico (incluido, p. ej., ADN genómico o ADNc) se convierte en una parte operativa, no operativa o estructural de una célula, que a menudo incluye la síntesis de una proteína. La expresión génica puede estar influenciada por señales externas; por ejemplo, la exposición de una célula, tejido u organismo a un agente que
 5 aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen también se puede regular en cualquier parte de la ruta desde el ADN al ARN a la proteína. La regulación de la expresión génica se produce, por ejemplo, mediante controles que actúan sobre la transcripción, la traducción, el transporte y el tratamiento del ARN, la degradación de moléculas intermedias como el ARNm o mediante activación, inactivación, compartimentación, o degradación de moléculas de proteínas específicas después de que se han construido, o por combinaciones de las mismas. La
 10 expresión génica puede medirse en el ARN o en la proteína por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo y sin limitación: transferencia Northern; RT-PCR; transferencia Western o; en el lugar; y ensayo(s) de actividad de proteína *in vitro*; *in situ* e *in vivo*.

Material genético: Como se emplea en la presente memoria, la expresión "material genético" incluye todos los genes y moléculas de ácido nucleico, como el ADN y el ARN.

15 Heterólogo: Como se emplea en la presente memoria, el término "heterólogo" se refiere a sustancias (p. ej., moléculas de ácido nucleico y polipéptidos) que no se originan dentro de un determinado organismo, tejido o célula. Por ejemplo, un polipéptido "heterólogo" expresado en una célula vegetal puede referirse a un polipéptido que normalmente no se expresa en células del mismo tipo de plantas no modificadas genéticamente de la misma especie (p. ej., un polipéptido que se expresa en diferentes células del mismo organismo o células de un organismo
 20 diferente).

Aislado: como se emplea en la presente memoria, el término "aislado" se refiere a moléculas (p. ej., moléculas de ácido nucleico y polipéptidos) que se separan o purifican sustancialmente de otras moléculas del mismo tipo (p. ej., otras moléculas de ácido nucleico y otros polipéptidos) con las cuales la molécula está asociada normalmente en la célula del organismo en el que la molécula se encuentra naturalmente. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico
 25 aislada se puede separar o purificar sustancialmente del ADN cromosómico o del ADN extracromosómico en la célula del organismo en el que la molécula de ácido nucleico se produce naturalmente. Por lo tanto, el término incluye moléculas de ácido nucleico recombinado y polipéptidos que se purifican bioquímicamente de manera que se eliminan otras moléculas de ácido nucleico, polipéptidos y componentes celulares. El término también incluye moléculas de ácido nucleico recombinado, moléculas de ácido nucleico sintetizadas químicamente y polipéptidos
 30 producidos por recombinación.

La expresión "sustancialmente purificada", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula que se separa de otras moléculas normalmente asociadas con ella en su estado natural. Una molécula sustancialmente purificada puede ser la especie predominante presente en una composición. Una molécula sustancialmente purificada puede estar, por ejemplo, al menos 60% libre, al menos 75% libre, o al menos 90% libre de otras
 35 moléculas además de un disolvente presente en una mezcla natural. La expresión "sustancialmente purificada" no se refiere a las moléculas presentes en su estado natural.

Molécula de ácido nucleico: como se emplea en la presente memoria, la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir cadenas tanto transcritas como complementarias de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas y polímeros mixtos de la anterior. Un nucleótido puede referirse a un
 40 ribonucleótido, desoxirribonucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una "molécula de ácido nucleico" como se emplea en la presente memoria es sinónimo de "ácido nucleico" y "polinucleótido". Una molécula de ácido nucleico suele tener al menos 10 bases de longitud, a menos que se especifique lo contrario. El término incluye formas de ADN monocatenarias y bicatenarias. Las moléculas de ácido nucleico incluyen formas diméricas (denominadas en tándem) y los productos de transcripción de las moléculas de ácido nucleico. Una molécula de
 45 ácido nucleico puede incluir uno u otro o ambos nucleótidos de origen natural y modificados unidos por enlaces nucleotídicos de origen natural y/o de origen no natural.

Las moléculas de ácido nucleico pueden modificarse química o bioquímicamente, o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o modificadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales
 50 por un análogo, modificaciones internucleotídicas (p. ej., enlaces no cargados: por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; enlaces cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc., restos colgantes: por ejemplo, péptidos, intercaladores: por ejemplo, acridina, psoraleno, etc., quelantes, alquilantes y enlaces modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). La expresión "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier configuración topológica, incluidas las configuraciones monocatenaria,
 55 bicatenaria, parcialmente doble, triple, en horquilla, circular y bloqueada.

Como se emplea en la presente memoria con respecto al ADN, la expresión "secuencia codificadora", "secuencia nucleotídica estructural" o "molécula de ácido nucleico estructural" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se traduce finalmente en un polipéptido, mediante la transcripción y el ARNm, cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Con respecto al ARN, la expresión "secuencia codificadora" se refiere a una
 60 secuencia de nucleótidos que se traduce en un péptido, polipéptido o proteína. Los límites de una secuencia de

codificación se determinan mediante un codón de inicio de la traducción en el terminal 5' y un codón de terminación de la traducción en el terminal 3'. Las secuencias de codificación incluyen, entre otros: ADN genómico; ADNc; EST; y secuencias de nucleótidos recombinadas.

5 En algunas realizaciones, la invención incluye secuencias de nucleótidos que pueden aislarse, purificarse o purificarse parcialmente, por ejemplo, usando métodos de separación tales como, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico; por exclusión basada en el tamaño molecular o por afinidad; por técnicas de fraccionamiento basadas en solubilidad en diferentes disolventes; y métodos de ingeniería genética tales como amplificación, clonación y subclonación.

10 Identidad de secuencia: la expresión "identidad de secuencia" o "identidad", como se emplea en la presente memoria en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o de polipéptido, puede referirse a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima en un intervalo de comparación especificado.

15 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" puede referirse al valor determinado al comparar dos secuencias óptimamente alineadas (p. ej., secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos) en un intervalo de comparación, en donde la porción de la secuencia en el intervalo de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece el resto de nucleótido o aminoácido idéntico en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en el intervalo de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

20 Los métodos para alinear secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineación se describen, por ejemplo, en: Smith y Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman y Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson y Lipman (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444; Higgins y Sharp (1988), *Gene* 73:237-44; Higgins y Sharp (1989), *CABIOS* 5:151-3; Corpet *et al.* (1988), *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang *et al.* (1992), *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65; Pearson *et al.* (1994), *Methods Mol. Biol.* 24:307-31; Tatiana *et al.* (1999), *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50. Se puede encontrar una consideración detallada de los métodos de alineamiento de secuencias y los cálculos de homología, por ejemplo, en Altschul *et al.* (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

30 La Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™; Altschul *et al.* (1990)) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) está disponible en varios proveedores, incluido el National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD), y en Internet, para su empleo en relación con varios programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa está disponible en Internet en la sección "help" de BLAST™. Para comparaciones de secuencias de ácido nucleico, puede emplearse la función "Blast 2 sequences" del programa BLAST™ (Blastn) utilizando la matriz BLOSUM62 predeterminada asignada a parámetros predeterminados. Las secuencias de ácido nucleico con incluso mayor similitud con las secuencias de referencia mostrarán un porcentaje de identidad creciente cuando se evalúen por este método.

35 Específicamente hibridable/Específicamente complementario: Como se emplea en la presente memoria, las expresiones "específicamente hibridable" y "específicamente complementario" son expresiones que indican un grado suficiente de complementariedad, de modo que se produce una unión estable y específica entre la molécula de ácido nucleico y una molécula de ácido nucleico diana. La hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico implica la formación de una alineación antiparalela entre las secuencias de ácido nucleico de las dos moléculas de ácido nucleico. Las dos moléculas son capaces de formar enlaces de hidrógeno con las bases correspondientes en la cadena opuesta para formar una molécula de doble cadena que, si es suficientemente estable, es detectable utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Una molécula de ácido nucleico no necesita ser 100% complementaria a su secuencia diana para ser específicamente hibridable. Sin embargo, la complementariedad de secuencias que debe existir para que la hibridación sea específica es función de las condiciones de hibridación utilizadas.

40 Las condiciones de hibridación que dan como resultado determinados grados de severidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación elegido y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico de hibridación. En general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na⁺ y/o Mg) del tampón de hibridación determinarán la severidad de la hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la severidad. Los cálculos con respecto a las condiciones de hibridación requeridas para alcanzar determinados grados de severidad son conocidos por los expertos en la técnica, y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, capítulos 9 y 11; y Hames and Higgins (eds.) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, 1985. Se pueden encontrar más instrucciones detalladas y orientaciones con respecto a la hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en Tijssen, "Overview of principles of hybridation and the strategy of nucleic acid probe assays," en *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, capítulo 2, Elsevier, NY, 1993; y Ausubel *et al.*, Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo

2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995.

5 Tal como se emplea en la presente memoria, "condiciones severas" abarcan condiciones en las que solo se producirá la hibridación si hay menos de 20% de desajuste entre la molécula de hibridación y una secuencia homóloga dentro de la molécula de ácido nucleico diana. Las "condiciones severas" incluyen determinados niveles adicionales de severidad. Por lo tanto, como se emplea en la presente memoria, las condiciones de "severidad moderada" son aquellas bajo las cuales las moléculas con más de 20% de desajuste de secuencia no se hibridarán; condiciones de "alta severidad" son aquellas en las que las secuencias con más de 10% de desajuste no se hibridarán; y condiciones de "muy alta severidad" son aquellas en las que las secuencias con más de 5% de desajuste no se hibridarán.

10 Las siguientes son condiciones representativas de hibridación no restrictivas.

Condición de alta severidad (detecta secuencias que comparten al menos un 90% de identidad de secuencia): Hibridación en 5x tampón SSC a 65°C durante 16 horas; lavar dos veces en 2x tampón SSC a temperatura ambiente durante 15 minutos cada uno; y lavar dos veces en 0,5x tampón SSC a 65°C durante 20 minutos cada uno.

15 Condición de severidad moderada (detecta secuencias que comparten al menos 80% de identidad de secuencia): Hibridación en 5x-6x tampón SSC a 65-70°C durante 16-20 horas; lavar dos veces en 2x tampón SSC a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada uno; y lavar dos veces en 1x tampón SSC a 55-70°C durante 30 minutos cada uno.

20 Condición de control no severa (las secuencias que comparten al menos un 50% de identidad de secuencia se hibridarán): Hibridación en 6x tampón SSC a temperatura ambiente hasta 55°C durante 16-20 horas; lavar al menos dos veces en 2x-3x tampón SSC a temperatura ambiente a 55°C durante 20-30 minutos cada uno.

25 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "sustancialmente homólogo" u "homología sustancial", con respecto a una secuencia de ácido nucleico contigua, se refiere a secuencias de nucleótidos contiguas que se hibridan en condiciones severas a la secuencia de ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que son sustancialmente homólogas a una secuencia de ácido nucleico de referencia son aquellas secuencias de ácido nucleico que se hibridan en condiciones severas (p. ej., las condiciones de severidad moderada expuestas, anteriormente) a la secuencia de ácido nucleico de referencia. Las secuencias sustancialmente homólogas pueden tener al menos 80% de identidad de secuencia. Por ejemplo, las secuencias sustancialmente homólogas pueden tener de aproximadamente 80% a 100% de identidad de secuencia, tal como aproximadamente 81%; aproximadamente 82%; aproximadamente 83%; aproximadamente 84%; aproximadamente 85%; 30 aproximadamente 86%; aproximadamente 87%; aproximadamente 88%; aproximadamente 89%; aproximadamente 90%; aproximadamente 91%; aproximadamente 92%; aproximadamente 93%; aproximadamente 94%; aproximadamente 95%; aproximadamente 96%; aproximadamente 97%; aproximadamente 98%; aproximadamente 98,5%; aproximadamente 99%; aproximadamente 99,5%; y aproximadamente 100%. La propiedad de homología sustancial está estrechamente relacionada con la hibridación específica. Por ejemplo, una molécula de ácido 35 nucleico es hibridable específicamente cuando hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del ácido nucleico a secuencias no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, por ejemplo, en condiciones de hibridación severas.

40 Como se emplea en la presente memoria, el término "ortólogo" se refiere a un gen en dos o más especies que ha evolucionado a partir de una secuencia de nucleótidos ancestral común, y puede conservar la misma función en las dos o más especies.

45 Como se emplea en la presente memoria, se dice que dos moléculas de la secuencia de ácido nucleico presentan "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una secuencia leída en la dirección 5' a 3' es complementaria a cada nucleótido de la otra secuencia cuando se lee en la dirección 3' a 5' dirección. Una secuencia de nucleótidos que sea complementaria a una secuencia de nucleótidos de referencia presentará una secuencia idéntica a la secuencia de complemento inversa de la secuencia de nucleótidos de referencia. Estas expresiones y descripciones están bien definidas en la técnica y los expertos en la materia las entienden fácilmente.

50 Cuando se determina el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de aminoácidos, los expertos en la técnica saben que la identidad del aminoácido en una posición dada proporcionada por una alineación puede diferir sin afectar las propiedades deseadas de los polipéptidos que comprenden el secuencias alineadas. En estos casos, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar para tener en cuenta la similitud entre los aminoácidos sustituidos de forma conservadora. Estos ajustes son bien conocidos y frecuentemente utilizados por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Myers y Miller (1988), *Computer Applications in Biosciences* 4: 11-7.

55 Las realizaciones de la invención incluyen variantes funcionales de secuencias de aminoácidos de péptidos de tránsito plasto ejemplares, y secuencias de ácido nucleico que las codifican. Una variante funcional de una secuencia peptídica de tránsito ejemplar puede ser, por ejemplo, un fragmento de una secuencia de aminoácidos de péptidos de tránsito ejemplar (como un fragmento del terminal N o del terminal C), o una secuencia modificada de una secuencia de aminoácidos del péptido de tránsito ejemplar completo o un fragmento de una secuencia de aminoácidos del péptido de tránsito ejemplar. Una secuencia de aminoácidos del péptido de tránsito ejemplar puede

modificarse en algunas realizaciones introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras. Una sustitución de aminoácido "conservadora" es aquella en la que el resto aminoácido es reemplazado por un resto aminoácido que tiene una cadena lateral funcional similar, tamaño similar, y/o hidrofobia similar. Se conocen en la técnica familias de aminoácidos que pueden usarse para reemplazar otro aminoácido de la misma familia para introducir una sustitución conservadora. Por ejemplo, estas familias de aminoácidos incluyen: aminoácidos básicos (p. ej., lisina, arginina e histidina); aminoácidos ácidos (p. ej., ácido aspártico y ácido glutámico); aminoácidos polares sin carga (a pH fisiológico) (p. ej., glicina, asparaginas, glutamina, serina, treonina, tirosina y citosina); aminoácidos apolares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano); aminoácidos ramificados en beta (p. ej., treonina, valina e isoleucina); y aminoácidos aromáticos (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina). Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (Eds.), anteriormente; e Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1990, Academic Press, NY, EE.UU.

Operativamente unida: una primera secuencia de nucleótidos está "operativamente unida" a una segunda secuencia de nucleótidos cuando la primera secuencia de nucleótidos está en una relación funcional con la segunda secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, un activador está operativamente unido a una secuencia de codificación si el activador afecta la transcripción o expresión de la secuencia de codificación. Cuando se producen por recombinación, las secuencias de nucleótidos operativamente unidas están generalmente contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificadoras de proteínas, en el mismo marco de lectura. Sin embargo, las secuencias de nucleótidos no necesitan estar contiguas para estar operativamente unidas.

La expresión "operativamente unida", cuando se emplea en referencia a una secuencia reguladora y a una secuencia de codificación, significa que la secuencia reguladora afecta a la expresión de la secuencia de codificación unida. "Secuencias reguladoras" o "elementos de control" se refieren a las secuencias de nucleótidos que influyen en el tiempo y contenido/cantidad de transcripción, tratamiento o estabilidad del ARN, o traducción de la secuencia de codificación asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir activadores; secuencias principales de traducción; intrones; potenciadores; estructuras en horquilla; secuencias de unión a represor; secuencias de terminación; secuencias de reconocimiento de poliadenilación; etc. Determinadas secuencias reguladoras pueden estar situadas aguas arriba y/o aguas abajo de una secuencia de codificación operativamente unida a ellas. También, determinadas secuencias reguladoras operativamente unidas a una secuencia de codificación pueden estar situadas en la cadena complementaria asociada de una molécula de ácido nucleico bicatenaria.

Cuando se emplea en referencia a dos o más secuencias de aminoácidos, la expresión "operativamente unida" significa que la primera secuencia de aminoácidos está en una relación funcional con al menos una de las secuencias de aminoácidos adicionales. Por ejemplo, un péptido de tránsito (p. ej., un CTP) está operativamente unido a una segunda secuencia de aminoácidos dentro de un polipéptido que comprende ambas secuencias si el péptido de tránsito afecta la expresión o el tránsito del polipéptido o la segunda secuencia de aminoácidos.

Activador: Como se emplea en la presente memoria, el término "activador" se refiere a una región de ADN que puede estar aguas arriba del inicio de la transcripción, y que puede estar involucrada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un activador puede estar operativamente unido a una secuencia codificadora para la expresión en una célula, o un activador puede estar operativamente unido a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal que puede estar operativamente unida a una secuencia codificadora para la expresión en una célula. Un "activador vegetal" puede ser un activador capaz de iniciar la transcripción en células vegetales. Los ejemplos de activadores bajo control del desarrollo incluyen activadores que preferentemente inician la transcripción en determinados tejidos, tales como hojas, raíces, semillas, fibras, vasos de xilema, traqueidas o esclerenquima. Dichos activadores se denominan "preferidos del tejido". Los activadores que inician la transcripción solo en algunos tejidos se denominan "específicos del tejido". Un activador "específico del tipo celular" dirige principalmente la expresión en determinados tipos de células en uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares en raíces u hojas. Un activador "inducible" puede ser un activador que puede estar bajo control ambiental. Ejemplos de condiciones ambientales que pueden iniciar la transcripción por activadores inducibles incluyen condiciones anaeróbicas y la presencia de luz. Los activadores específicos del tejido, preferidos del tejido, específicos de tipo celular e inducibles constituyen la clase de activadores "no constitutivos". Un activador "constitutivo" es un activador que puede estar activo en la mayoría de las condiciones ambientales.

Se puede usar cualquier activador inducible en algunas realizaciones de la invención. Véase Ward *et al.* (1993), *Plant Mol. Biol.* 22:361-366. Con un activador inducible, el índice de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Ejemplos de activadores inducibles incluyen, entre otros, los siguientes: Activadores del sistema ACEI que responden al cobre; gen *In2* del maíz que responde a los protectores del herbicida de bencenosulfonamida; represor Tet de Tn10; y el activador inducible de un gen de la hormona esteroide, cuya actividad transcripcional puede ser proveniente de una hormona glucocorticosteroide (Schena *et al.* (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:0421).

Los activadores constitutivos ejemplares incluyen, entre otros: Activadores de virus de plantas, tal como el activador 35S de CaMV; activadores de genes de actina del arroz; activadores de ubiquitina; pEMU; MAS; activador de histonas H3 del maíz; y el activador ALS, fragmento 5' Xba1/NcoI al gen estructural *ALS3* de *Brassica napus* (o una similitud de secuencia de nucleótidos con dicho fragmento Xba1/NcoI) (Publicación Internacional PCT nº WO 96/30530).

Además, cualquier activador específico del tejido o preferido del tejido se puede utilizar en algunas realizaciones de la invención. Las plantas transformadas con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación operativamente unida a un activador específico del tejido pueden producir el producto de la secuencia de codificación exclusivamente, o preferentemente, en un tejido específico. Los ejemplos de activadores específicos de tejido o preferidos de tejido incluyen, entre otros: Un activador preferido de la raíz, tal como el del gen de faseolina; un activador específico de la hoja e inducido por la luz, tal como el de *cab* o *RuBisCO*; un activador específico de la antera, como el de *LAT52*; un activador específico del polen tal como el de *Zm13*; y un activador preferido de microesporas, tal como el de *apg*.

Transformación: Como se emplea en la presente memoria, el término "transformación" o "transducción" se refiere a la transferencia de una o más moléculas de ácido nucleico a una célula. Una célula es "transformada" por una molécula de ácido nucleico transducida en la célula cuando la molécula de ácido nucleico se replica de manera estable por la célula, ya sea por la incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular, o por replicación episómica. Como se emplea en la presente memoria, el término "transformación" abarca todas las técnicas mediante las cuales se puede introducir una molécula de ácido nucleico en dicha célula. Los ejemplos incluyen, entre otros: transfección con vectores víricos; transformación con vectores plasmídicos; electroporación (Fromm *et al.* (1986), *Nature* 319:791-3); lipofección (Feigner *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7); microinyección (Mueller *et al.* (1978), *Cell* 15:579-85); transferencia mediada por *Agrobacterium* (Fraley *et al.* (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7); absorción directa de ADN; y bombardeo con microproyectiles (Klein *et al.* (1987), *Nature* 327:70).

Transgen: Una secuencia exógena de ácido nucleico. En algunos ejemplos, un transgén puede ser una secuencia que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*. En determinados ejemplos, un transgén puede codificar un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* y al menos una secuencia peptídica adicional (p. ej., una secuencia peptídica que confiere resistencia a herbicidas), para la cual es deseable la expresión del plasto. En estos y otros ejemplos, un transgén puede contener secuencias reguladoras unidas operativamente a una secuencia de codificación del transgén (p. ej., un activador). A los efectos de esta descripción, el término "transgénico" cuando se emplea para referirse a un organismo (p. ej., una planta), se refiere a un organismo que comprende la secuencia de ácido nucleico exógena. En algunos ejemplos, el organismo que comprende la secuencia de ácido nucleico exógena puede ser un organismo en el que se introdujo la secuencia de ácido nucleico mediante técnicas de transformación molecular. En otros ejemplos, el organismo que comprende la secuencia de ácido nucleico exógena puede ser un organismo en el que se introdujo la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, por introgresión o polinización cruzada en una planta.

Transporte: Como se emplea en la presente memoria, los términos "transporte(s)", "objetivo(s)" y "transferencia(s)" se refieren a la propiedad de ciertas secuencias de aminoácidos de la invención que facilitan el movimiento de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del núcleo de una célula anfitriona en un plasto de la célula anfitriona. En determinadas realizaciones, dicha secuencia de aminoácidos (es decir, una secuencia CTP sintética procedente de *Brassica*) puede ser capaz de transportar aproximadamente el 100%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 60% y/o al menos aproximadamente 50% de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos en plastos de una célula anfitriona.

Vector: Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula, por ejemplo, para producir una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permitan replicarse en la célula anfitriona, como un origen de replicación. Los ejemplos de vectores incluyen, entre otros: un plásmido; cósmido; bacteriófago; o virus que transporta ADN exógeno a una célula. Un vector también puede incluir uno o más genes, moléculas complementarias y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, lo que hace que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico y/o las proteínas codificadas por el vector. Un vector incluye opcionalmente materiales para ayudar a lograr la entrada de la molécula de ácido nucleico en la célula (p. ej., un liposoma, recubrimiento de proteínas, etc.).

Como se emplea en la presente memoria, a menos que se indique o implique específicamente, los términos "un", "uno" y "el", "la" y sus formas en plural significan "al menos uno".

A menos que se explique específicamente de otra manera, toda la terminología técnica y científica utilizada en la presente memoria tiene el mismo significado que los entendidos normalmente por los expertos en la técnica a los que pertenece esta descripción. Las definiciones de términos frecuentes en biología molecular se pueden encontrar, por ejemplo, en Lewin B., *Genes V*, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Meyers R. A. (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Todos los porcentajes están expresados en peso y todas las proporciones de la mezcla de disolventes están expresadas en volumen, a menos que se indique lo contrario. Todas las temperaturas están expresadas en grados Celsius.

IV. Moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia codificadora de CTP sintético procedente de *Brassica*.

En algunas realizaciones, esta descripción proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* operativamente unida a una secuencia de nucleótidos de interés. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de interés puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés. En determinados ejemplos, se proporciona una única molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido en el que una secuencia de TraP8 o TraP9 se fusiona al terminal N de un polipéptido de interés.

Un CTP sintético procedente de *Brassica* puede proceder de un gen EPSPS de *Brassica*. En determinados ejemplos, el gen EPSPS de *Brassica* puede ser uno que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEQ ID NO: 14, o una secuencia homóloga de ácido nucleico de un gen diferente de EPSPS, o puede ser un ortólogo del gen EPSPS de *Brassica* que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEQ ID NO: 14 (por ejemplo, el gen EPSPS de *Brassica* que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEQ ID NO: 15).

En algunas realizaciones, un péptido de tránsito de cloroplasto sintético de *Brassica* sintético puede ser un CTP híbrido procedente de *Brassica*. Un CTP híbrido sintético de *Brassica* puede proceder de una secuencia de CTP de *Brassica* de referencia uniendo una primera secuencia de aminoácidos contigua comprendida dentro de la secuencia de CTP de *Brassica* de referencia a una segunda secuencia de aminoácidos contigua comprendida dentro de una secuencia de CTP diferente (p. ej., una segunda secuencia de CTP de *Brassica*). En determinadas realizaciones, la secuencia de CTP diferente que comprende la segunda secuencia de aminoácidos contigua puede ser codificada por una secuencia génica homóloga de un genoma diferente al de *Brassica* sp. a partir de la cual se obtuvo una secuencia de referencia (p. ej., una *Brassica* sp. diferente, una planta distinta de *Brassica* sp.; un eucariota fotosintético inferior, por ejemplo, un clorofito; y un procarionta, por ejemplo, un *Cyanobacterium* o *Agrobacterium*). Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético proveniente de *Brassica* puede proceder de una secuencia codificadora de genes de CTP de *Brassica* de referencia al fusionar una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos contigua de una secuencia de CTP de *Brassica* de referencia con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos contigua procedente de una secuencia de CTP diferente que es homóloga al resto de la secuencia de referencia de CTP de *Brassica*. En estos y otros ejemplos, la secuencia de aminoácidos contigua de la secuencia de referencia de CTP de *Brassica* se puede situar en el terminal 5' o en el terminal 3' del CTP sintético procedente de *Brassica*.

En algunas realizaciones, un CTP híbrido sintético de *Brassica* puede proceder de varias secuencias de CTP de *Brassica* (incluida una secuencia de CTP de referencia de *Brassica*) uniendo una secuencia de aminoácidos contigua comprendida en una secuencia de CTP de *Brassica* a una secuencia de aminoácidos contigua comprendida en una secuencia diferente de CTP de *Brassica*. En determinadas realizaciones, las diversas secuencias de CTP de *Brassica* pueden ser codificadas por secuencias de genes ortólogos en diferentes especies de *Brassica*. En algunos ejemplos, la variedad de secuencias de CTP de *Brassica* puede ser exactamente dos secuencias de CTP de *Brassica*. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP híbrido sintético de *Brassica* puede proceder de dos secuencias de genes codificadoras de CTP de *Brassica* homólogas (p. ej., sustancialmente homólogas) (p. ej., secuencias génicas ortólogas) fusionando la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos contigua de una de las secuencias de CTP de *Brassica* con la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos contigua de la otra de las secuencias de CTP de *Brassica* que es homóloga al resto de primera secuencia de CTP de *Brassica*. TraP8 y TraP9 son ejemplos ilustrativos de dicho CTP híbrido sintético procedente de *Brassica*.

Un experto en la técnica entenderá que, después de la selección de una primera secuencia de aminoácidos contigua dentro de una secuencia de CTP de *Brassica* de referencia, la identificación y selección de la secuencia de aminoácidos contigua del resto de una secuencia de CTP homóloga según el anterior proceso de derivación es inequívoco y automático. En algunos ejemplos, la primera secuencia de aminoácidos contigua puede tener una longitud de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 41 aminoácidos (p. ej., 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42 aminoácidos de longitud). En algunas realizaciones, la primera secuencia de aminoácidos contigua dentro de la secuencia de CTP de *Brassica* de referencia se define por la posición en el terminal 3' de un motivo "SVSL" (SEQ ID n°: 13) que se conserva dentro de algunos genes EPSPS de *Brassica*.

Los ejemplos de secuencias de CTP sintético procedentes de *Brassica* híbridas según el proceso anterior están representados por la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4. En vista de la degeneración del código genético, el experto en la técnica vislumbrará inmediatamente el género de secuencias de nucleótidos que codifican estos péptidos. Los ejemplos de dichas secuencias de polinucleótidos incluyen las SEQ ID n°: 5, 6, 8 y 9. Estos ejemplos concretos ilustran las características estructurales de los CTP híbridos sintéticos procedentes de *Brassica* incorporando secuencias contiguas de un CTP homólogo de uno de varios ortólogos de EPSPS de un gen EPSPS de *B. napus*.

Se describen variantes funcionales de un péptido de tránsito sintético de cloroplasto procedente de *Brassica*, y/o ácidos nucleicos que codifican el mismo. Dichas variantes funcionales incluyen, por ejemplo y sin limitación: una secuencia codificadora de CTP sintético procedente de *Brassica* que procede de un homólogo y/u ortólogo de una o

ambas secuencias codificadoras de CTP de *Brassica* expuestas como SEQ ID n°: 14 y/o SEQ ID n°: 15, y/o un CTP codificado por la misma; un ácido nucleico que codifica un CTP sintetizado procedente de *Brassica* que comprende una secuencia de aminoácidos contigua dentro de la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2, y/o un CTP codificado por el mismo; una secuencia codificadora de CTP sintético truncado procedente de *Brassica* que comprende una

5 secuencia de ácido nucleico contigua dentro de una de las SEQ ID NO: 5, 6, 8 y 9; una secuencia codificadora de CTP sintético truncado procedente de *Brassica* que comprende una secuencia de ácido nucleico contigua que es sustancialmente homóloga a una de las SEQ ID NO: 5, 6, 8 y 9; un CTP sintético truncado procedente de *Brassica* que comprende una secuencia de aminoácidos contigua dentro de una de las SEQ ID NO: 3 y 4; un ácido nucleico que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* que comprende una secuencia de aminoácidos contigua

10 dentro de una de las SEQ ID NO: 5, 6, 8 y 9, y/o un CTP codificado por el mismo; un ácido nucleico que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* que comprende una secuencia de aminoácidos contigua dentro de una de las SEQ ID NO: 3 y 4 que tiene una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, y/o un CTP codificado por el mismo; y un ácido nucleico que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* que comprende una secuencia de aminoácidos contigua dentro de una de las SEQ ID NO: 3 y n°: 4 que tiene una o más sustituciones no

15 conservadoras de aminoácidos que está demostrado que se dirigen a un péptido operativamente unido a un plasto en una célula que contiene plastos y un CTP codificado por el mismo.

Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención incluyen una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP híbrido sintético procedente de *Brassica* que comprende una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. Dicha molécula de ácido nucleico puede ser útil, por ejemplo, para

20 facilitar la manipulación de una secuencia codificadora de CTP de la invención en técnicas de biología molecular. Por ejemplo, una secuencia codificadora de CTP de la invención puede introducirse en un vector adecuado para la subclonación de la secuencia en un vector de expresión, o una secuencia codificadora de CTP de la invención puede introducirse en una molécula de ácido nucleico que facilita la producción de otra molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia codificadora de CTP operativamente unida a una secuencia de nucleótidos de interés.

25 Una o más posiciones de aminoácidos en la secuencia de un CTP híbrido sintético procedente de *Brassica* se pueden eliminar. Por ejemplo, la secuencia de un CTP híbrido sintético procedente de *Brassica* se puede modificar de tal manera que el/los aminoácido(s) en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 se eliminan en la secuencia. Puede usarse una alineación de secuencias de CTP homólogas para proporcionar una orientación sobre qué aminoácidos pueden eliminarse sin afectar la función de la CTP sintética.

30 En determinados ejemplos, un péptido de tránsito de cloroplasto sintético procedente de *Brassica* tiene menos de 80 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, un CTP sintético procedente puede tener 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60 o menos aminoácidos de longitud. En algunos ejemplos, un CTP sintético procedente de *Brassica* puede tener aproximadamente 65, aproximadamente 68, aproximadamente 72 o

35 aproximadamente 74 aminoácidos de longitud. En estos y otros ejemplos, un CTP sintético procedente de *Brassica* puede comprender una secuencia de aminoácidos expuesta en una de las SEQ ID NO: 3 y n°: 4, o una variante funcional de cualquiera de los anteriores. Por lo tanto, un CTP sintético procedente de *Brassica* puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende una de las SEQ ID NO: 3 y n°: 4 o una variante funcional de las mismas, en donde la longitud del CTP sintético procedente de *Brassica* tiene una longitud menor de 80 aminoácidos.

40 En algunos ejemplos, un CTP sintético procedente de *Brassica* puede comprender una secuencia de aminoácidos que es, p. ej., al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a una de las SEQ ID NO: 3 y n°: 4.

Todas las secuencias de nucleótidos que codifican un determinado CTP sintético procedente de *Brassica*, por ejemplo, el péptido TraP8 de SEQ ID n°: 3 y el péptido TraP9 de SEQ ID n°: 4, o variantes funcionales de cualquiera de los anteriores, incluidas algunas supresiones específicas y/o sustituciones conservadoras de aminoácidos, serán

45 reconocibles por los expertos en la técnica en vista de la presente descripción. La degeneración del código genético proporciona un número finito de secuencias de codificación para una secuencia de aminoácidos determinada. La selección de una secuencia determinada para codificar un CTP sintético procedente de *Brassica* está dentro del criterio del profesional. Diferentes secuencias de codificación pueden ser deseables en diferentes aplicaciones. Por ejemplo, para aumentar la expresión del CTP sintético procedente de *Brassica* en un determinado anfitrión, se

50 puede seleccionar una secuencia de codificación que refleje el sesgo de uso del codón del anfitrión. A modo de ejemplo, un CTP sintético procedente de *Brassica* puede ser codificado por una secuencia de nucleótidos expuesta como una de las SEQ ID NO: 5, n°: 6, n°: 8 y n°: 9.

En las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en algunas realizaciones de la invención, el último codón de una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* y el primer codón de una secuencia

55 de nucleótidos de interés puede estar separado por cualquier número de tripletes de nucleótidos, p. ej., sin codificar por un intrón o una "TERMINACIÓN". En algunos ejemplos, una secuencia que codifica los primeros aminoácidos de una proteína madura normalmente asociada con un péptido de tránsito de cloroplasto en un polipéptido precursor natural puede estar presente entre el último codón de una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* y el primer codón de una secuencia de nucleótidos de interés. Una secuencia que separa

60 una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* y el primer codón de una secuencia de nucleótidos de interés puede consistir, por ejemplo, en cualquier secuencia, de modo que la secuencia de aminoácidos codificada no es probable que altere significativamente la traducción de polipéptido híbrido y su desplazamiento a un plasto. En estas y otras realizaciones, el último codón de una secuencia de nucleótidos que

codifica un péptido de tránsito de cloroplasto sintético procedente de *Brassica* puede fusionarse en un registro de fases con el primer codón de la secuencia nucleotídica de interés directamente contigua a éste, o separada de éste por no más de una secuencia corta de péptidos, tal como la codificada por un enlazador de nucleótidos sintético (p. ej. un enlazador de nucleótidos que puede haberse utilizado para conseguir la fusión).

- 5 Puede ser deseable modificar los nucleótidos de una secuencia de nucleótidos de interés y/o una secuencia codificadora de CTP sintético procedente de *Brassica* fusionada a la misma en una secuencia de codificación única, por ejemplo, para mejorar la expresión de la secuencia de codificación en un anfitrión concreto. El código genético es redundante con 64 codones posibles, pero la mayoría de los organismos utilizan preferentemente un subconjunto de estos codones. Los codones que se utilizan con mayor frecuencia en una especie se denominan codones
- 10 óptimos, y los que no se utilizan muy a menudo se clasifican como codones raros o de bajo uso. Zhang *et al.* (1991), *Gene* 105:61-72. Los codones pueden sustituirse para reflejar el uso de codones preferido de un determinado anfitrión en un proceso a veces denominado "optimización de codones". Pueden prepararse secuencias de codificación optimizadas que contienen codones preferidos por un determinado anfitrión procariontario o eucariótico, por ejemplo, para aumentar el índice de traducción o para producir transcritos de ARN recombinado con
- 15 propiedades deseables (p. ej., una vida media más prolongada, en comparación con los transcritos producidos a partir de una secuencia no optimizada).

- Cualquier polipéptido puede dirigirse a un plasto de una célula que contiene plastos por incorporación de una secuencia de CTP sintético procedente de *Brassica*. Por ejemplo, un polipéptido puede estar unido a una secuencia de CTP sintético procedente de *Brassica* en algunas realizaciones, a fin de dirigir el polipéptido a un plasto en una
- 20 célula en la que se expresa la molécula de polipéptido-CTP unida. En determinadas realizaciones, un polipéptido dirigido a un plasto mediante la incorporación de una secuencia de CTP sintético procedente de *Brassica* puede ser, por ejemplo, un polipéptido que normalmente se expresa en un plasto de una célula en donde el polipéptido se expresa de forma natural. Por ejemplo, y sin limitación, un polipéptido dirigido a un plasto por incorporación de una secuencia de CTP sintético procedente de *Brassica* puede ser, por ejemplo, un polipéptido involucrado en la
- 25 resistencia a herbicidas, resistencia a virus, resistencia a patógenos bacterianos, resistencia a insectos, resistencia a nematodos o resistencia a hongos. Véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. nº 5.569.823; nº 5.304.730; nº 5.495.071; nº 6.329.504 y nº 6.337.431. Un polipéptido dirigido a un plasto mediante la incorporación de una secuencia de CTP sintético procedente de *Brassica* puede ser alternativamente, por ejemplo y sin limitación, un polipéptido involucrado en el vigor o rendimiento vegetal (incluidos los polipéptidos involucrados en la tolerancia a temperaturas extremas,
- 30 condiciones del suelo, niveles de luz, niveles de agua y entorno químico), o un polipéptido que se puede usar como marcador para identificar una planta que comprende un rasgo de interés (p. ej., un producto génico de marcador seleccionable, un polipéptido involucrado en el color de la semilla, etc.).

- Los ejemplos no restrictivos de polipéptidos involucrados en la resistencia a herbicidas que pueden estar unidos a una secuencia de CTP sintético proveniente de *Brassica* en algunas realizaciones de la invención incluyen:
- 35 acetolactasa sintasa (ALS), ALS mutada y precursores de ALS (véase, p. ej., la patente de EE. UU. nº 5.013.659); EPSPS (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. nº 4.971.908 y nº 6.225.114), tales como una EPS4 de CP4, una EPSPS de clase III o una EPSPS de clase IV; enzimas que modifican un proceso fisiológico que se produce en un plasto, incluida la fotosíntesis, y la síntesis de ácidos grasos, aminoácidos, aceites, carotenoides, terpenoides, almidón, etc. Otros ejemplos no restrictivos de polipéptidos que pueden estar unidos a un péptido de tránsito
- 40 sintético de cloroplasto procedente de *Brassica* en determinadas realizaciones incluyen: zeaxantina epoxidasa, colina monooxigenasa, ferroquelatasa, ácido graso omega-3 desaturasa, glutamina sintetasa, enzimas modificadoras del almidón, polipéptidos implicados en la síntesis de aminoácidos esenciales, provitamina A, hormonas, proteínas de la toxina Bt, etc. Las secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos mencionados anteriormente son conocidas en la técnica, y dichas secuencias de nucleótidos pueden unirse operativamente a una
- 45 secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* para ser expresado en un polipéptido que comprende el polipéptido de interés unido al CTP sintético procedente de *Brassica*. Además, los expertos en la técnica pueden identificar secuencias de nucleótidos adicionales que codifican cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente (por ejemplo, por clonación de genes con alta homología con otros genes que codifican el polipéptido concreto). Una vez que se ha identificado dicha secuencia de nucleótidos, es un
- 50 procedimiento sencillo para diseñar una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia que codifica el CTP sintético procedente de *Brassica* operativamente unida a la secuencia nucleotídica identificada, o una secuencia que codifica un polipéptido equivalente.

V. Expresión de polipéptidos que comprenden un péptido de tránsito de cloroplasto sintético procedente de *Brassica*

- En algunas realizaciones, al menos una o más moléculas de ácido nucleico que comprende(n) una secuencia de
- 55 nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*, puede introducirse en una célula, tejido u organismo para la expresión de polipéptido en el mismo. En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos de interés operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica*. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia codificadora que codifica un polipéptido
- 60 que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* y al menos una secuencia peptídica adicional codificada por una secuencia de nucleótidos de interés. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención puede introducirse en una célula, tejido u organismo anfitrión que contiene plastos (p. ej., una célula

vegetal, tejido vegetal y planta), de modo que un polipéptido pueda expresarse a partir de la molécula de ácido nucleico en la célula, tejido u organismo anfitrión que contiene plasto, en donde el polipéptido expresado comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* y al menos una secuencia peptídica adicional codificada por una secuencia de nucleótidos de interés. En algunos ejemplos, el CTP sintético procedente de *Brassica* de dicho polipéptido expresado puede facilitar el direccionamiento de una porción del polipéptido que comprende al menos la secuencia peptídica adicional a un plasto de la célula, tejido u organismo anfitrión.

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención puede introducirse en una célula que contiene plastos por cualquiera de las metodologías conocidas por los expertos en la técnica. En determinadas realizaciones, una célula, tejido u organismo anfitrión puede ponerse en contacto con una molécula de ácido nucleico de la invención para introducir la molécula de ácido nucleico en la célula, tejido u organismo. En determinadas realizaciones, una célula puede transformarse con una molécula de ácido nucleico de la invención de manera que la molécula de ácido nucleico se introduzca en la célula, y la molécula de ácido nucleico se integre de manera estable en el genoma de la célula. En algunas realizaciones, se puede usar una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP sintético procedente de *Brassica* operativamente unido a una secuencia de nucleótidos de interés para la transformación de una célula, por ejemplo, una célula que contiene plastos (por ejemplo, una célula vegetal). Con el fin de iniciar o mejorar la expresión, una molécula de ácido nucleico puede comprender una o más secuencias reguladoras, secuencias reguladoras que pueden unirse operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*.

Una molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un sistema vectorial que incluye, por ejemplo, un plásmido circular cerrado o lineal. En determinadas realizaciones, el vector puede ser un vector de expresión. Las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden insertarse, por ejemplo, en un vector, de modo que la secuencia de ácido nucleico esté operativamente unida a una o más secuencias reguladoras. Hay muchos vectores disponibles para este propósito, y la selección de cada vector puede depender, por ejemplo, del tamaño del ácido nucleico que se insertará en el vector y de cada célula anfitriona que se transformará con el vector. Un vector generalmente contiene varios componentes, cuya identidad depende de la función del vector (p. ej., la amplificación del ADN y la expresión del ADN), y de la(s) célula(s) anfitriona(s) concreta(s) con las que el vector es compatible.

Algunas realizaciones pueden incluir un vector de transformación de plantas que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos una de las secuencias reguladoras descritas anteriormente operativamente unidas a una o más secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*. Una o más secuencias de nucleótidos pueden expresarse, bajo el control de la secuencia o secuencias reguladoras, en una célula, tejido u organismo vegetal para producir un polipéptido que comprende un CTP sintético procedente de *Brassica* que dirige al menos una porción del polipéptido a un plasto de la célula vegetal, tejido u organismo.

En algunas realizaciones, una secuencia reguladora operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*, puede ser una secuencia activadora que funciona en una célula anfitriona, como una célula bacteriana en la que la molécula de ácido nucleico se va a amplificar, o una célula vegetal en la que se va a expresar la molécula de ácido nucleico. Los activadores adecuados para su uso en las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen los que son inducibles, víricos, sintéticos o constitutivos, todos los cuales son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no restrictivos de activadores que pueden ser útiles en realizaciones de la invención son proporcionados por: las patentes de EE. UU. nº 6.437.217 (activador RS81 del maíz); nº 5.641.876 (activador de la actina del arroz); nº 6.426.446 (activador RS324 del maíz); nº 6.429.362 (activador PR-1 del maíz); nº 6.232.526 (activador A3 del maíz); nº 6.177.611 (activadores constitutivos del maíz); nº 5.322.938, nº 5.352.605, nº 5.359.142 y nº 5.530.196 (activador 35S); nº 6.433.252 (activador de oleosina L3 de maíz); nº 6.429.357 (activador de la actina 2 del arroz e intrón de la actina 2 del arroz); nº 6.294.714 (activadores inducibles por luz); nº 6.140.078 (activadores inducibles por sal); nº 6.252.138 (activadores inducibles por patógenos); nº 6.175.060 (activadores inducibles por insuficiencia de fósforo); nº 6.388.170 (activadores bidireccionales); nº 6.635.806 (activador de gamma coixina); y la solicitud de patente de EE.UU. con número de serie 09/757.089 (activador de la aldolasa de cloroplasto de maíz).

Otros activadores ejemplares incluyen el activador de la nopalina sintasa (NOS) (Ebert *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(16):5745-9); el activador de la octopina sintasa (OCS) (que es transportado en plásmidos inductores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*); los activadores de caulimovirus tales como el activador 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Lawton *et al.* (1987), *Plant Mol. Biol.* 9:315-24); el activador 35S de CaMV (Odell *et al.* (1985), *Nature* 313:810-2); el activador 35S del virus del mosaico de la escrofularia (Walker *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(19):6624-8); el activador de sacarosa sintasa (Yang y Russell (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4144-8); el activador del complejo del gen R (Chandler *et al.* (1989), *Plant Cell* 1:1175-83); el activador del gen de la proteína de unión de la clorofila a/b; CaMV35S (patentes de EE. UU. nº 5.322.938, nº 5.352.605, nº 5.359.142 y nº 5.530.196); FMV35S (patentes de EE. UU. nº 6.051.753 y nº 5.378.619); un activador PC1SV (Patente de EE.UU. nº 5.850.019); el activador SCP1 (Patente de EE. UU. nº 6.677.503); y los activadores AGRtu.nos (número de registro en GenBank V00087; Depicker *et al.* (1982), *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-73; Bevan *et al.* (1983), *Nature* 304:184-7).

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden comprender un activador específico de tejido. Un activador específico de tejido es una secuencia de nucleótidos que dirige un nivel de transcripción más alto de una secuencia de nucleótidos operativamente unida en el tejido para el cual el activador es específico, en relación con los otros tejidos del organismo. Los ejemplos de activadores específicos de tejido incluyen, sin limitación: activadores
 5 específicos del tapete; activadores específicos de la antera; activadores específicos del polen (véanse, p. ej., la patente de EE.UU. n° 7.141.424 y la publicación internacional PCT n° WO 99/042587); activadores específicos del óvulo; (véase, p. ej., la solicitud de patente de EE.UU. n° 2001/047525 A1); activadores específicos del fruto (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. n° 4.943.674 y 5.753.475); y activadores específicos de la semilla (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. n° 5.420.034 y 5.608.152). Un activador específico de la etapa de desarrollo (p. ej., un
 10 activador activo en una etapa posterior del desarrollo) puede usarse en una composición o método de la invención.

Las secuencias reguladoras adicionales que pueden estar operativamente unidas a una molécula de ácido nucleico incluyen UTR 5' situadas entre una secuencia activadora y una secuencia codificadora que funciona como una secuencia principal de traducción. La secuencia principal de la traducción está presente en el ARNm completamente
 15 tratado, y puede afectar el tratamiento de la transcripción primaria y/o la estabilidad del ARN. Los ejemplos de secuencias principales de la traducción incluyen las principales proteínas de choque térmico del maíz y la petunia (patente de EE. UU. n° 5.362.865), las proteínas principales de la cubierta vírica de la planta, las principales de rubisco de la planta y otras. Véase, por ejemplo, Turner y Foster (1995), *Molecular Biotech.* 3(3):225-36. Ejemplos no restrictivos de 5' UTR son proporcionados por: GmHsp (Patente de EE.UU. n° 5.659.122); PhDnaK (Patente de EE.UU n° 5.362.865); AtAnt1; TEV (Carrington y Freed (1990), *J. Virol.* 64: 1590-7); y AGRtunos (n° de registro en
 20 GenBank V00087; y Bevan *et al.* (1983), *Nature* 304:184-7).

Las secuencias reguladoras adicionales que en algunas realizaciones pueden estar operativamente unidas a una molécula de ácido nucleico también incluyen secuencias no traducidas 3', regiones de terminación de la transcripción 3' o regiones de poliadenilación. Estas son elementos genéticos situados aguas abajo de una
 25 secuencia de nucleótidos e incluyen polinucleótidos que proporcionan una señal de poliadenilación y/u otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción o el tratamiento del ARNm. La señal de poliadenilación funciona en las plantas para producir la adición de nucleótidos de poliadenilato al terminal 3' del precursor de ARNm. La secuencia de poliadenilación puede proceder de una variedad de genes vegetales, o de genes de T-ADN. Un ejemplo no restrictivo de una región de terminación de la transcripción 3' es la región 3' de la nopalina sintasa (nos 3'; Fraley *et al.* (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7). Un ejemplo del uso de diferentes regiones 3' no
 30 traducidas se proporciona en Ingelbrecht *et al.*, (1989), *Plant Cell* 1: 671-80. Los ejemplos no restrictivos de señales de poliadenilación incluyen uno entre un gen RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi *et al.* (1984), *EMBO J.* 3:1671-9) y AGRtu.nos (n° de registro E01312 en GenBank).

Una molécula de ácido nucleico recombinado o el vector de la presente invención pueden comprender un marcador seleccionable que confiere un fenotipo seleccionable en una célula transformada, tal como una célula vegetal. Los
 35 marcadores seleccionables también se pueden usar para seleccionar plantas o células vegetales que comprenden la molécula de ácido nucleico recombinada de la invención. El marcador puede codificar la resistencia a los biocidas, la resistencia a los antibióticos (p. ej., kanamicina, genéctica (G418), bleomicina, higromicina, etc.), o la resistencia a los herbicidas (p. ej., glifosato, etc.). Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, entre otros: un gen *neo* que codifica la resistencia a la kanamicina y se puede seleccionar para el uso de kanamicina, G418, etc.; un gen *pat*
 40 o *bar* que codifica la resistencia al bialafós; un gen de la EPSP sintasa mutante que codifica la resistencia al glifosato; un gen de nitrilasa que confiere resistencia a bromoxinil; un gen mutante de acetolactato sintasa (*ALS*) que confiere resistencia a la imidazolinona o sulfonilurea; y un gen DHFR resistente a metotrexato. Están disponibles múltiples marcadores seleccionables que confieren resistencia a la ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina, espectinomina,
 45 rifampicina, estreptomina y tetraciclina. Ejemplos de tales marcadores seleccionables se ilustran, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.550.318; n° 5.633.435; n° 5.780.708 y n° 6.118.047.

Una molécula de ácido nucleico recombinado o un vector de la presente invención puede también o alternativamente incluye un marcador seleccionable. Se pueden usar marcadores seleccionables para controlar la expresión. Los
 50 marcadores seleccionables ejemplares incluyen un gen de β -glucuronidasa o *uidA* (GUS) que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromógenos (Jefferson *et al.* (1987), *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405); un gen del locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta *et al.* (1988), "Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*." en el 18° Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson y R. Appels, eds. (Nueva York: Plenum), págs. 263-82); un gen de β -lactamasa (Sutcliffe *et al.* (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-41); un gen que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromógenos (p. ej., PADAC, una cefalosporina cromógena); un gen de luciferasa (Ow *et al.* (1986), *Science* 234: 856-9); un gen *xylE* que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromógenos (Zukowski *et al.* (1983), *Gene* 46(2-3): 247-55); un gen de amilasa (Ikata *et al.* (1990) *Bio/Technol.* 8: 241-2); un gen de tirosinasa que codifica una enzima capaz de oxidar la tirosina a DOPA y dopaquinona que a su vez se condensa a melanina (Katz *et al.* (1983), *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-14); y una α -
 60 galactosidasa.

Los métodos adecuados para la transformación de células anfitrionas incluyen cualquier método mediante el cual se pueda introducir ADN en una célula, por ejemplo y sin limitación: por transformación de protoplastos (véase, p. ej., la

patente de EE.UU. n° 5.508.184); por la absorción de ADN mediada por desecación/inhibición (véase, p. ej., Potrykus *et al.* (1985), *Mol. Gen. Genet.* 199:183-8); por electroporación (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 5.384.253); por agitación con fibras de carburo de silicio (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. n° 5.563.055, n° 5.591.616, n° 5.693.512, n° 5.824.877, n° 5.981.840 y n° 6.384.301); y por aceleración de partículas recubiertas con ADN (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.015.580, n° 5.550.318, n° 5.538.880, n° 6.160.208, n° 6.399.861 y n° 6.403.865); etc. Mediante la aplicación de técnicas como éstas, las células de prácticamente cualquier especie pueden transformarse de manera estable. En algunas realizaciones, el ADN transformante está integrado en el genoma de la célula anfitriona. En el caso de especies multicelulares, las células transgénicas pueden regenerarse en un organismo transgénico. Alternativamente, las células transgénicas pueden no ser capaces de regenerarse a una planta. Cualquiera de estas técnicas se puede usar para producir una planta transgénica, por ejemplo, que comprende una o más secuencias de ácido nucleico de la invención en el genoma de la planta transgénica.

El método más utilizado para introducir un vector de expresión en plantas se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo patógenas para las plantas que transforman genéticamente las células vegetales. Los plásmidos T_i y R_i de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, llevan genes responsables de la transformación genética de la planta. Los plásmidos T_i (inductores de tumores) contienen un segmento grande, conocido como T-ADN, que se transfiere a las plantas transformadas. Otro segmento del plásmido T_i, la región vir, es responsable de la transferencia de T-ADN. La región T-DNA está rodeada por repeticiones terminales. En algunos vectores binarios modificados, los genes inductores de tumores se han eliminado, y las funciones de la región vir se utilizan para transferir ADN extraño rodeado por las secuencias del borde del T-ADN. La región T también puede contener, por ejemplo, un marcador seleccionable para recuperar la eficiencia de plantas y células transgénicas, y un punto de clonación múltiple para insertar secuencias para transferir dicho ácido nucleico codificador del CTP sintético procedente de *Brassica*.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, un vector de transformación de plantas puede proceder de un plásmido T_i de *A. tumefaciens* (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n° 4.536.475, n° 4.693.977, n° 4.886.937 y n° 5.501.967; y la patente europea EP 0 122 791) o un plásmido R_i de *A. rhizogenes*. Los vectores adicionales de transformación de plantas incluyen, por ejemplo y sin limitación, los descritos por Herrera-Estrella *et al.* (1983), *Nature* 303:209-13; Bevan *et al.* (1983), *Nature* 304:184-7; Klee *et al.* (1985), *Bio/Technol* 3:637-42; y en la patente europea EP 0 120 516, y las procedentes de cualquiera de los anteriores. Otras bacterias como *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium* que interactúan con las plantas pueden modificarse de forma natural para mediar en la transferencia de genes a varias plantas diferentes. Estas bacterias simbióticas asociadas a las plantas pueden hacerse competentes para la transferencia de genes mediante la obtención tanto de un plásmido T_i desactivado como de un vector binario adecuado.

Después de proporcionar ADN exógeno a las células receptoras, las células transformadas generalmente se identifican para el cultivo y regeneración de la planta adicionales. Con el fin de mejorar la capacidad de identificar células transformadas, se puede desear emplear un gen marcador seleccionable o detectable, como se expuso anteriormente, con el vector usado para generar el transformante. En el caso en que se use un marcador seleccionable, las células transformadas se identifican dentro de la población de células potencialmente transformadas exponiendo las células a un agente o agentes selectivos. En el caso en que se use un marcador detectable, las células pueden detectarse para el rasgo genético del marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o las células que se han calificado como positivas en un ensayo de detección, pueden cultivarse en medios que apoyen la regeneración de las plantas. En algunas realizaciones, cualquier medio de cultivo de tejido vegetal adecuado (p. ej., medios MS y N6) puede modificarse incluyendo más sustancias, tales como reguladores del crecimiento. El tejido se puede mantener en un medio básico con reguladores de crecimiento hasta que haya suficiente tejido disponible para comenzar los esfuerzos de regeneración de la planta, o después de repetidas rondas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (p. ej., al menos 2 semanas), entonces se transfiere a medios propicios para la formación de brotes. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se ha producido suficiente formación de brotes. Una vez se forman los brotes, se transfieren a los medios propicios para la formación de raíces. Una vez se forman raíces suficientes, las plantas pueden transplantarse en el suelo para continuar el crecimiento y la madurez.

Para confirmar la presencia de una molécula de ácido nucleico de interés (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*) en una planta en regeneración, se puede realizar una variedad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo: ensayos de biología molecular, tales como transferencia Southern y Northern, PCR y secuenciación de ácidos nucleicos; ensayos bioquímicos, tales como la detección de la presencia de un producto proteico, p. ej., por medios inmunológicos (ELISA y/o transferencias de Western) o por función enzimática; ensayos de partes de las plantas, tales como ensayos en hojas o raíces; y análisis del fenotipo de toda la planta regenerada.

A modo de ejemplo, los casos de integración pueden analizarse por amplificación por PCR usando, p. ej., cebadores oligonucleotídicos específicos para una secuencia de nucleótidos de interés. El genotipado por PCR se entiende que incluye, pero no se limita a, la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN

genómico procedente de tejido de una planta anfitriona aislada que se prevé que contiene una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguida de una clonación convencional y análisis de secuencia de los productos de amplificación por PCR. Los métodos de genotipado por PCR se han descrito bien (véase, p. ej., Rios, G. *et al.* (2002), *Plant J.* 32: 243-53), y pueden aplicarse al ADN genómico procedente de cualquier especie vegetal (p. ej., *Z. Mays* o *G. max*) tipo de tejido, incluidos los cultivos celulares.

Una planta transgénica formada utilizando métodos de transformación dependientes de *Agrobacterium* contiene generalmente una única secuencia de ADN recombinado insertada en un cromosoma. La secuencia de ADN recombinado individual se denomina "caso transgénico" o "caso de integración". Dichas plantas transgénicas son heterocigóticas para la secuencia de ADN insertada. En algunas realizaciones, una planta transgénica homocigótica con respecto a un transgén puede obtenerse por apareamiento sexual (autofecundación) de una planta transgénica segregante independiente que contiene una sola secuencia de gen exógena para sí misma, por ejemplo, una planta F₀, para producir la semilla F₁. Una cuarta parte de la semilla F₁ producida será homocigótica con respecto al transgén. La germinación de la semilla F₁ produce plantas que pueden analizarse para determinar la heterocigosidad, usando normalmente un ensayo SNP o un ensayo de amplificación térmica que permite la distinción entre homocigóticos y heterocigóticos (es decir un ensayo de cigosidad).

En determinadas realizaciones, se producen copias de al menos un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* en una célula que contiene plastos, en la que se ha introducido al menos una(s) molécula(s) de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*. Cada polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* puede expresarse en múltiples secuencias de ácido nucleico introducidas en diferentes casos de transformación, o en una única secuencia de ácido nucleico introducida en un solo caso de transformación. En algunas realizaciones, un gran número de dichos polipéptidos se expresa bajo el control de un único activador. En otras realizaciones, un gran número de dichos polipéptidos se expresa bajo el control de múltiples activadores. Pueden expresarse polipéptidos individuales que comprenden múltiples secuencias peptídicas, cada una de dichas secuencias peptídicas es para dirigirse a un plasto.

Además de la transformación directa de una planta con una molécula de ácido nucleico recombinante, pueden prepararse plantas transgénicas cruzando una primera planta que tiene al menos un caso transgénico con una segunda planta que carece de dicho caso. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico recombinado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* puede introducirse en una primera línea de plantas que es sensible de transformación, para producir una planta transgénica, planta transgénica que puede cruzarse con una segunda línea de plantas para introducir la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en la segunda línea de plantas.

VI. Materiales vegetales que comprenden un polipéptido dirigido al péptido de tránsito sintético del cloroplasto procedente de Brassica

En algunas realizaciones, se proporciona una célula vegetal, en la que la célula vegetal comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*. Dicha célula vegetal puede producirse por transformación de una célula vegetal que no es capaz de regenerarse para producir una planta. En algunas realizaciones, se proporciona una planta, en donde la planta comprende una célula vegetal que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*. Dicha planta puede producirse por transformación de un tejido vegetal o una célula vegetal, y regeneración de una planta completa. Dicha planta puede obtenerse en un proveedor comercial, o por introgresión de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* en un plasma germinal. En determinadas realizaciones, una planta de este tipo comprende células vegetales que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* que no es capaz de regenerarse para producir una planta. También se proporcionan materiales vegetales que comprenden una célula vegetal que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*. Dicho material vegetal puede obtenerse a partir de una planta que comprende la célula vegetal.

Una planta transgénica, una célula vegetal no regenerable o material vegetal que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* puede presentar en algunas realizaciones una o más de las siguientes características: expresión del polipéptido en una célula de la planta; expresión de una parte del polipéptido en un plasto de una célula de la planta; importación del polipéptido del citosol de una célula de la planta en un plasto de la célula; expresión específica del plasto del polipéptido en una célula de la planta; y/o localización del polipéptido en una célula de la planta. Dicha planta puede tener además uno o más rasgos deseables distintos de la expresión del polipéptido codificado. Dichos rasgos pueden incluir, por ejemplo: resistencia a insectos, otras plagas y agentes causantes de enfermedades; tolerancias a los herbicidas; estabilidad mejorada, rendimiento o vida útil; tolerancias ambientales; producción farmacéutica; producción de productos industriales; y mejoras nutricionales.

Una planta transgénica según la invención puede ser cualquier planta capaz de transformarse con una molécula de

ácido nucleico de la invención. Por consiguiente, la planta puede ser una dicotiledónea o una monocotiledónea. Los ejemplos no restrictivos de plantas dicotiledóneas utilizables en los presentes métodos incluyen *Arabidopsis*, alfalfa, alubias, brocoli, repollo, zanahoria, coliflor, apio, repollo chino, algodón, pepino, berenjena, lechuga, melón, guisante, pimienta, cacahuete, patata, calabaza, rábano, colza, espinaca, soja, calabacín, remolacha azucarera, girasol, tabaco, tomate y sandía. Los ejemplos no restrictivos de plantas monocotiledóneas utilizables en los presentes métodos incluyen maíz, *Brassica*, cebolla, arroz, sorgo, trigo, centeno, mijo, caña de azúcar, avena, triticale, pasto varilla y césped. Las plantas transgénicas según la invención se pueden usar o cultivar de cualquier manera.

Algunas realizaciones también proporcionan productos básicos que contienen una o más secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*, por ejemplo, un producto básico producido a partir de una planta o semilla biotecnológica que contiene una o más de dichas secuencias de nucleótidos. Los productos básicos que contienen una o más secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* incluyen, por ejemplo y sin limitación: productos alimenticios, harinas, aceites triturados o íntegros o semillas de una planta que comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*. La detección de una o más secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* en uno o más materias primas o productos básicos es prueba de hecho de que la materia prima o el producto básico se produjo al menos en parte a partir de una planta que comprende una o más más secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*. En determinadas realizaciones, un producto básico de la invención comprende una cantidad detectable de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica*. En algunas realizaciones, dichos productos básicos pueden producirse, por ejemplo, obteniendo plantas transgénicas y preparando alimentos o piensos a partir de ellas.

En algunas realizaciones, una planta transgénica, una célula vegetal no regenerable o una semilla que comprende un transgén que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos un CTP sintético procedente de *Brassica* también puede comprender al menos otro caso transgénico en su genoma, incluyendo sin limitación: un caso transgénico a partir del cual se transcribe una molécula de ARNi; un gen que codifica una proteína insecticida (p. ej., una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*); un gen con tolerancia a herbicidas (p. ej., un gen que proporciona tolerancia al glifosato); y un gen que contribuye a un fenotipo deseable en la planta transgénica (p. ej., aumento del rendimiento, metabolismo alterado de los ácidos grasos o restauración de la esterilidad citoplásmica masculina).

VII. Localización de productos génicos a plastos mediada por péptidos de tránsito de cloroplasto sintético procedente de *Brassica*.

Se proporciona un método para la expresión y/o la localización de un producto génico en un plasto (p. ej., un cloroplasto). En especial, el producto génico puede ser un producto génico marcador, por ejemplo, una molécula fluorescente. La expresión del producto génico como parte de un polipéptido que también comprende un CTP sintético procedente de *Brassica* puede proporcionar un sistema para evaluar las capacidades de localización de plastos de una secuencia concreta de CTP sintético procedente de *Brassica*. La expresión de un producto génico marcador como parte de un polipéptido que contiene CTP sintético de *Brassica* se utiliza para dirigir la expresión del producto génico marcador a un plasto de una célula en la que se expresa el polipéptido. En algunos ejemplos, dicho producto génico marcador se localiza en el/los plasto(s) de la célula anfitriona. Por ejemplo, el producto génico marcador puede expresarse a niveles más altos en el/los plasto(s) que en el citosol u otros orgánulos de la célula anfitriona; el producto génico marcador puede expresarse a niveles mucho más altos en el/los plasto(s); el producto génico marcador puede expresarse esencialmente solo en el/los plasto(s); o el producto génico marcador puede expresarse completamente en el/los plasto(s), de manera que no se pueda detectar la expresión en el citosol o en las orgánulos sin plastos.

En algunos ejemplos, se usa un polipéptido que comprende una variante funcional de un CTP sintético procedente de *Brassica*, en donde el polipéptido está operativamente unido a un producto génico marcador para evaluar las características del péptido variante funcional. Por ejemplo, la secuencia de un CTP sintético procedente de *Brassica* se puede variar, p. ej., introduciendo al menos una mutación conservadora en el CTP sintético procedente de *Brassica*, y el péptido variante resultante se puede unir a un producto genético marcador. Después de la expresión en una célula anfitriona adecuada (por ejemplo, una célula en la que uno o más elementos reguladores en el montaje de la expresión son operables), se puede determinar la expresión del producto génico marcador. Al comparar la localización subcelular del producto génico marcador entre el montaje marcador de CTP sintético de referencia procedente de *Brassica* y el montaje péptido variante -marcador, se puede determinar si el péptido variante proporciona, por ejemplo, mayor localización de plastos, o localización de plastos sustancialmente idéntica. Dicha variante puede considerarse una variante funcional. Al identificar variantes funcionales del CTP sintético procedente de *Brassica* que proporciona mayor localización de plastos, las mutaciones en dichas variantes pueden incorporarse en otras variantes de los CTP sintéticos procedentes de *Brassica*. La realización de rondas múltiples de este proceso de evaluación, y posteriormente la incorporación de mutaciones favorables identificadas en una secuencia de CTP sintética procedente de *Brassica*, puede producir un proceso iterativo para la optimización de una secuencia de CTP sintético procedente de *Brassica*. Dichas secuencias de CTP sintéticas optimizadas procedentes de *Brassica*, y las secuencias de nucleótidos que las codifican, se consideran parte de la presente invención,

independientemente de que dichas secuencias de CTP sintético optimizado procedente de *Brassica* se puedan optimizar más mediante mutación adicional.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diseño y producción de secuencias de péptidos híbridos de tránsito de cloroplasto (TraP)

5 Los plastos son orgánulos citoplásmicos que se encuentran en especies de plantas superiores y están presentes en todos los tejidos vegetales. Los cloroplastos son un tipo específico de plasto que se encuentra en los tejidos fotosintéticos verdes que son responsables de las funciones fisiológicas esenciales. Por ejemplo, una de estas funciones fisiológicas primarias es la síntesis de aminoácidos aromáticos requeridos por la planta. En esta ruta biosintética se requieren enzimas nucleares codificadas y se transportan desde el citoplasma al interior del

10 cloroplasto. Estas enzimas nucleares codificadas generalmente poseen un péptido de tránsito en el terminal N que interactúa con la membrana del cloroplasto para facilitar el transporte del péptido al estroma del cloroplasto. Bruce B. (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Bio.* 10:440-447. Tras la importación, las peptidasas del estroma escinden el péptido de tránsito, dejando la proteína funcional madura importada dentro del cloroplasto. Richter S., Lamppa G. K. (1999) La peptidasa de tratamiento del estroma se une a

15 los péptidos de tránsito e inicia su recambio dependiente de ATP en los cloroplastos. *Journ. Cell Bio.* 147:33 - 43. Los péptidos de tránsito de cloroplastos son secuencias variables que son muy divergentes en longitud, composición y organización. Bruce B. (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Bio.* 10:440-447. Las similitudes de secuencia de péptidos de tránsito de cloroplastos divergen significativamente entre proteínas homólogas de diferentes especies vegetales. La cantidad de divergencia entre los péptidos de tránsito del

20 cloroplasto es inesperada dado que las proteínas homólogas obtenidas de diferentes especies vegetales suelen compartir niveles relativamente altos de similitud de secuencia cuando se compara la proteína funcional madura tratada.

Se diseñaron, produjeron y probaron nuevas secuencias de péptidos de tránsito del cloroplasto híbrido en plantas. Se demostró que los nuevos péptidos de tránsito de cloroplastos híbridos poseen propiedades de desplazamiento y

25 procesamiento eficaces para la importación de importantes proteínas agronómicas dentro del cloroplasto. Inicialmente, se analizaron secuencias de la proteína natural 5-enolpiruvil-3-fosfato sintasa (EPSPS) de diferentes especies de plantas a mediante el programa informático ChloroP™ para identificar supuestas secuencias de péptidos de tránsito de cloroplastos (Emanuelsson O., Nielsen H., von Heijne G., (1999) ChloroP , ChloroP™ a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites, *Protein Science* 8;

30 978-984), disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>. Una vez identificados los péptidos de tránsito de cloroplastos naturales, una primera secuencia de péptidos de tránsito de cloroplastos se alineó con una segunda secuencia de péptidos de tránsito de cloroplastos de un segundo organismo. La FIG. 17 ilustra la alineación de las secuencias de péptidos de tránsito de cloroplastos de EPSPS de *Brassica napus* (número de registro en NCBI: P17688) y *Brassica rapa* (número de registro en NCBI: AAS80163). Utilizando la alineación de la secuencia del

35 péptido de tránsito de cloroplastos, se diseñaron nuevos péptidos de tránsito de cloroplasto híbridos combinando la primera mitad de la secuencia del péptido de tránsito de cloroplasto del primer organismo con la segunda mitad de la secuencia del péptido de tránsito del cloroplasto del segundo organismo en una relación aproximada de 1:1. Ejemplos de secuencias de los péptidos de tránsito de cloroplastos híbridos recién diseñadas son TraP8 (SEQ ID NO: 3) y TraP9 (SEQ ID NO: 4). Estas nuevas secuencias de péptidos de tránsito cloroplasto híbridas proceden de

40 las proteínas EPSPS de *Brassica napus* [nº de registro en la ATCC: P17688] y *Brassica rapa* [nº de registro en la ATCC: AAS80163]. La secuencia del péptido de tránsito del cloroplasto híbrido TraP8 (SEQ ID nº: 3) comprende un terminal N que procede de *Brassica napus*, y el terminal C del péptido de tránsito del cloroplasto procede de *Brassica rapa*. La secuencia del péptido de tránsito del cloroplasto TraP9 (SEQ ID NO: 4) comprende un terminal N que procede de *Brassica rapa*, y el terminal C del péptido de tránsito del cloroplasto procede de *Brassica napus*. Los

45 péptidos de tránsito de cloroplastos híbridos se probaron en múltiples ensayos que incluían un sistema de expresión transitoria en las plantas y transgénicamente como un caso de transformación estable que comprende un elemento de expresión génica fusionado a una secuencia transgénica importante para la agronomía.

Ejemplo 2: Ensayo transitorio en plantas de secuencias péptido de tránsito híbridas de cloroplastos (TraP)

Ensayo transitorio del tabaco:

50 Las secuencias peptídicas de tránsito híbridas de cloroplastos TraP8 y TraP9 se probaron inicialmente en un ensayo transitorio en plantas. Se sintetizaron secuencias de polinucleótidos que codifican las secuencias híbridas de péptidos de tránsito de cloroplastos TraP8 (SEQ ID nº: 5) y TraP9 (SEQ ID nº: 6). Se incorporó una secuencia de enlace (SEQ ID nº: 7) entre la secuencia TraP y la secuencia de codificación *yfp*. Los montajes resultantes contenían dos unidades de transcripción en plantas (UTP). La primera UTP estaba compuesta por el activador ubiquitina 10 de

55 *Arabidopsis thaliana* (activador AtUbi10; Callis, *et al.*, (1990) *J. Biol. Chem.*, 265:12486-12493), gen de fusión de TraP-proteína amarilla fluorescente (TraP-YFP; solicitud de patente de EE.UU. 2007/0298412), y región no traducida 3' del ORF 23 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3'UTR; Patente de EE.UU. nº 5.428.147). La segunda UTP estaba compuesta por el activador del virus de mosaico de la fibra de la yuca (activador CsVMV; Verdaguer *et al.*, (1996) *Plant Molecular Biology*, 31:1 129-1139), fosfinotricina acetil transferasa (PAT; Wohlleben *et al.*, 1988) *Gene*,

60 70:25-37), y la región no traducida 3' del ORF 1 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3'UTR; Huang *et al.*, (1990)

J. Bacteriol., 172:1814-1822). El montaje pDAB101977 contiene el péptido de tránsito del cloroplasto híbrido TraP8 (FIG. 2). El montaje pDAB101978 contiene el péptido de tránsito de cloroplastos híbrido TraP9. Se construyó un plásmido de referencia, 101908, que no contenía una secuencia peptídica de tránsito de cloroplasto aguas arriba del gen *yfp*, y se incluyó en los estudios (FIG. 3). Los montajes se confirmaron mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación. Por último, los montajes se transformaron en *Agrobacterium tumefaciens* y se almacenaron en soluciones de glicerol.

De una solución de *Agrobacterium* en glicerol, se inoculó un bucle lleno de cultivo congelado en 2 ml de YPD (100 µg/ml de espectinomicina) en un tubo estéril de 14 ml. El medio inoculado se incubó a 28°C durante la noche con agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se utilizaron aproximadamente 100 µ del cultivo para inocular 25 ml de YPD (100 µg/ml de espectinomicina) en un matraz de 125 ml estéril con tres separadores, y se incubaron durante la noche a 28°C con agitación a 200 rpm. Al día siguiente, los cultivos se diluyeron a un DO₆₀₀ de 0,5 en H₂O estéril doble destilada (pH 8,0). La cepa de *Agrobacterium* diluida se mezcló con una segunda cepa de *Agrobacterium* que contenía la proteína cooperadora P19 en una proporción de 1:1. El cultivo se usó para la infiltración de la hoja de tabaco por el método de Voinnet O., Rivas S., Mestre P. y Baulcombe D., (2003). Un sistema de expresión transitoria mejorada en plantas basado en la supresión del silenciamiento génico por la proteína p19 del virus del enanismo arbustivo del tomate, *The Plant Journal*, 33:949-956. Las plantas de tabaco infiltradas se colocaron en un conjunto Convirion™ a 16 h de luz a 24°C durante al menos tres días hasta que se ensayaron.

Resultados de microscopía:

Se separaron de la planta hojas de tabaco infiltradas con *Agrobacterium* y se colocaron en una placa de Petri con agua para evitar la deshidratación. Las hojas de tabaco infiltradas se observaron bajo excitación de luz azul con vidrios de filtro de paso largo mantenidos en su lugar utilizando una Dark Reader Hand Lamp™ (Clare Chemical Research Co., Dolores, CO) para identificar áreas no dañadas de la hoja que expresaban satisfactoriamente las proteínas indicadoras YFP. Las áreas de las hojas identificadas específicamente se disecaron de la hoja y se montaron en agua para obtener imágenes por microscopía confocal (Leica TCS-SP5 AOBS™; Buffalo Grove, IL). La proteína indicadora YFP se excitó con una línea de láser de 514 nm, utilizando un láser de iones de argón multilínea. La anchura de las ranuras de detección se ajustó utilizando una muestra de hoja de referencia no expresada (oscura) para excluir la autofluorescencia de la hoja de fondo. La autofluorescencia de la clorofila se recogió simultáneamente en un segundo canal para comparación directa con la señal de la proteína indicadora fluorescente para la determinación de la localización cloroplástica.

Los resultados de las imágenes al microscopio indicaron que la proteína fluorescente YFP que comprende un péptido de tránsito del cloroplasto TraP8 o TraP9 se acumuló dentro de los cloroplastos situados en el citoplasma de las células del tabaco en comparación con las proteínas fluorescentes YFP de referencia que no se desplazaron en los cloroplastos del citoplasma de las células de tabaco (FIG. 4 y FIG. 5). Los resultados de estas imágenes al microscopio sugieren que el desplazamiento de la proteína YFP en el cloroplasto fue el resultado del péptido de tránsito del cloroplasto TraP8 o TraP9. Como se muestra en la figura 5 y la figura 6, la señal de fluorescencia de YFP esta localizada en los cloroplastos que también emiten fluorescencia roja debido a la autofluorescencia en las condiciones de obtención de imágenes al microscopio. Comparativamente, la figura 7 proporciona una imagen al microscopio del tejido de la hoja de tabaco infiltrado con el montaje de referencia pDAB101908 que no contiene un péptido de tránsito de cloroplasto. Los cloroplastos en esta imagen solo emiten fluorescencia roja debido a la autofluorescencia en las condiciones de imagen microscópica, y carecen de cualquier señal de fluorescencia de YFP que se presenta en las células de tabaco infiltradas con TraP. Más bien, la señal de fluorescencia de YFP en las células de la planta de tabaco de referencia se expresa de manera difusa en todo el citoplasma de las células de la planta de tabaco. Resultados de la transferencia Western: La señal de fluorescencia de YFP en las células de la planta de tabaco de referencia se expresa de forma difusa en todo el citoplasma de las células de la planta de tabaco.

Resultados de la transferencia Western:

Las muestras de las plantas de tabaco infiltradas se analizaron por transferencia Western. Se recogieron recortes de hojas y se sometieron a molienda con bolas. Se mezclaron aproximadamente 100-200 mg de material de hojas con 2 BB (bolas de acero) (Daisy; Rogers, AR) y 500 ml de PBST durante 3 minutos en un molino de bolas Kleco™. Luego, las muestras se centrifugaron en una centrifugadora a 14.000 x g a 4°C. El sobrenadante se eliminó y se analizó directamente por transferencia Western o se inmunoprecipitó. Las inmunoprecipitaciones se realizaron utilizando el Pierce Direct IP kit™ (Thermo Scientific; Rockford, IL) siguiendo el protocolo del fabricante. Aproximadamente, 50 µg de anti-YFP se unieron a la resina. Las muestras se incubaron con la resina durante la noche a 4°C. A continuación, las muestras se lavaron y se eluyeron a la mañana siguiente y se prepararon para el análisis combinando volúmenes iguales de tampón de muestra de urea 2X 8 M y luego se hicieron hervir las muestras durante 5 minutos. Las muestras hervidas se procesaron en un gel SDS-Bis Tris al 4-12% en tampón MOPS durante 40 minutos. El gel se transfirió a continuación utilizando Invitrogen iBlot™ (Life Technologies; Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. La membrana transferida se bloqueó durante 10 minutos utilizando leche en polvo sin grasa al 5% en solución de PBS-Tween. La membrana se sondó con el anticuerpo primario (anti-GFP monoclonal en conejo) utilizado a una dilución 1:1000 en la leche en polvo sin grasa al 5% en una solución de PBS-Tween durante 1 hora. A continuación, la membrana se enjuagó tres veces durante cinco minutos

con PBS-Tween para eliminar todo el anticuerpo primario no unido. La membrana se sondó con un anti-conejo monoclonal secundario en anticuerpo de cabra (Life Technologies) utilizado a una dilución 1:1000, durante 60 minutos. La membrana se lavó como se describió anteriormente y se desarrolló agregando sustrato Thermo BCIP/NBT. El sustrato colorimétrico se dejó desarrollar durante 5-10 minutos y luego las manchas se enjuagaron con agua antes de secarlas.

Los resultados de la transferencia Western indicaron que la proteína YFP se expresó en las células de tabaco infiltradas. Los tejidos de las hojas de la planta de tabaco infiltrados tanto con pDAB101977 como con pDAB101978 expresaron la proteína YFP como lo indicó la presencia de una banda de proteína que reaccionó con los anticuerpos de YFP y fue equivalente en tamaño a la banda de proteína de YFP obtenida del tejido de la hoja de la planta de tabaco infiltrado con el montaje de referencia de YFP. Además, estos resultados indicaron que los péptidos de tránsito de cloroplastos híbridos TraP se procesaron y se escindieron de la proteína YFP. Los montajes TraP8-YFP y TraP9-YFP expresan una banda de proteína preprocesada que tiene un peso molecular mayor que la proteína de referencia YFP. La presencia de bandas en la transferencia Western que tienen un tamaño equivalente a las de YFP de referencia indican que las secuencias de péptido de tránsito de cloroplastos TraP8 y TraP9 se trataron, reduciendo de este modo el tamaño de la YFP a un tamaño de peso molecular que es equivalente a la YFP de referencia.

Ensayo transitorio de protoplastos de maíz:

La secuencia del polinucleótido que codifica el péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP8 (SEQ ID NO: 5) y la secuencia del polinucleótido que codifica el enlazador (SEQ ID NO: 7) se clonaron aguas arriba del gen de la proteína fluorescente amarilla y se incorporaron en el montaje pDAB106597 (FIG. 7) para pruebas mediante el ensayo transitorio de protoplastos de maíz en plantas. Los montajes resultantes contenían una unidad de transcripción en plantas única (UTP). La UTP estaba compuesta por el activador Ubiquitina 1 de *Zea mays* (activador ZmUbi1; Christensen, A., Sharrock R. y Quail P., (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, y promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation, *Plant Molecular Biology*, 18: 675-689), gen de fusión de TraP-proteína fluorescente amarilla (TraP8-YFP; solicitud de patente de EE. UU. 2007/0298412), y región no traducida 3' de Peroxidasa de *Zea mays* (ZmPer5 3'UTR; Patente de EE.UU. n° 6384207). Los montajes se confirmaron mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

Se esterilizaron en la superficie semillas de *Zea mays* var. B104 agitando vigorosamente en Clorox al 50% (hipoclorito de sodio al 3%), que contenía 2-3 gotas de Tween 20, durante aproximadamente 20 minutos. Las semillas se enjuagaron a fondo con agua destilada estéril. Las semillas estériles se sembraron en medio ½ MS en Phytatrays o cajas de tipo similar y se dejaron crecer en la oscuridad (28°C) durante 12 a 20 días. Se utilizó un ensayo transitorio de protoplastos de maíz para obtener y transfectar protoplastos de maíz de hojas de maíz B104. Este ensayo de protoplastos de maíz es una modificación del sistema descrito por Yoo, S.-D., Cho, Y.-H. y Sheen, J., (2007), *Arabidopsis Mesophyll Protoplasts: A Versatile Cell System for Transient Gene Expression Analysis*, *Nature Protocols*, 2: 1565-1572. Las soluciones se prepararon según lo descrito por Yoo et.al, (2007), con la excepción de que la concentración de manitol utilizada para los experimentos siguientes se cambió a 0,6 M.

Se completó la transfección de 100 a 500 µl de protoplastos ($1-5 \times 10^5$) agregando los protoplastos a un tubo de microcentrifugador de 2 ml que contenía aproximadamente 40 µg de ADN plasmídico (pDAB106597), a temperatura ambiente. El volumen de ADN se mantuvo preferiblemente en aproximadamente el 10% del volumen de protoplastos. Los protoplastos y el ADN se mezclaron ocasionalmente durante un período de incubación de 5 minutos. Se añadió lentamente un volumen igual de solución de PEG a los protoplastos y al ADN, 2 gotas a la vez con mezcla entre la adición de las gotas de solución de PEG. Los tubos se dejaron incubar durante aproximadamente 10 minutos con mezcla suave ocasional. A continuación, se añadió 1 ml de solución W5+ y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces. El (los) tubo(s) se centrifugaron durante 5 minutos a $75 \times g$ a una temperatura de 4°C. Por último, se eliminó el sobrenadante y se volvió a poner en suspensión el sedimento en 1 ml de solución W1 y los protoplastos se colocaron en una placa Petri pequeña (35 x 10 mm) o en placas de múltiples pocillos de 6 pocillos y se incubaron durante la noche en la oscuridad a temperatura ambiente. Se observó al microscopio la fluorescencia de YFP después de 12 horas de incubación. Las condiciones de la microscopía descritas anteriormente se utilizaron para la obtención de imágenes.

Los resultados de la obtención de imágenes al microscopio indicaron que la proteína fluorescente YFP que comprende un péptido de tránsito de cloroplastos híbrido TraP8 se acumuló dentro de los cloroplastos situados en el citoplasma de las células de maíz en comparación con las proteínas fluorescentes YFP de referencia que no se desplazaron en los cloroplastos del citoplasma de las células de maíz (FIG. 8). Los resultados de estas imágenes microscópicas sugieren que el desplazamiento de la proteína YFP en el cloroplasto fue un resultado del péptido de tránsito del cloroplasto híbrido TraP8.

Ejemplo 3: Secuencias del péptido de tránsito de cloroplastos híbrido (TraP) para la expresión de transgenes de importancia agronómica en Arabidopsis

Una sola mutación de aminoácido (G96A) en la enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa (EPSP sintasa) de

Escherichia coli puede producir insensibilidad al glifosato (Padgett *et al.*, (1991); Eschenburg *et al.*, (2002); Priestman *et al.*, (2005); Haghani *et al.*, (2008)). Si bien esta mutación confiere tolerancia al glifosato, también se sabe que afecta negativamente a la unión de la EPSP sintasa con su sustrato natural, el fosfoenolpiruvato (PEP). El cambio resultante en la eficiencia de unión al sustrato puede hacer que una enzima mutada no sea adecuada para proporcionar en la planta tolerancia al glifosato.

La base de datos NCBI Genbank se seleccionó por simulación informática para la proteína EPSP sintasa y las secuencias de polinucleótidos que contienen naturalmente una alanina en una posición análoga dentro de la enzima EPSP sintasa como la de la mutación G96A que se introdujo en la versión *E. coli* de la enzima (Padgett *et al.*, (1991); Eschenburg *et al.*, (2002); Priestman *et al.*, (2005); Haghani *et al.*, (2008)).

Una enzima que se identificó que contiene una alanina natural en esta posición fue DGT-28 (GENBANK ACC n°: ZP_06917240.1) de *Streptomyces sviveus* ATCC29083. Además, la recolección de datos por simulación informática puso de manifiesto otras tres enzimas *Streptomyces* únicas con mayor homología a DGT-28; DGT-31 (n° de registro en GENBANK: YP_004922608.1); DGT-32 (n° de registro en GENBANK: ZP_04696613); y DGT-33 (n° de registro en GENBANK: NC_010572). Cada una de estas enzimas contiene una alanina natural en una posición análoga dentro de la enzima EPSP sintasa como la de la mutación G96A que se introdujo en la versión *E. coli* de la enzima. FIG. 1.

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

Las nuevas enzimas DGT-14, DGT-28, DGT-31, DGT-32 y DGT-33 se caracterizaron por la tolerancia al glifosato y la afinidad del sustrato de PEP en comparación con las enzimas EPSP sintasa de clase I. Las siguientes enzimas de clase I; DGT-1 de *Glycine max*, DGT-3 de *Brassica napus* (n° de registro en GENBANK: P17688) y DGT-7 de *Triticum aestivum* (n° de registro en GENBANK: EU977181) fueron para comparación. Se sintetizaron y evaluaron las enzimas EPSP sintasa de clase I y sus variantes mutantes. Una mutación introducida en las enzimas EPSP sintasa vegetales consistió en la mutación de glicina a alanina producida dentro de la enzima EPSP sintasa en una posición similar a la de la mutación G96A de la versión de *E. coli* de la enzima. Además, las mutaciones de treonina a isoleucina y prolina a serina se introdujeron en estas enzimas EPSP sintasa de clase I en posiciones análogas a las del aminoácido 97 (T a I) y del aminoácido 101 (P a S) en la EPSP sintasa de *E. coli* como se describe en Funke *et al.*, (2009).

DGT14:

Se produjeron plantas transgénicas de *Arabidopsis* de T₁ que contenían los péptidos de tránsito de cloroplastos híbridos TraP8 y TraP9 fusionados al transgén *dgt-14* utilizando el método de inmersión floral de Clough andy Bent (1998), *Plant J.* 16:735-743. Se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis* y se confirmó que contenían el transgén por confirmación molecular. Las plantas transgénicas se fumigaron con diferentes proporciones de glifosato. En este estudio se aplicó una distribución de concentraciones variables de proporciones de glifosato, incluidas proporciones elevadas, para determinar los niveles relativos de resistencia (105, 420, 1.680 o 3.360 g ae/ha). La proporción típica de uso de glifosato en el campo 1X es de 1.120 g ae/ha. Las plantas de *Arabidopsis* de T₁ que se usaron en este estudio fueron variables en el número de copias para el transgén *dgt-14*. Se identificaron plantas de *Arabidopsis* de T₁ de *dgt-14* de baja copia usando ensayos de confirmación molecular, y se autopolinizaron y usaron para producir plantas de T₂. La tabla 1 muestra la resistencia para las plantas transgénicas *dgt-14*, en comparación con las plantas de referencia que comprenden un gen de resistencia al herbicida glifosato, *dgt-1* (como se describe en el archivo de patente de EE.UU. n° 12558351).

Los transformantes de *Arabidopsis* de T₁ se seleccionaron en primer lugar del fondo de semilla no transformada utilizando un esquema de selección de glufosinato. Se analizaron tres planos, o 30.000 semillas, para cada montaje de T₁. Las plantas de T₁ seleccionadas se caracterizaron molecularmente y las plantas se transplantaron posteriormente a macetas individuales y se fumigaron con varias proporciones de glifosato comercial como se describió anteriormente. La respuesta a la dosis de estas plantas se presenta desde el punto de vista del % de daño observado 2 semanas después del tratamiento (SDT). Los datos se presentan en las tablas a continuación que muestran plantas individuales que presentan poco o ningún daño (<20%), daño moderado (20-40%) o daño grave (> 40%). Se presenta una media aritmética y una desviación típica para cada montaje utilizado para la transformación de *Arabidopsis*. El intervalo en la respuesta individual también se indica en la última columna para cada proporción y transformación. La *Arabidopsis* no transformada natural (c.v. Columbia) sirvió como referencia sensible al glifosato.

El nivel de respuesta de la planta varió en las plantas de *Arabidopsis* de T₁. Esta variancia puede atribuirse al hecho de que cada planta representa un caso de transformación independiente y, por lo tanto, el número de copias del gen de interés varía de una planta a otra. En la tabla 1 se presenta un promedio general del daño de la población en proporción para demostrar la tolerancia proporcionada por cada uno de los montajes de *dgt-14* unidos al péptido de tránsito de cloroplasto TraP8 v2 o TraP9 v2 frente al *dgt-1* y las referencias naturales no transformadas para proporciones variables de glifosato. Los casos contenían *dgt-14* unido a TraP8 v2 (SEQ ID NO: 8) que está contenido en el montaje pDAB105526 (FIG. 9) y TraP9 v2 (SEQ ID NO: 9) que está contenido en el montaje pDAB105527 (FIG. 10). Los datos de la selección con glifosato de las plantas de T₁ demostraron que cuando *dgt-14* estaba unido con estos péptidos de tránsito de cloroplastos, se proporcionó una fuerte tolerancia a altas concentraciones de glifosato. Comparativamente, las referencias no transformadas (o naturales) no proporcionaron tolerancia al tratamiento de altas concentraciones de glifosato cuando se trataron con cantidades similares de glifosato. Además, hubo casos en los que se demostró que los casos que contenían tres o más copias de *dgt-14* eran más sensibles a cantidades elevadas de glifosato. Estos casos se demuestran dentro del intervalo de porcentaje del daño observado que se muestra en la tabla 1. Es probable que la presencia de números altos de copias de los transgenes en las plantas de *Arabidopsis* produzca un silenciamiento del transgen u otros efectos epigenéticos que producen sensibilidad al glifosato, a pesar de la presencia del transgén *dgt-14*.

Tabla 1. Respuesta de *Arabidopsis* T₁ transformada con *dgt-14* a un intervalo de concentraciones de glifosato aplicadas después del brote, en comparación con una población segregadora de *dgt-1* (T₂) y un patrón no transformado. % de daño observado 2 semanas después de la aplicación.

TraP8 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105526)	% de amplitud del daño (nº de réplicas)			% de análisis del daño		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
Proporción de aplicación						
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	0	2	2	40,0	14,1	20-50
420 g ae/ha glifosato	3	0	1	23,8	31,5	0-70
1.680 g ae/ha glifosato	0	1	3	66,3	28,4	25-85
3.360 g ae/ha glifosato	3	0	1	26,5	42,5	0-90
TraP9 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105527)	% de amplitud del daño (nº de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	2	1	1	23,0	25,7	0-50
420 g ae/ha glifosato	2	0	2	37,5	37,7	0-70
1.680 g ae/ha glifosato	2	0	2	48,8	39,0	15-85
3.360 g ae/ha glifosato	1	0	3	63,8	39,2	5-85
<i>dgt-1</i> (pDAB3759)	% de amplitud del daño (nº de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	0	3	1	40,0	14,1	30-60
420 g ae/ha glifosato	0	4	0	30,0	0,0	30
1.680 g ae/ha glifosato	0	3	1	55,0	30,0	40-100

<i>dgt-1</i> (pDAB3759)	% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4	57,5	8,7	45-65
Referencia no transformada	% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
420 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
1.680 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

Las plantas de *Arabidopsis* de T₁ seleccionadas que se identificaron por contener un número bajo de copias de las inserciones de transgenes (1-3 copias) se autofertilizaron para producir una segunda generación para una evaluación adicional de la tolerancia al glifosato. La segunda generación de plantas de *Arabidopsis* (T₂) que contenían 1-3 copias del transgén *dgt-14* fusionadas con los péptidos de tránsito del cloroplasto híbridos TraP8 y TraP9 se caracterizaron además por la tolerancia al glifosato y la tolerancia al glufosinato (la resistencia al glufosinato indicó que el casete de expresión PAT estaba intacto y no experimentó reconfiguraciones durante la autofecundación de las plantas de T₁). En las plantas hemicigóticas y homocigóticas de la generación T₂ se dispuso de pruebas para cada caso y, por lo tanto, se incluyeron para cada proporción de glifosato analizado. Las plantas hemicigóticas contienen dos alelos diferentes en un locus en comparación con las plantas homocigóticas que contienen los mismos dos alelos en un locus. El número de copias y los niveles de ploidia de las plantas de T₂ se confirmaron utilizando protocolos de análisis molecular. Asimismo, se aplicó glifosato utilizando los métodos y proporciones descritos anteriormente. La respuesta a la dosis de las plantas se presenta desde el punto de vista del % de daño observado 2 semanas después del tratamiento (SDT). Los datos se presentan como un histograma de individuos que muestran poco o ningún daño (<20%), daño moderado (20-40%) o daño grave (> 40%). Se presentan una media aritmética y una desviación típica para cada montaje utilizado para la transformación de *Arabidopsis*. El intervalo en cada respuesta también se indica en la última columna para cada proporción y transformación. La *Arabidopsis* natural no transformada (cv. Columbia) sirvió como referencia sensible al glifosato. Además, las plantas que comprenden un gen de resistencia al herbicida glifosato, *dgt-1* (como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. n° 12558351) estaban incluidas como referencia positiva.

En la generación T₂ los casos de *dgt-14* tanto de una sola copia como de pocas copias (dos o tres copias) se caracterizaron por la tolerancia al glifosato. En la tabla 2 se presenta un promedio general del daño en la población en porcentaje para demostrar la tolerancia proporcionada por cada uno de los montajes de *dgt-14* unidos a un péptido de tránsito de cloroplasto frente a *dgt-1* y referencias naturales no transformadas y para porcentajes variables de glifosato. Los casos de la generación T₂ contenían *dgt-14* unido a TraP8 v2 (pDAB105526) y TraP9 v2 (pDAB105527). Ambos casos son muy resistentes al glifosato. Los resultados indicaron que la amplitud del daño para las plantas de *Arabidopsis* de T₂ fue inferior al 20% para todas las concentraciones de glifosato analizadas. Comparativamente, las referencias no transformadas (naturales) no proporcionaron tolerancia al tratamiento de altas concentraciones de glifosato cuando se trataron con porcentajes similares de glifosato. En general, los resultados demostraron que las plantas que contenían y expresaban DGT-14 fusionadas a las proteínas del péptido de tránsito híbrido TraP8 y TraP9 produjeron una resistencia desde el punto de vista comercial al glifosato a concentraciones de hasta 3 veces la proporción de rendimiento (1.120 g ae/ha).

Tabla 2. Respuesta de *Arabidopsis* de T₂ transformada por *dgt-14* a un intervalo de porcentajes de glifosato aplicados después del brote, en comparación con una población segregadora de *dgt-1* (T₂) y un patrón no transformado. % del daño observado 2 semanas después de la aplicación. Los datos representan una línea de una sola copia seleccionada de cada montaje que se segrega como un único locus en la criba por heredabilidad.

ES 2 738 585 T3

TraP8 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105526)	% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,5	1,0	0-2
840 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.680 g ae/ha glifosato	4	0	0	2,5	2,9	0-5
3.360 g ae/ha glifosato	4	0	0	5,0	4,8	0-10
TraP9 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105527)	% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.680 g ae/ha glifosato	4	0	0	1,8	2,4	0-5
3.360 g ae/ha glifosato	2	2	0	17,5	17,6	0-35
<i>dgt-1</i> (pDAB3759)	% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glifosato	2	0	2	40,0	40,4	5-75
840 g ae/ha glifosato	0	2	2	47,5	31,8	20-75
1.680 g ae/ha glifosato	0	2	2	41,3	23,9	20-70
3.360 g ae/ha glifosato	0	4	0	35,0	0,0	35
Referencia no transformada	% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
840 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
1.680 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

Las plantas de Arabidopsis de T₂ seleccionadas al azar que se identificaron por contener un número bajo de copias

de las inserciones de transgenes (1-3 copias) se autofecundaron para producir una tercera generación para una evaluación adicional de la tolerancia al glifosato. Se sembraron semillas de *Arabidopsis* de la tercera generación (T₃) y se evaluó la tolerancia al glifosato utilizando los mismos protocolos descritos anteriormente. Los casos probados en la generación de T₃ contenían réplicas de cada estirpe que eran homocigóticas (según se determinó usando una criba de resistencia al glufosinato para identificar si alguna de las plantas avanzadas mostraba segregación de los transgenes). Estos casos se analizaron por LC-MS-MS para confirmar que las plantas expresaban la proteína DGT-14. Los resultados de la generación de T₃ para el promedio del daño en la población general en proporciones de glifosato se presenta en la tabla 3, que muestra la tolerancia al glifosato proporcionada por cada uno de los montajes *dgt-14* para proporciones variables de glifosato. Ejemplos de casos de T₃ resistentes comprendían *dgt-14* unidos a TraP8 v2 (pDAB105526) y TraP9 v2 (pDAB105527). Ambos casos son muy resistentes al glifosato. Los resultados indicaron que la amplitud del daño para las plantas de *Arabidopsis* de T₃ fue inferior al 20% para todas las concentraciones de glifosato analizadas. Comparativamente, las referencias no transformadas (o naturales) no proporcionaron tolerancia al tratamiento de altas concentraciones de glifosato cuando se trataron con proporciones similares de glifosato. En general, los resultados demostraron que las plantas que contenían y expresaban DGT-14 producían resistencia desde el punto de vista comercial al glifosato de hasta 3 veces la proporción de rendimiento (1.120 g ae/ha).

Tabla 3. Respuesta de *Arabidopsis* de T₃ transformada por *dgt-14* a un intervalo de proporciones de glifosato aplicadas después del brote, en comparación con una población segregadora de *dgt-1* (T₂) y un patrón no transformado. % de daño observado 2 semanas después de la aplicación. Los datos representan una población de una sola copia seleccionada de cada montaje que se segregó como un solo locus en la criba de heredabilidad de T₂.

TraP8 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105526)		% de amplitud del daño (nº de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)	
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
420 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
840 g ae/ha glifosato	4	0	0	1,3	2,5	0-5	
1.680 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
3.360 g ae/ha glifosato	4	0	0	4,0	4,0	2-10	
TraP9 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105527)		% de amplitud del daño (nº de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)	
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
420 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
840 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
1.680 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
3.360 g ae/ha glifosato	4	0	0	4,3	1,5	2-5	
<i>dgt-1</i> (pDAB3759)		% de amplitud del daño (nº de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)	
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
420 g ae/ha glifosato	0	2	2	42,5	9,6	30-50	
840 g ae/ha glifosato	0	4	0	40,0	0,0	40	

1.680 g ae/ha glifosato	0	3	1	47,5	15,0	40-70
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4	77,5	17,1	60-100
Referencia no transformada	% de amplitud del daño (nº de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
840 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
1.680 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

Los datos demuestran que la expresión de una enzima resistente al glifosato (p. ej., DGT-28), cuando es dirigida al cloroplasto de una célula vegetal por un péptido de tránsito TraP en una proteína de fusión, es capaz de conferir resistencia al glifosato a la célula vegetal y plantas compuestas por estas células.

5 DGT-28, DGT-31, DGT-32 y DGT-33:

La secuencia de polinucleótidos *dgt-28 v5* optimizada para plantas dicotiledóneas de nuevo diseño está listada en la SEQ ID NO: 16. La secuencia de polinucleótidos *dgt-28 v6* optimizada para plantas monocotiledóneas de nuevo diseño está listada en la SEQ ID NO: 17; esta secuencia se modificó ligeramente al incluir una alanina en la segunda posición de aminoácido para introducir una secuencia de enzima de restricción. Las secuencias de ADN resultantes tienen un mayor grado de diversidad de codones, una composición de base deseable, contiene secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción colocadas estratégicamente y carece de secuencias que podrían interferir con la transcripción del gen o la traducción del ARNm del producto.

Síntesis de fragmentos de ADN que comprenden SEQ ID n°: 16 y SEQ ID n°: 17 que contienen secuencias adicionales, tales como terminaciones de 6 marcos (codones de terminación situados en los seis marcos de lectura que se agregan al terminal 3' de la secuencia de codificación), y una secuencia de restricción 5' para clonación se llevó a cabo por proveedores comerciales (DNA2.0, Menlo Park, CA). La molécula de ácido nucleico sintética se clonó a continuación en vectores de expresión y se transformó en plantas o bacterias como se describe en los ejemplos a continuación.

Se utilizaron estrategias de optimización de codones similares para diseñar *dgt-1*, *dgt-3 v2* (G173A), *dgt-3 v3* (G173A; P178S), *dgt-3 v4* (T174I; P178S), *dgt-7 v4* (T168I; P172S), *dgt-32 v3*, *dgt-33 v3* y *dgt-31 v3*. La versión optimizada de codón de estos genes se enumeran como SEQ ID n°: 18, SEQ ID n°: 19, SEQ ID n°: 20, SEQ ID n°: 21, SEQ ID n°: 22, SEQ ID n°: 23, SEQ ID n°: 23. SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25, respectivamente.

Construcción de vectores binarios vegetales. Se usaron métodos de clonación habituales en la construcción de vectores de entrada que contienen una secuencia de polinucleótidos peptídicos de tránsito de cloroplastos unida a *dgt-28* como una fusión en marco. Los vectores de entrada que contenían un péptido de tránsito (TraP) fusionado a *dgt-28* se ensamblaron utilizando la tecnología IN-FUSION™ Advantage (Clontech, Mountain View, CA). Como resultado de la fusión, el primer aminoácido, metionina, se eliminó de *dgt-28*. Los péptidos de tránsito TraP4 v2 (SEQ ID NO: 26), TraP5 v2 (SEQ ID NO: 27), TraP8 v2 (SEQ ID NO: 28), TraP9 v2 (SEQ ID NO: 29), TraP12 v2 (SEQ ID NO: 30) y TraP13 v2 (SEQ ID NO: 31) fueron sintetizados cada uno por DNA2.0 (Menlo Park, CA) y se fusionaron al extremo 5' del fragmento de *dgt-28*, hasta una secuencia de reconocimiento de endonucleasa de restricción *AccI* única e incluyendo la misma.

Los plásmidos binarios que contenían los diversos casetes de expresión de TraP y *dgt-28* fueron dirigidos por el activador de Ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana* (AtUbi10 v2; Callis, *et al.*, (1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 12486-12493) y flanqueados por la región no traducida 3' del marco de lectura abierto veintitrés de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3' UTR v1; patente de EE.UU. n° 5.428.147).

Los casetes de expresión TRAP y *dgt-28* ensamblados se diseñaron utilizando GATEWAY® Technology (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformaron en plantas mediante la transformación en plantas mediada por *Agrobacterium*. Las endonucleasas de restricción se adquirieron en New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) y se utilizó T4 ADN Ligasa (Invitrogen) para la ligadura del ADN. Se realizaron reacciones de iniciación utilizando la mezcla de enzimas

GATEWAY® LR CLONASE® (Invitrogen) para ensamblar un vector de entrada en un único vector de destino que contenía el casete marcador seleccionable activador del virus del mosaico de la fibra de la yuca (CsVMV v2; Verdaguer *et al.*, (1996) *Plant Mol. Biol.*, 31: 1129-1139) - DSM-2 (Solicitud de Pat. de EE.UU. nº 2007/086813) - región no traducida 3' del marco de lectura abierto uno de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3' UTR v6; Huang *et al.*, (1990) *J. Bacteriol.* 172:1814-1822). Se realizaron preparados de plásmidos utilizando el equipo de plásmidos NUCLEOSPIN® (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA) o el kit de plásmidos Midi (Qiagen) siguiendo las instrucciones de los proveedores. Se aislaron fragmentos de ADN utilizando el equipo de extracción en gel QIAquick™ (Qiagen) después de la electroforesis en gel de agar-agarosa Tris-acetato.

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

Los siguientes montajes binarios expresan las diversas secuencias del gen de fusión TraP:dgt-2S: pDAB107527 (FIG. 18) contiene TraP4 v2:dgt-28 v5 (SEQ ID NO:32); pDAB105530 (FIG. 19) contiene TraP5 v2:dgt-28 v5 (SEQ ID NO: 33); pDAB105531 (figura 20) contiene TraP8 v2:dgt-28 v5 (SEQ ID NO: 34); PDAB105532 (FIG. 21) contiene TraP9 v2: dgt-28 v5 (SEQ ID NO: 35); pDAB105533 (FIG. 22) contiene TraP12 v2: dgt-28 v5 (SEQ ID NO: 36); y pDAB105534 (FIG. 23) contiene TraP13 v2:dgt-28 v5 (SEQ ID NO: 37). La secuencia dgt-28 v5 de pDAB105534 se modificó en donde el primer codón (GCA) se cambió a (GCT).

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

Los genes procedentes de microbios; dgt-31, dgt-32 y dgt-33 se fusionaron con péptidos de tránsito de cloroplastos diferentes a los descritos anteriormente. Se utilizaron los siguientes péptidos de tránsito de cloroplastos; TraP14 v2 (SEQ ID NO: 38), TraP23 v2 (SEQ ID NO: 39), TraP24 v2 (SEQ ID NO: 40). pDAB107532 (FIG. 24) contiene dgt-32 v3 fusionado a TraP14 v2 (SEQ ID NO: 41), pDAB107534 (FIG. 25) contiene dgt-33 v3 fusionado a TraP24 v2 (SEQ ID NO: 42) y pDAB107533 (FIG. 26) contiene dgt-31 v3 fusionado con TraP23 v2 (SEQ ID NO: 43). Los casetes de expresión dgt fueron controlados por el activador de ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana* (activador AtUbiO10 v2) y flanqueados por la región 3' no traducida del marco de lectura abierto veintitrés de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3' UTR v1). Un casete del marcador seleccionable DMS-2 que contiene activador del virus del mosaico de la fibra de yuca (CsVMV v2) – DSM-2 - región 3' no traducida del marco de lectura abierto uno de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3' UTR v6) estaba también presente en el vector binario.

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

Se construyeron vectores binarios que contenían los genes de clase I (dgt-1, dgt-3 y dgt-7). Se construyeron y transformaron en plantas los siguientes vectores binarios: pDAB4104 (FIG. 27), que contiene la secuencia dgt-1 v4 como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2011/0124503, que está flanqueada por las secuencias Osmotin de *Nicotiana tabacum* como se descubrió en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2009/0064376; pDAB102715 (figura 28); pDAB102716 (figura 29); pDAB102717 (figura 30) y pDAB102785 (figura 31). Los diversos péptidos de tránsito de cloroplastos TraP que se fusionaron a dgt-28, dgt-31, dgt-32 y dgt-33 no se agregaron a los genes de clase I, ya que estas secuencias procedentes de plantas poseen péptidos de tránsito de cloroplastos de plantas naturales. Estos vectores se describen con más detalle en la tabla 4.

Tabla 4. Descripción de los vectores binarios que contienen un gen de la EPSP sintasa de clase I (es decir, dgt-1, dgt-3 o dgt-7).

Denominación	Descripción	mutación de EPSPS
pDAB4104	RB7 MAR v2::activador CsVMV v2 / NtOsm 5' UTR v2 / dgt-1 v4 / NtOsm 3' UTR v2 / AtuORF24 3' UTR v2 :: activador AtUbi10 v4 / pat v3 / vector binario AtuORF1 3'UTR v3	TI PS
pDAB102715	activador AtUbi10 v2 / dgt-3 v2/ AtuORF23 3'UTR v1 :: activador CsVMV v2 /pat v9 / vector binario AtuORF1 3'UTR v6	GA
pDAB102716	activador AtUbi10 v2 / dgt-3 v3 / AtuORF23 3'UTR v1 :: activador CsVMV v2 /pat v9 / vector binario AtuORF1 3'UTR v6	GA PS
pDAB102717	activador AtUbi10 v2 / dgt-3 v4 / AtuORF23 3'UTR v1 :: activador CsVMV v2 /pat v9 / vector binario AtuORF1 3'UTR v6	TI PS

Denominación	Descripción	mutación de EPSPS
pDAB102785	activador AtUbi10 v2 / <i>dgt-7</i> v4 / AtuORF23 3'UTR :: activador CsVMV v2 / DSM-2 v2 / vector binario AtuORF1 3'UTR v6	TI PS

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

Selección de plantas transformadas. La semilla de T₁ recién cosechada [que contiene los casetes de expresión *dgt* y *DSM-2*] se dejó secar durante 7 días a temperatura ambiente. La semilla de T₁ se sembró en bandejas de germinación de 26,5 x 51 cm, cada una de las cuales recibió una parte alícuota de 200 mg de semilla de T₁ estratificada (~10.000 semillas) que se había puesto en suspensión previamente en 40 ml de solución de agar-agarosa al 0,1% y se almacenó a 4°C durante 2 días para completar los requisitos de latencia y asegurar la germinación sincrónica de semillas.

Sunshine Mix LP 5 se cubrió con vermiculita fina y se regó por debajo con solución de Hoagland hasta que estuvo húmedo, luego se deja drenar por gravedad. Cada alícuota de 40 ml de semilla estratificada se sembró uniformemente sobre la vermiculita con una pipeta y se cubrió con mini-invernaderos durante 4-5 días. Los mini-invernaderos se retiraron 1 día antes de la selección transformante inicial utilizando un aerosol tras la aparición de glufosinato (seleccionando el gen *DSM-2* cotransformado).

Siete días después de la plantación (DDP) y nuevamente 11 DDP, las plantas de T₁ (cotiledón y fase de 2-4-hojas, respectivamente) se fumigaron con una solución al 0,2% de herbicida Liberty (200 g ai/l de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) a un volumen de fumigación de 10 ml/bandeja (703 l/ha) utilizando una boquilla de fumigación por aire comprimido DeVilbiss para proporcionar una proporción efectiva de 280 g ai/ha de glufosinato por aplicación. Las supervivientes (plantas en crecimiento activo) se identificaron 4-7 días después de la fumigación final y se trasplantaron individualmente en macetas de 3 pulgadas (7,62 centímetros) preparadas con medio abonado (Metro Mix 360). Las plantas trasplantadas se cubrieron con mini-invernaderos durante 3-4 días y se colocaron en una cámara de crecimiento a 22°C como antes o se trasladaron directamente al invernadero. Posteriormente, se retiraron los mini-invernaderos y las plantas se cultivaron en invernadero (22 ± 5°C, 50 ± 30% HR, 14 h luz: 10 h oscuridad, mínimo 500 µE/m²s⁻¹ natural + luz complementaria). El análisis de confirmación molecular se completó en las plantas de T₁ supervivientes para confirmar que el gen de tolerancia al glifosato se había integrado de manera estable en el genoma de las plantas.

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

Las plantas de *Arabidopsis* de T₁ se seleccionaron inicialmente mediante un ensayo con sonda de hidrólisis, análogo a TAQMAN™, para confirmar la presencia de los transgenes *DSM-2* y *dgt-28*. Los casos se seleccionaron mediante PCR de casete de expresión génica para determinar si el casete de expresión *dgt* se integraba completamente en los genomas de la planta sin reorganización. Los datos generados a partir de estos estudios se utilizaron para determinar el número de copias del transgén e identificar casos de *Arabidopsis* seleccionados para la autofertilización y el desarrollo a la generación T₂. Las plantas de *Arabidopsis* de T₂ avanzadas también se seleccionaron mediante ensayos con sonda de hidrólisis para confirmar la presencia y estimar el número de copias de los genes *DSM-2* y *dgt* dentro del cromosoma de la planta. Por último, se usó un ensayo de transferencia Southern para confirmar el número de copias estimado en un subconjunto de las plantas *Arabidopsis* de T₁.

Se utilizaron ensayos similares para confirmar la presencia del transgén *dgt-1* de plantas transformadas con pDAB4101, la presencia del transgén *dgt-32* de plantas transformadas con pDAB107532, la presencia del transgén *dgt-33* de plantas transformadas con pDAB107534, presencia del transgén *dgt-3* de plantas transformadas con pDAB102715, la presencia del transgén *dgt-3* de plantas transformadas con pDAB102716, la presencia del transgén

dgt-3 de plantas transformadas con pDAB102717 y la presencia del transgén *dgt-7* de plantas transformadas con pDAB102785.

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

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

Para la amplificación, se preparó la mezcla LIGHTCYCLER® 480 Probes Master (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) a una concentración final 11X en una reacción multiplex de 10 μl de volumen que contiene 0,1 μM de cada cebador para *DSM-2* y *dgt-28*, 0,4 μM de cada cebador para *TAFII15* y 0,2 μM de cada sonda.

Tabla 5. Se realizó una reacción de amplificación en dos etapas con una extensión a 60°C durante 40 segundos con obtención de fluorescencia. Todas las muestras se analizaron y los valores promedio de umbral de ciclo (C_u) se usaron para el análisis de cada muestra. El análisis de los datos de PCR en tiempo real se realizó con el programa informático LightCycler™ versión 1.5 utilizando el módulo quant relativo y se basa en el método ΔΔC_t. Para esto, se incluyó una muestra de ADN genómico de un calibrador de copia única y una comprobación de 2 copias conocidas en cada serie. Se determinaron los resultados del número de copias de la criba de la sonda de hidrólisis para la plantas transgénicas de *Arabidopsis* de T₁ y T₂.

Tabla 5. Información de cebadores y sondas para el análisis con sonda de hidrólisis de *DSM-2*, *dgt-28* y gen de referencia interno (*TAFII15*).

Nombre del cebador	Secuencia
DSM2A (SEQ ID n°: 44)	5' AGCCACATCCCAGTAACGA 3'
DSM2S (SEQ ID n°: 45)	5' CCTCCCTCTTTGACGCC 3'
Sonda Cy5 de DSM2 (SEQ ID n°: 46)	5' CAGCCCAATGAGGCATCAGC 3'
DGT28F (SEQ ID n°: 47)	5' CTTCAAGGAGATTTGGGATTTGT 3'
DGT28R (SEQ ID n°: 48)	5' GAGGGTCGGCATCGTAT 3'
Sonda UPL154	n° en Cat 04694406001 (Roche, Indianapolis, IN)
Sonda TAFFY-HEX (SEQ ID n°: 49)	5' AGAGAAGTTTCGACGGATTTCCGGGC 3'
TAFII15-F (SEQ ID n°: 50)	5' GAGGATTAGGGTTTCAACGGAG 3'
TAFII15-R (SEQ ID n°: 51)	5' GAGAATTGAGCTGAGACGAGG 3'

Confirmación de integración de *dgt-28* por análisis de transferencia Southern. Se utilizó el análisis de transferencia Southern para crear el modelo de integración del fragmento de ADN con cadena T insertado e identificar los casos que contenían *dgt-28*. Se generaron datos para demostrar la integración y la integridad de las inserciones transgénicas dentro del genoma de *Arabidopsis*. Los datos de la transferencia Southern se usaron para identificar la integración simple de una copia intacta del ADN con cadena T. El análisis detallado de la transferencia Southern se realizó utilizando una sonda amplificada por PCR específica para el casete de expresión del gen *dgt-28*. La hibridación de la sonda con ADN genómico que se había digerido con enzimas de restricción específicas identificó fragmentos de ADN genómico de pesos moleculares específicos, cuyos modelos se utilizaron para identificar casos transgénicos de T₁ de inserción simple completos para el desarrollo a la siguiente generación.

Se recogieron muestras de tejido en tubos cónicos de 2 ml (Eppendorf™) y se liofilizaron durante 2 días. La

maceración de tejidos se realizó con un fumigador de tejidos KLECKO™ y perlas de tungsteno. Después de la maceración del tejido, el ADN genómico se aisló utilizando un procedimiento de aislamiento con CTAB. El ADN genómico se continuó purificando utilizando el Genomic Tips kit de Qiagen™. El ADN genómico se cuantificó mediante el Quant-IT™ Pico Green DNA assay kit (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADN genómico cuantificado se ajustó a 4 µg para una concentración constante.

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

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

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

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

Confirmación del casete de expresión génica *dgt-28* mediante análisis de PCR. La presencia del casete de expresión del gen *dgt-28* contenido en los casos de la planta de T₁ se detectó mediante una reacción de PCR de punto final. Los cebadores (Tabla 6) específicos para el activador AtUbi10 v2 y regiones AtuORF23 3'UTR v1 del casete de expresión del gen *dgt-28* se utilizaron para la detección.

Tabla 6. Cebadores oligonucleotídicos utilizados para la confirmación del casete de expresión del gen *dgt-28*.

Nombre del cebador	Secuencia
Oligo directo (SEQ ID n°: 52)	5' CTGCAGGTCAACGGATCAGGATAT 3'
Oligo inverso (SEQ ID n°: 53)	5' TGGGCTGAATTGAAGACATGCTCC 3'

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

Confirmación de transcripción relativa de *dgt-28* por análisis cuantitativo de PCR de transcripción inversa. Se recogieron muestras de tejido de plantas transgénicas *dgt-28* en placas de 96 pocillos y se congelaron a 80°C. La maceración de tejidos se realizó con un fumigador de tejidos KLECO™ y perlas de tungsteno (Environ Metal INC., Sweet Home, Oregon). Después de la maceración del tejido, el ARN total se aisló en un formato de alto rendimiento utilizando el equipo Qiagen™ Rneasy 96 (Qiagen™, Germantown, MD) según el protocolo sugerido por el fabricante, que incluía el tratamiento opcional Desoxirribonucleasa I en la columna. A esta etapa siguió posteriormente un tratamiento adicional con Desoxirribonucleasa I (Ambion™, Austin, TX) del ARN total eluido. La síntesis de ADnc se llevó a cabo utilizando el ARN total como plantilla con el equipo High Capacity cDNA Reverse

Transcription™ (Applied Biosystems, Austin, TX) siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante con la adición del oligonucleótido, TVN. La cuantificación de la expresión se completó mediante un ensayo con sonda de hidrólisis y se realizó por PCR en tiempo real utilizando el sistema LIGHTCYCLER® 480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Los ensayos se diseñaron para *dgt-28* y el gen de patrón interno "proteína desconocida" (número de registro en Genbank: AT4G24610) utilizando el programa informático de diseño de sonda LIGHTCYCLER® 2.0. Para la amplificación, se preparó la mezcla LIGHTCYCLE® 480 Probes Master (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) a una concentración final 1X en una reacción singleplex de 10 volúmenes que contenía 0,4 µM de cada cebador y 0,2 µM de cada sonda.

Tabla 7. Cebadores de PCR utilizados para el análisis cuantitativo de PCR de transcripción inversa de *dgt-28*.

Nombre del cebador	Secuencia
AT26410LP (SEQ ID n°: 54)	5' CGTCCACAAAGCTGAATGTG 3'
AT26410RP (SEQ ID n°: 55)	5' CGAAGTCATGGAAGCCACTT 3'
UPL146	n° en Cat 04694325001 (Roche, Indianapolis, IN)
DGT28F (SEQ ID n°: 56)	5' CTTCAAGGAGATTTGGGATTTGT 3'
DGT28R (SEQ ID n°: 57)	5' GAGGGTCGGCATCGTAT 3'
Sonda UPL154	n° en Cat 04694406001 (Roche, Indianapolis, IN)

10

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

15

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

25

30 Las plantas transgénicas de *Arabidopsis* de T₁ que contienen el transgén *dgt-28* se fumigaron con diferentes proporciones de glifosato. Se aplicaron proporciones elevadas en este estudio para determinar los niveles relativos de resistencia (105, 420, 1.680 o 3.360 g ae/ha). Una proporción típica para uso 1X de glifosato que controlará la *Arabidopsis* no transformada es de 1.120 g ae/ha. Las formulaciones de glifosato con la adición de sulfato de amonio se aplicaron a las plantas de T₁ con un fumigador de pista calibrado a 187 l/ha. Las plantas de *Arabidopsis* de T₁ que se usaron en este estudio fueron un número de copias variable para el transgén *dgt-28*. Las plantas de *Arabidopsis* de T₁ con pocas copias de *dgt-28* se autopolinizaron y se usaron para producir plantas de T₂. La tabla 8 muestra la comparación de las plantas transgénicas *dgt-28*, obtenidas de un gen de resistencia al herbicida glifosato, *dgt-1*, y referencias naturales. La tabla 9 muestra la comparación de *dgt-32* y *dgt-33* obtenidos a un gen de resistencia al herbicida glifosato, *dgt-1* y referencias naturales. La tabla 10 muestra la comparación de las nuevas enzimas bacterianas EPSP sintasa con las enzimas EPSP sintasa de clase I y las referencias a una proporción de glifosato de 1.680 g ae/ha.

35

40

Resultados de la selección de glifosato de plantas de *Arabidopsis* transformadas con *dgt-28*. Los transformantes de *Arabidopsis* de T₁ se seleccionaron en primer lugar del fondo de semillas no transformadas utilizando un esquema de selección de glufosinato. Se analizaron tres planos o 30.000 semillas por cada montaje de T₁. Las plantas de T₁ seleccionadas anteriormente se caracterizaron molecularmente y las plantas representativas con número de copias variable se trasplantaron posteriormente a macetas individuales y se fumigaron con varias proporciones de glifosato comercial como se describió anteriormente. La respuesta de estas plantas se presenta desde el punto de vista del %

45

de daño observado 2 semanas después del tratamiento (SDT). Los datos se presentan en una tabla que muestra plantas individuales que muestran poco o ningún daño (<20%), daño moderado (20-40%) o daño grave (> 40%). Se presenta una media aritmética y una desviación típica para cada montaje utilizado para la transformación de *Arabidopsis*. El intervalo en la respuesta individual también se indica en la última columna para cada proporción y transformación. La *Arabidopsis* no transformada natural (c.v. Columbia) sirvió como referencia sensible al glifosato.

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

En la tabla 10 se presenta un promedio general del daño en la población en porcentaje para las porcentajes de glifosato a 1.680 g ae/ha para demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con *dgt-3*, *dgt-7*, *dgt-28*, *dgt-32* y *dgt-33* frente a las referencias *dgt-1* y naturales.

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

Tabla 8. Respuesta de *Arabidopsis* de T₁ transformada con *dgt-28* a un intervalo de porcentajes de glifosato aplicados después del brote, en comparación con una población homocigótica resistente a *dgt-1* (T₄) y un patrón no transformado. % de daño observado 14 días después de la aplicación.

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

ES 2 738 585 T3

pDAB105531: TraP8 v2 -- <i>dgt-28 v5</i>						
	% de daño			% de daño		
105 g ae/ha de glifosato	3	1	0	10,8	10,4	0-25
420 g ae/ha de glifosato	3	0	1	22,8	18,6	8-50
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	5,3	3,8	0-8
3.360 g ae/ha de glifosato	0	4	0	29,3	6,8	22-35
pDAB105532: TraP9 v2 -- <i>dgt-28 v5</i>						
	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	3	0	1	17,5	28,7	0-60
420 g ae/ha de glifosato	1	1	2	39,5	25,1	18-70
1.680 g ae/ha de glifosato	3	0	1	26,3	36,1	5-80
3.360 g ae/ha de glifosato	3	0	1	25,8	32,9	8-75
pDAB105533: TraP12 v2 -- <i>dgt-28 v5</i>						
	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	5	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	4	1	0	10,0	10,0	0-25
420 g ae/ha de glifosato	1	1	3	53,6	34,6	8-85
1.680 g ae/ha de glifosato	4	1	0	11,0	8,2	0-20
3.360 g ae/ha de glifosato	0	2	3	55,0	25,5	25-80
pDAB105534: TraP13 v2 -- <i>dgt-28 v5</i>						
	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	5	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	4	0	1	14,0	20,6	0-50
420 g ae/ha de glifosato	3	1	1	17,6	19,5	0-50
1.680 g ae/ha de glifosato	3	0	2	39,0	47,1	5-100
3.360 g ae/ha de glifosato	2	2	1	31,2	22,3	18-70
pDAB4104: <i>dgt-1</i> (patrón transformado)	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	5	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	0	0	4	80,0	0,0	80

ES 2 738 585 T3

420 g ae/ha de glifosato	0	0	4	80,0	0,0	80
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	80,0	0,0	80
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	81,3	2,5	80-85
WT (patrón no transformado)						
	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	5	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
420 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

Tabla 9. Respuesta de *Arabidopsis* de T₁ transformada con *dgt-32* y *dgt-33* a un intervalo de porcentajes de glifosato aplicados después del brote, en comparación con una población homocigótica resistente a *dgt-1* (T₄) y un patrón no transformado. % daño observado 14 días después de la aplicación.

pDAB107532: TraP14 v2 - <i>dgt-32</i> v3						
	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	2	0	2	30,0	29,4	0-60
1.680 g ae/ha de glifosato	3	0	1	17,5	21,8	5-50
3.360 g ae/ha de glifosato	0	3	1	35,0	30,0	20-80
pDAB107534: TraP24 v2 -- <i>dgt-33</i> v3						
	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	2	2	0	21,3	14,9	5-40
420 g ae/ha de glifosato	1	1	2	46,3	30,9	5-70
1.680 g ae/ha de glifosato	1	0	3	62,5	38,8	5-90
3.360 g ae/ha de glifosato	1	0	3	62,0	36,0	8-80
pDAB4104: <i>dgt-1</i> (patrón transformado)						
	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0

pDAB4104: <i>dgt-1</i> (patrón transformado)	% de daño			% de daño		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
105 g ae/ha de glifosato	0	2	3	42,5	15,0	20-50
420 g ae/ha de glifosato	0	1	2	38,8	11,1	25-50
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	79,0	19,4	50-90
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	50,0	0,0	50
WT (patrón no transformado)	% de daño			% de daño		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	0	0	4	85,0	0,0	85
420 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

Tabla 10. Respuesta de *Arabidopsis* de T₁ transformada con *dgt-28*, *dgt-32*, *dgt-33*, *dgt-3* y *dgt-7* a glifosato aplicado después del brote a 1.680 g ae/ha, en comparación con una población homocigótica resistente a *dgt-1* (T₄), y un patrón no transformado. % de daño observado 14 días después de la aplicación.

			% de daño			% de daño		
			<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
Enzimas bacterianas	pDAB107527	TraP4 v2 -- <i>dgt-28 v5</i>	0	2	2	55,0	26,8	35-85
	pDAB105530	TraP5 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	0	4	2	47,5	27,5	25-85
	pDAB105531	TraP8 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	4	0	0	5,3	3,8	0-8
	pDAB105532	TraP9 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	3	0	1	26,3	36,1	5-80
	pDAB105533	Trap 12 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	4	1	0	11,0	8,2	0-20
	pDAB105534	TraP13 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	3	0	2	39,0	47,1	5-100
	pDAB107532	TraP14 v2 - <i>dgt-32 v3</i>	3	0	1	17,5	21,8	5-50
	pDAB107534	TraP24 v2 -- <i>dgt-33 v3</i>	1	0	3	62,5	38,8	5-90
Enzimas de clase I	pDAB102715	<i>dgt-3 v2</i>	4	0	3	42	48	0-100
	pDAB102716	<i>dgt-3 v3</i>	2	0	1	14	23	0-40
	pDAB102717	<i>dgt-3 v4</i>	3	2	1	28	35	10-100
	pDAB102785	<i>dgt-7 v4</i>	0	1	1	45	21	30-60
	pDAB4104	<i>dgt-1</i> (patrón transformado)	0	0	4	80,0	0,0	80

	--	WT (patrón no transformado)	0	0	4		100,0	0,0	100
--	----	-----------------------------	---	---	---	--	-------	-----	-----

dst-28 como marcador seleccionable. El uso de *dgt-28* como marcador seleccionable para el agente de selección de glifosato se prueba con las plantas transformadas con *Arabidopsis* descritas anteriormente. Aproximadamente 50 semillas de *Arabidopsis* de generación T₄ (homocigóticas para *dgt-28*) se añaden a aproximadamente 5.000 semillas naturales (sensibles al glifosato). Las semillas germinan y las plántulas se fumigan con una dosis selectiva de glifosato. Se comparan varios tratamientos de glifosato; cada bandeja de plantas recibe uno o dos tiempos de aplicación de glifosato en uno de los siguientes esquemas de tratamiento: 7 DDP (días después de la plantación), 11 DDP o 7 seguidos de 11 DDP. Dado que todas las plantas también contienen un gen de resistencia al glufosinato en el mismo vector de transformación, las plantas que contienen *dgt-28* seleccionadas con glifosato pueden compararse directamente con las plantas que contienen *DSM-2* o *pat* seleccionadas con glufosinato.

Los tratamientos con glifosato se aplican con una boquilla de fumigación DeVilbiss™ como se describió anteriormente. Las plantas transgénicas que contienen *dgt-28* se identifican como "resistentes" o "sensibles" 17 DDP. Los tratamientos de 26,25-1.680 g ae/ha de glifosato aplicados 7 y 11 días después de la plantación (DDP), muestran una selección efectiva para las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen *dgt-28*. Se cuentan las plantas sensibles y resistentes y se constata que el número de plantas tolerantes al glifosato se correlaciona con el número original de semillas transgénicas que contienen el transgén *dgt-28* que se plantaron. Estos resultados indican que *dgt-28* puede usarse eficazmente como un marcador seleccionable alternativo para una población de *Arabidopsis* transformada.

Heredabilidad. Los casos de *Arabidopsis* de T₁ transgénicos confirmados se autopolinizaron para producir semillas de T₂. Se comprobó la descendencia de estas semillas aplicando herbicida Ignite™ que contenía glufosinato (200 g ae/ha) a 100 hermanos de T₂ aleatorios. Cada una de las plantas de T₂ se trasplantó a macetas de 7,5 cm cuadrados antes de la fumigación (fumigador-oruga a una proporción de aplicación de 187 l/ha). Las familias de T₁ (plantas de T₂) segregadas en el modelo 3 Resistente: 1 Sensible anticipado para un locus único de herencia dominante con herencia mendeliana determinado por la prueba de la Ji al cuadrado (P > 0,05). El porcentaje de familias de T₁ que se segregaron con la herencia mendeliana esperada se ilustra en la Tabla 11 y demuestra que el rasgo *dgt-28* se transmite a través de la herencia mendeliana a la generación T₂. Las semillas se recolectaron de 5 a 15 individuos de T₂ (semilla de T₃). En 25 hermanos de T₃ de cada una de 3-4 familias de T₂ seleccionadas al azar se comprobó la descendencia como se describió anteriormente. Los datos no mostraron segregación y, por lo tanto, demostraron que *dgt-28* y *dgt-3* están integrados de manera estable en el cromosoma y se heredan en modo mendeliano por lo menos a tres generaciones.

Tabla 11. Porcentaje de familias de T₁ (plantas de T₂) que se segregan como herencia mendeliana única para una prueba de descendencia de 100 plantas.

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

referencia con <i>yfp</i>	
---------------------------	--

Datos de *Arabidopsis* de T₂. Las plantas de segunda generación (T₂) de casos de *Arabidopsis* de T₁ seleccionados que contenían pocos números de copias del transgén *dgt-28* se caracterizaron además por la tolerancia al glifosato. El glifosato se aplicó como se describió anteriormente. La respuesta de las plantas se presenta desde el punto de vista del % de daño observado 2 semanas después del tratamiento (SDT). Los datos se presentan en forma de histograma de individuos que presentan poco o ningún daño (<20%), daño moderado (20-40%) o daño grave (> 40%). Se presentan una media aritmética y una desviación típica para cada montaje utilizado para la transformación de *Arabidopsis*. El intervalo en la respuesta individual también se indica en la última columna para cada porcentaje y transformación. La *Arabidopsis* no transformada natural (cv. Columbia) sirvió como referencia sensible al glifosato. En las plantas hemicigóticas y homocigóticas de la generación T₂ se dispuso para pruebas para cada caso y, por lo tanto, se incluyeron para cada porcentaje de glifosato analizado. Las plantas hemicigóticas contienen dos alelos diferentes en un locus en comparación con las plantas homocigóticas que contienen los mismos dos alelos en un locus. Cabe esperar una variabilidad de la respuesta al glifosato en la generación T₂ como resultado de la diferencia en la dosis de genes para plantas hemicigóticas en comparación con las homocigóticas. La variabilidad en respuesta al glifosato se refleja en la desviación típica y el intervalo de respuesta.

En la generación T₂ ambos casos de *dgt-28* de una sola copia y de copia múltiple se caracterizaron por la tolerancia al glifosato. En un caso, las plantas de una sola copia presentaban niveles similares de tolerancia al glifosato. En la tabla 12 se presentan datos característicos para un caso de T₂ de una sola copia. Los casos que contienen *dgt-28* unido a TraP5 v2 no proporcionaron una tolerancia sólida al glifosato en comparación con los montajes de *dgt-28* que contenían otros péptidos de tránsito TraP. Sin embargo, los montajes de *dgt-28* TraP5 proporcionaron un bajo nivel de tolerancia al glifosato en comparación con la referencia Columbia no transformada. Hubo ocasiones en que los casos que se mostraron contenían dos o más copias de *dgt-28* eran más sensibles a porcentajes elevados de glifosato (datos no mostrados). Este aumento en la sensibilidad al glifosato es similar a los datos descritos anteriormente para las plantas de T₁ que también contenían gran número de copias del transgén *dgt-28*. Es probable que la presencia de gran número de copias del transgén en de las plantas de *Arabidopsis* provoque silenciamiento transgénico u otros efectos epigenéticos que produzcan sensibilidad al glifosato, a pesar de la presencia del transgén *dgt-28*.

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

Además de *dgt-28*, los casos de *Arabidopsis* de T₂ transformados con *dgt-3* se presentan en la tabla 13. Como se describe para los casos de *dgt-28* en la tabla 12, la tabla de datos contiene un caso representativo que es característico de la respuesta al glifosato de cada montaje. Para la caracterización de *dgt-3*, se compararon los montajes que contenían una sola UTP (unidad de transformación en plantas) con el gen *dgt-3* dirigido por el activador AtUbi10 (pDAB102716, FIG. 29 y pDAB102715, FIG. 28) con montajes con el mismo gen que contiene 2 UTP del gen (pDAB102719, FIG. 32; pDAB102718, FIG. 33). Los montajes que contenían 2 UTP utilizaron el activador AtUbiO para dirigir una copia del gen y el activador CsVMV para dirigir la otra copia. El uso de la doble UTP se incorporó para comparar las plantas transgénicas con *dgt-3* con las plantas transgénicas con *dgt-28* que contenían dos copias del transgén. Los datos demostraron que los casos de *dgt-3* de T₂ con una sola copia fueron más sensibles al glifosato que los casos de *dgt-28* con una sola copia probados, pero fueron más tolerantes que la referencia no transformada. Las familias de T₁ que contenían 2 UTP del gen *dgt-3* proporcionaron un mayor nivel de tolerancia observado al glifosato en comparación con los montajes de 1 UTP. En ambos casos, las familias de T₁ se compararon con las referencias *dgt-1* y natural. Los datos de T₂ demuestran que *dgt-28* proporciona una fuerte tolerancia como casos con una sola copia.

Tabla 12. Respuesta de cada uno de los casos de *Arabidopsis* de T₂ seleccionados que contienen *dgt-28* a glifosato aplicado después del brote en porcentajes variables, en comparación con una población homocigótica resistente a *dgt-1* (T₄) y un patrón no transformado. % del daño observado 14 días después de la aplicación.

pDAB105530: TraP5 v2 - <i>dgt-28</i> v5	% de daño			% de daño		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
1 copia						
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	0	0	4	75,0	17,8	50-90
840 g ae/ha de glifosato	0	0	4	80,0	20,0	50-90
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	75,0	10,8	60-85

ES 2 738 585 T3

3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	76,3	4,8	70-80
pDAB105531: TraP8 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	% de daño			% de daño		
1 copia	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,5	1,0	0-2
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	1,3	2,5	0-5
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	7,5	5,0	5-15
3.360 g ae/ha de glifosato	4	0	0	7,5	6,5	0-15
pDAB105532: TraP9 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	% de daño			% de daño		
1 copia	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	2,0	4,0	0-8
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	9,0	2,0	8-12
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	7,3	4,6	2-12
3.360 g ae/ha de glifosato	4	0	0	11,0	1,2	10-12
pDAB105533: TraP12 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	% de daño			% de daño		
1 copia	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
3.360 g ae/ha de glifosato	3	1	0	13,3	7,9	8-25
pDAB105534: TraP13 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	% de daño			% de daño		
1 copia	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	3	1	0	5,0	10,0	0-20
840 g ae/ha de glifosato	3	1	0	5,0	10,0	0-20
1.680 g ae/ha de glifosato	2	2	0	10,0	11,5	0-20
3.360 g ae/ha de glifosato	2	2	0	15,0	12,2	5-30

ES 2 738 585 T3

WT (patrón no transformado)	% de daño			% de daño			
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)	
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
420 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100	
840 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100	
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100	
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100	
pDAB4104: <i>dgt-1</i> (patrón transformado)	% de daño			% de daño			
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)	
1 copia							
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
420 g ae/ha de glifosato	0	4	0	37,5	2,9	35-40	
840 g ae/ha de glifosato	0	0	4	45,0	0,0	45	
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	47,5	2,9	45-50	
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	50,0	0,0	50	

Tabla 13. Respuesta de los casos seleccionados de *Arabidopsis* de T₂ transformados con *dgt-3* a glifosato aplicado después de la aparición a porcentajes variables. % de daño observado 14 días después de la aplicación.

pDAB102716: <i>dgt-3</i> v3 (1 PTU)	% de daño			% de daño			
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)	
1 copia seg							
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0	0	0	
420 g ae/ha de glifosato	1	1	2	39	25	15-65	
840 g ae/ha de glifosato	0	2	2	50	23	30-70	
1.680 g ae/ha de glifosato	0	1	3	69	19	40-80	
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	79	6	70-85	
pDAB102719: <i>dgt-3</i> v3 (2 PTU)	% de daño			% de daño			
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)	
1 copia seg							
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0	0	0	
420 g ae/ha de glifosato	0	4	0	20	0	20	
840 g ae/ha de glifosato	0	3	1	38	5	35-45	
1.680 g ae/ha de glifosato	3	1	0	15	7	10-25	
3.360 g ae/ha de glifosato	2	2	0	21	8	15-30	

pDAB102716: <i>dgt-3 v3</i> (1 PTU)	% de daño			% de daño		
pDAB102715: <i>dgt-3 v2</i> (1 PTU)	% de daño			% de daño		
1 copia seg	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha de glifosato	2	2	0	26	16	10-40
840 g ae/ha de glifosato	0	2	2	55	17	40-70
1.680 g ae/ha de glifosato	0	2	2	56	22	35-75
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	65	17	50-80
pDAB102718: <i>dgt-3 v2</i> (2 PTU)	% de daño			% de daño		
1 copia seg	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	5	7	0-15
840 g ae/ha de glifosato	2	2	0	23	10	15-35
1.680 g ae/ha de glifosato	3	0	1	20	20	5-50
3.360 g ae/ha de glifosato	1	1	2	36	22	15-60

- Datos de *Arabidopsis* de T₃. Las plantas de tercera generación (T₃) de casos de *Arabidopsis* de T₂ seleccionadas que contenían pocos números de copias del transgén *dgt-28* se caracterizaron además por la tolerancia al glifosato.
- 5 Se seleccionaron 25 plantas por línea con glufosinato como se describió anteriormente y las líneas de cada montaje analizado no se segregaron para el gen marcador seleccionable. Se aplicó glifosato como se describió anteriormente. La respuesta de las plantas se presenta desde el punto de vista del % de daño observado 2 semanas después del tratamiento (SDT). Los datos se presentan en forma de histograma de individuos que presentan poco o ningún daño (<20%), daño moderado (20-40%) o daño grave (> 40%). Se presentan una media aritmética y una
- 10 desviación típica para cada montaje utilizado para la transformación de *Arabidopsis*. El intervalo en la respuesta individual también se indica en la última columna para cada porcentaje y transformación. La *Arabidopsis* no transformada natural (cv. Columbia) sirvió como referencia sensible al glifosato.

- Tabla 14. Respuesta de cada uno de los casos de *Arabidopsis* de T₃ seleccionados que contienen *dgt-28* al glifosato aplicado después del brote a porcentajes variables, en comparación con una población homocigótica resistente a
- 15 *dgt-1* (T₄) y un patrón no transformado. % de daño observado 14 días después de la aplicación.

<i>dgt-28</i> (pDAB107602)	% de amplitud del daño (nº de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	0	0	4	73,8	2,5	70-75
840 g ae/ha de glifosato	0	0	4	71,3	7,5	60-75
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	77,5	2,9	75-80
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	77,5	2,9	75-80

ES 2 738 585 T3

TraP4:: <i>dgt-28</i> (pDAB107527)	% de amplitud del daño (nº de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	5,0	0,0	5
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	10,0	0,0	10
3.360 g ae/ha de glifosato	1	3	0	18,8	2,5	15-20
TraP5 v1:: <i>dgt-28</i> (pDAB102792)	% de amplitud del daño (nº de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	3	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha de glifosato	3	0	0	0,0	0,0	0
1.680 g ae/ha de glifosato	3	0	0	6,0	1,7	5-8
3.360 g ae/ha de glifosato	2	0	0	6,5	2,1	5-8
TraP5 v2:: <i>dgt-28</i> (pDAB105530)	% de amplitud del daño (nº de réplicas)			% de análisis del daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	6,0	1,7	5-8
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	8,0	0,0	8
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	14,3	1,5	12-15
3.360 g ae/ha de glifosato	1	3	0	18,7	2,5	15-20

ES 2 738 585 T3

TraP8 v2::dgt-28 (pDAB105531)		% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)	
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	2,5	5,0	0-10	
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	3,3	3,9	0-8	
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	2,5	2,9	0-5	
3.360 g ae/ha de glifosato	4	0	0	7,3	6,4	2-15	
TraP9 v2::dgt-28 (pDAB105532)		% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)	
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	1,3	2,5	0-5	
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	1,8	2,4	0-5	
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
3.360 g ae/ha de glifosato	4	0	0	10,0	4,4	5-15	
TraP 12 v2::dgt-28 (pDAB105533)		% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)	
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	3,8	7,5	0-15	
3.360 g ae/ha de glifosato	4	0	0	6,3	4,8	0-10	
TraP 13 v2::dgt-28 (pDAB105534)		% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)	
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
420 g ae/ha de glifosato	2	2	0	10,0	11,5	0-20	
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	1,3	2,5	0-5	
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	2,8	1,5	2-5	
3.360 g ae/ha de glifosato	4	0	0	8,0	0,0	8	

TraP23:: <i>dgt-28</i> (pDAB107553)	% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	7,8	2,1	5-10
3.360 g ae/ha de glifosato	4	0	0	10,8	3,0	8-15
WT (patrón no transformado)	% de amplitud del daño (n° de réplicas)			% de análisis del daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
840 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

5 Selección de plantas transformadas. Las semillas de T₁ recién cosechadas [genes *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33 v1*] se dejaron secar a temperatura ambiente y se enviaron a Indianápolis para su análisis. La semilla de T₁ se sembró en bandejas de germinación de 26,5 x 51 cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), cada una de las cuales recibió 5 alícuotas de 200 mg de semilla de T₁ estratificada (~10.000 semillas) que se habían puesto en suspensión previamente en 40 ml de solución de agar-agarosa al 0,1% y almacenado a 4°C durante 2 días para completar los requisitos de latencia y asegurar la germinación sincrónica de las semillas.

10 Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) se cubrió con vermiculita fina y se regó por debajo con la solución de Hoagland hasta que se humedeció, luego se deja drenar por gravedad. Cada alícuota de 40 ml de semilla estratificada se sembró uniformemente sobre la vermiculita con una pipeta y se cubrió con mini-invernaderos (KORD™ Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4-5 días. Los mini-invernaderos se retiraron una vez que las plantas habían germinado antes de la selección inicial del transformante utilizando un fumigador de glufosinato después del brote (seleccionando el gen *dsm-2* co-transformado).

15 Seis días después de la plantación (DDP) y nuevamente 10 DDP, se fumigaron plantas T₁ (cotiledón y fase de 2-4 hojas, respectivamente) con una solución al 0,1% de herbicida IGNITE™ (280 g ai/l de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) a un volumen de fumigación de 10 ml/bandeja (703 l/ha) utilizando una boquilla de fumigación de aire comprimido DeVilbiss™ para proporcionar una proporción efectiva de 200 g ae/ha de glufosinato por aplicación. Las supervivientes (plantas en crecimiento activo) se identificaron 4-7 días después de la fumigación final. Las plantas supervivientes se trasplantaron una a una en macetas de 3 pulgadas (7,62 centímetros) 20 preparadas con medios de cultivo (Metro Mix 360™). Las plantas se criaron en el invernadero al menos 1 día antes del muestreo de tejido para análisis del número de copias.

25 Se tomaron muestras de plantas de T₁ y análisis del número de copias para los genes *dgt-31*, *dgt-32*, y se completaron para el gen *dgt-33 v1*. Las plantas de T₁ se asignaron luego a varias proporciones de glifosato, de modo que un intervalo de copias estaban entre cada proporción. Para Arabidopsis, 26,25 g ae/ha de glifosato es una dosis eficaz para distinguir las plantas sensibles de aquellas con niveles significativos de resistencia. Se aplicaron proporciones elevadas para determinar los niveles relativos de resistencia (105, 420, 1.680 o 3.360 g ae/ha). La tabla 15 muestra las comparaciones extraídas a *dgt-1*.

30 Todas las aplicaciones de herbicida de glifosato se realizaron con un fumigador oruga en un volumen de fumigación de 187 l/ha. El glifosato utilizado fue de la formulación de sal de dimetilamina Durango comercial (480 g ae/l, Dow AgroSciences, LLC). Las plantas de T₁ de pocas copias que presentaron tolerancia a glufosinato o glifosato accedieron aún más en la generación T₂.

Las primeras transformaciones de *Arabidopsis* se realizaron utilizando *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33 v1*. Los transformantes de T₁ se seleccionaron en primer lugar del fondo de semillas no transformadas utilizando un

esquema de selección de glufosinato. Se analizaron tres pisos o 30.000 semillas para cada montaje de T₁. Se calculó la frecuencia de transformación y los resultados de los montajes *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33* de T₁ se enumeran en la tabla 15.

5 Tabla 15. Frecuencia de transformación de montajes de *Arabidopsis dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33* de T₁ seleccionados con glufosinato para la selección del gen marcador seleccionable DSM-2.

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

10 Las plantas de T₁ seleccionadas anteriormente se trasplantaron posteriormente a macetas individuales y se fumigaron con varias proporciones de glifosato comercial. La Tabla 16 compara la respuesta de *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33 v1* y los genes de referencia para impartir resistencia de glifosato a transformantes de *Arabidopsis* de T₁. La respuesta se presenta desde el punto de vista del % de daño observado 2 SDT. Los datos se presentan en forma de histograma de plantas que presentan poco o ningún daño (<20%), daño moderado (20-40%) o daño grave (> 40%). Se presenta una media aritmética y una desviación típica para cada tratamiento. El intervalo en cada respuesta también se indica en la última columna para cada proporción y transformación. La *Arabidopsis* no transformada natural (cv. Columbia) sirvió como referencia sensible al glifosato. El gen *DGT-31 (v1)* con el péptido de tránsito

15 TraP23 impartió ligera tolerancia a los herbicidas a cada una de las plantas de *Arabidopsis* de T₁ en comparación con la referencia negativa, pero el gen presentó una mejor tolerancia con el péptido de tránsito TraP8. Tanto la DGT-32 como la DGT-33 demostraron una fuerte tolerancia al glifosato a las proporciones probadas con TraP8 y con sus respectivos péptidos de tránsito de diferentes cloroplastos (TraP14 y TraP24, respectivamente). En un tratamiento dado, el nivel de respuesta de la planta varió mucho, lo que puede atribuirse al hecho de que cada planta representa

20 un caso de transformación independiente y, por lo tanto, el número de copias del gen de interés varía de una planta a otra. Cabe destacar que, en cada proporción de glifosato analizada, hubo plantas que fueron más tolerantes que otros. En la tabla 16 se presenta un promedio general del daño en la población por proporción para demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33 v1* en comparación con *dgt-1 v1* o las referencias naturales.

25 Tabla 16. Respuesta de *Arabidopsis* de T₁ transformada por *dgt-31*, *dgt-32* y *dgt-33 v1* a un intervalo de proporciones de glifosato aplicadas después del brote, en comparación con una población homocigótica resistente a *dgt-1 (T4)* o un patrón no transformado. % de daño observado 2 semanas después del tratamiento.

TraP23 <i>dgt-31</i>	% de daño			% de daño		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
Promedios						
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	0	0	4	81,3	2,5	80-85
420 g ae/ha de glifosato	0	0	4	97,3	4,9	90-100
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	90,0	7,1	85-100
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	91,3	6,3	85-100
TraP14 <i>dgt-32</i>	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	2	0	2	30,0	29,4	0-60
1.680 g ae/ha de glifosato	3	0	1	17,5	21,8	5-50
3.360 g ae/ha de glifosato	0	3	1	35,0	30,0	20-80
TraP24 <i>dgt-33</i>	% de daño			% de daño		

ES 2 738 585 T3

Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	2	2	0	21,3	14,9	5-40
420 g ae/ha de glifosato	1	1	2	46,3	30,9	5-70
1.680 g ae/ha de glifosato	1	0	3	62,5	38,8	5-90
3.360 g ae/ha de glifosato	1	0	3	62,0	36,0	8-80
TraP8 dgt-31	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0,0
105 g ae/ha de glifosato	0	1	3	0,0	43,8	17,0
420 g ae/ha de glifosato	1	2	1	0,0	43,8	32,5
1.680 g ae/ha de glifosato	0	1	3	0,0	71,3	27,8
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	0,0	81,3	8,5
TraP8 dgt-32	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	<20%	<20%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	4	0,0	0,0	0,0
105 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0,0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	7,5	5,0
1.680 g ae/ha de glifosato	3	1	0	0,0	10,8	9,6
3.360 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	12,8	3,2
TraP8 dgt-33	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	<20%	<20%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0,0
105 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0,0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	2,5	3,8
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	6,3	2,5
3.360 g ae/ha de glifosato	3	1	0	0,0	20,0	13,5
dgt-1 (patrón transformado)	% de daño			% de daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	0	1	3	42,5	15,0	20-50
420 g ae/ha	0	2	2	38,8	11,1	25-50
1.680 g ae/ha	0	0	4	79,0	19,4	50-90
3.360 g ae/ha	0	0	4	50,0	0,0	50
WT (patrón no transformado)	% de daño			% de daño		

Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha de glifosato	0	0	4	85,0	0,0	85
420 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

Transformación del maíz. Los métodos de clonación estándar, como se describió anteriormente, se usaron en la construcción de vectores binarios para su uso en la transformación del maíz por *Agrobacterium tumefaciens*. La tabla 17 enumera los vectores que se construyeron para la transformación del maíz. Los siguientes elementos genéticos se usaron en los vectores que contenían *dgt-28*; se usó el activador Ubiquitina 1 de *Zea mays* (ZmUbi1; patente de EE. UU. n° 5.510.474) para dirigir la secuencia codificadora *dgt-28* que está flanqueada por una región no traducida 3' de lipasa de *Zea mays* (ZmLip 3'UTR; patente de EE. UU. n° 7.179.902) el casete marcador seleccionable consiste en el activador de Ubiquitina 1 de *Zea mays* que se usó para dirigir la secuencia codificadora de *aad-1* (patente de EE. UU. n° 7.838.733) que está flanqueada por una región no traducida 3' de lipasa de *Zea mays*. La secuencia de codificación de *aad-1* confiere tolerancia a los herbicidas con fenoxi auxina, tales como, los herbicidas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y a ariloxifenoxipropionato (AOPP).

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

Se completaron otros montajes que contienen un gen indicador de la proteína fluorescente amarilla (*yfp*; solicitud de patente de EE.UU. 2007/0298412). pDAB109812 contiene un casete de gen indicador de *yfp* que es conducido por el activador de Ubiquitina 1 de *Zea mays* y flanqueado por la región no traducida per 5 3' de *Zea mays* (Zm per5 3'UTR; patente de EE. UU. n° 7.179.902), el casete marcador seleccionable consiste en activador del virus baciliforme de la caña de azúcar (SCBV; patente de EE.UU. n° 5.994.123) que se utiliza para dirigir la expresión de *aad-1* y está flanqueado por la región no traducida 3' de la lipasa de *Zea mays*. pDAB101556 contiene un casete de *yfp* que es conducido por el activador de ubiquitina 1 de *Zea mays* y flanqueado por la región no traducida per 5 3' de *Zea mays*, el casete marcador seleccionable consiste en el activador de ubiquitina 1 de *Zea mays* que se usa para dirigir la expresión de *aad-1* y está flanqueado por la región no traducida 3' de la lipasa de *Zea mays*. pDAB107698 contiene un casete de *dgt-28* que está conducido por el activador de Ubiquitina 1 de *Zea mays* y está flanqueado por una región no traducida 3' de la lipasa de *Zea mays*, un casete de *yfp* que es conducido por el activador de Ubiquitina 1 de *Zea mays* y flanqueado por la región no traducida per 5 3' de *Zea mays*, el casete marcador seleccionable consiste en el activador del virus baciliforme de la caña de azúcar que se usa para conducir la expresión de *aad-1* y está flanqueado por la región no traducida 3' de la lipasa de *Zea mays*. Tres de estos montajes son vectores binarios estándar normales.

Tabla 17. Vectores de transformación del maíz

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

Plásmido nº	FIG. nº:	Descripción de elementos génicos
pDAB108386	43	Precursor superbinario ZmUbi1/TraP23 <i>dgt-28/ZmLip 3'UTR</i> :: ZmUbi1/ <i>aad-1 /ZmLip 3'UTR</i>
pDAB108387	44	Precursor superbinario ZmUbi1/TraP5 <i>dgt-28/ZmLip 3'UTR</i> ::ZmUbi1/ <i>aad-1 /ZmLip 3'UTR</i>

- Esterilización de la espiga y aislamiento del embrión. Para obtener embriones inmaduros de maíz, las plantas de la estirpe endogámica B104 de *Zea mays* se cultivaron en el invernadero y se autopolinizaron o se polinizaron de modo endogámico para producir espigas. Las espigas se cosecharon aproximadamente 9-12 días después de la polinización. El día del experimento, las espigas se esterilizaron superficialmente por inmersión en una solución al 20% de hipoclorito de sodio (5%) y se agitaron durante 20-30 minutos, seguido de tres enjuagues en agua estéril. Después de la esterilización, se disecaron asépticamente los embriones zigóticos inmaduros (1,5-2,4 mm) de cada espiga y se distribuyeron al azar en tubos de microcentrifuga que contenían medios de infección líquidos (medio basal LS, 4,43 gm/l; solución de vitamina N6 [1000X], 1,00 ml/l; L-prolina, 700,0 mg/l; sacarosa, 68,5 gm/l; D(+)
- 5 Glucosa, 36,0 gm/l; 10 mg/ml de 2,4-D, 150 µl/l). Para una serie dada de experimentos, se usaron embriones agrupados de 3 espigas para cada transformación.

Inicio del cultivo de *Agrobacterium*:

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

- Cultivo y co-cultivo de *Agrobacterium*. Las colonias de *Agrobacterium* se tomaron de la placa YEP, se pusieron en suspensión en 10 ml de medio de infección en un tubo desechable de 50 ml, y la densidad celular se ajustó a OD₆₀₀ nm de 0,2-0,4 usando un espectrofotómetro. Los cultivos de *Agrobacterium* se colocaron en un agitador rotatorio a 125 rpm, a temperatura ambiente, mientras se realizaba la disección del embrión. Embriones zigóticos inmaduros con un tamaño de 1,5 a 2,4 mm se aislaron de los granos de maíz esterilizados y se colocaron en 1 ml del medio de infección) y se lavaron una vez en el mismo medio. La suspensión de *Agrobacterium* (2 ml) se añadió a cada tubo y los tubos se colocaron en una plataforma de agitación durante 10-15 minutos. Los embriones se transfirieron a medios de co-cultivo (sales MS, 4,33 gm/l; L-prolina, 700,0 mg/l; Myo-inositol, 100,0 mg/l; hidrolizado enzimático de caseína 100,0 mg/l; Dicamba-KOH 30 mM, 3,3 mg/l; sacarosa, 30,0 gm/l; Gelzan™, 3,00 gm/l; MS-Vitamina modificada [1000X], 1,00 ml/l; 8,5 mg/ml AgNO₃, 15,0 mg/l; DMSO, 100 µM), orientado con el escutelo hacia arriba e incubado a 25°C, bajo 24 horas de luz a 50 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidad de luz de durante 3 días.

- Selección de callos y regeneración de casos supuestos. Después del período de cocultivo, los embriones se transfirieron a medios de reposo (sales MS, 4,33 gm/l; L-prolina, 700,0 mg/l; 1,2,3,5/4,6-hexahidroxiclohexano, 100 mg/l; MES [(ácido 2-(n-morfolino) -etansulfónico), ácido libre] 0,500 gm/l; hidrolizado enzimático de caseína 100,0 mg/l; Dicamba-KOH 30 mM, 3,3 mg/l; sacarosa, 30,0 gm/l; Gelzan 2,30 gm/l; MS-Vitamina modificada [1000X], 1,00 ml/l; 8,5mg/ml AgNO₃, 15,0 mg/l; Carbenicilina, 250,0 mg/l) sin agente selectivo e incubado bajo 24 horas de luz a 50 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidad de luz y a 25°C durante 3 días.

- Los experimentos de respuesta a la dosis de inhibición del crecimiento sugirieron que las concentraciones de glifosato de 0,25 mM y mayores eran suficientes para inhibir el crecimiento celular en la estirpe de maíz B104 sin transformar. Los embriones se transfirieron a medios de Selección 1 que contenían glifosato 0,5 mM (sales de MS, 4,33 gm/l; L-prolina, 700,0 mg/l; Myo-inositol, 100,0 mg/l; MES [(ácido 2-(n-morfolino)-etansulfónico), ácido libre] 0,500 gm/l; hidrolizado enzimático de caseína 100,0 mg/l; Dicamba-KOH 30 mM, 3,3 mg/l; sacarosa, 30,0 gm/l; Gelzan™ 2,30 gm/l; MS-vitamina modificada [1000X], 1,00 ml/l; 8,5 mg/ml AgNO₃, 15,0 mg/l; Carbenicilina, 250,0 mg/l) e incubados en luz oscura y/o bajo 24 horas de luz a 50 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidad de luz durante 7- 14 días a 28°C.

- Los callos embrionarios en proliferación se transfirieron a medios de Selección 2 que contenían glifosato 1,0 mM (sales MS, 4,33 gm/l; 1,2,3,5/4,6-hexahidroxiclohexano, 100 mg/l; L-prolina, 700,0 mg/l; MES [ácido 2-(n-morfolino)-etansulfónico), ácido libre] 0,500 gm/l; hidrolizado enzimático de caseína 100,0 mg/l; Dicamba-KOH 30 mM, 3,3 mg/l; sacarosa, 30,0 gm/l; Gelzan™ 2,30 gm/l MS-; Vitamina modificada [1000X], 1,00 ml/l; 8,5 mg/ml de AgNO₃, 15,0 mg/l; Carbenicilina, 250,0 mg/l; ácido R-Haloxifop (0,1810 mg/l), y se incubaron en la oscuridad y/o bajo 24 horas de luz a 50 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidad de luz durante 14 días a 28°C. Esta etapa de selección permitió al callo transgénico proliferar y diferenciarse aún más. El período de selección del callo duró de tres a cuatro semanas.

- Los callos embrionarios en proliferación se transfirieron a medios PreReg que contenían glifosato 0,5 mM (sales MS, 4,33 g/l; 1,2,3,5/4,6-hexahidroxiclohexano, 100 mg/l; L-prolina, 350,0 mg/l; MES [(ácido 2-(n-morfolino)-etansulfónico), ácido libre] 0,250 gm/l; hidrolizado enzimático de caseína 50,0 mg/l; NAA-NaOH 0,500 mg/l; ABA-EtOH 2,50 mg/l; BA 1,00 mg/l; sacarosa, 45,0 gm/l; Gelzan™ 2,50 gm/l; MS-Vitamina modificada [1000X], 1,00 ml/l; 8,5 mg/ml AgNO₃, 1,00 mg/l; Carbenicilina, 250,0 mg/l) y cultivada bajo una luz de 24 horas a 50 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidad de luz durante 7 días a 28°C.

Los callos embrionarios con yemas similares a brotes se transfirieron a un medio de regeneración que contenía glifosato 0,5 mM (sales MS, 4,33 gm/l; 1,2,3,5/4,6-hexahidroxiclohexano, 100,0 mg/l; sacarosa, 60,0 gm/l; Goma Gellan G434™ 3,00 gm/l; MS-Vitamina modificada [1000X], 1,00 ml/l; Carbenicilina, 125,0 mg/l) y cultivada bajo 24 horas de luz a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz durante 7 días.

- 5 Los brotes pequeños con raíces primarias se transfirieron a los medios de enraizamiento (Sales MS, 4,33 g/l; MS-Vitamina modificada [1000X], 1,00 ml/l; 1,2,3,5/4,6-hexahidroxiclohexano, 100 mg/l; Sacarosa, 60,0 gm/l; Goma Gellan G434™ 3,00 gm/l; Carbenicilina, 250,0 mg/l en bandejas vegetales y se incubaron 16/8 horas de luz/oscuridad a 140-190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz durante 7 días a 27°C. Las supuestas plantas transgénicas se analizaron para determinar el número de copias del transgén utilizando los protocolos descritos anteriormente y se transfirieron al suelo.

- 15 Confirmación molecular de la presencia de los transgenes *dst-28* y *aad-1* en las plantas de maíz. La presencia de las secuencias de polinucleótidos *dgt-28* y *aad-1* se confirmó mediante análisis con sonda de hidrólisis. Se seleccionaron inicialmente plantas de maíz de T₀ aisladas mediante un análisis con sonda de hidrólisis, análogo a TAQMAN™, para confirmar la presencia de los transgenes *aad-1* y *dgt-2*. Los datos generados en estos estudios se utilizaron para determinar el número de copias del transgén y se utilizaron para seleccionar casos de maíz transgénico para el retrocruzamiento y desarrollo hacia la generación de T₁.

- 20 Se recogieron muestras de tejido en placas de 96 pocillos, la maceración del tejido se realizó con un pulverizador de tejidos KLECO™ y perlas de acero inoxidable (Hoover Precision Products, Cumming, GA), en tampón Qiagen™ RLT. Tras la maceración del tejido, se aisló el ADN genómico en un formato de alto rendimiento utilizando el equipo Biosprint 96™ Plant (Qiagen, Germantown, MD) según el protocolo sugerido por el fabricante. El ADN genómico se cuantificó con el equipo de análisis de ADN Quant-IT™ Pico Green (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADN genómico cuantificado se ajustó a aproximadamente 2 ng/ μl para el análisis con sonda de hidrólisis utilizando un manipulador automático de líquidos BIOROBOT3000™ (Qiagen, Germantown, MD). La determinación del número de copias transgénicas mediante un ensayo con sonda de hidrólisis, análogo al análisis TAQMAN®, se realizó por PCR en tiempo real utilizando el sistema LIGHTCYCLER® 480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Los análisis se diseñaron para *aad-1*, *dgt-28* y un gen de referencia interno Invertasa (nº de registro en Genbank: U16123.1) utilizando el programa informático de diseño de sonda LIGHTCYCLER® 2.0. Para la amplificación, se preparó la mezcla LIGHTCYCLER® 480 Probes Master (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) a una concentración final 1X en una reacción multiplex de 10 μl de volumen que contenía 0,4 μM de cada cebador para *aad-1* y *dgt-28* y 0,2 μM de cada sonda (tabla 18).

- 35 Se realizó una reacción de amplificación en dos etapas con una extensión a 60°C durante 40 segundos con obtención de fluorescencia. Todas las muestras se analizaron y los valores umbral promedio del ciclo (C_u) se usaron para el análisis de cada muestra. El análisis de los datos de PCR en tiempo real se realizó con el programa informático LightCycler® versión 1.5 utilizando el módulo cuantitativo relativo y se basa en el método $\Delta\Delta\text{Ct}$. Las referencias incluyeron una muestra de ADN genómico de un calibrador de copia única y dos comprobaciones de copias conocidas que se incluyeron en cada serie. La tabla 19 enumera los resultados de los análisis con sonda de hidrólisis.

Tabla 18. Secuencias de cebadores y sondas utilizadas para el análisis con sonda de hidrólisis de *aad-1*, *dgt-28* y referencia interna (Invertasa).

Nombre del oligonucleótido	Gen detectado	SEQ ID nº:	Oligosecuencia
GAAD1F	Cebador directo <i>aad-1</i>	58	TGTTTCGGTTCCCTCTACCAA
GAAD1P	Sonda de <i>aad-1</i>	59	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA
GAAD1R	Cebador inverso <i>aad-1</i>	60	CAACATCCATCACCTTGACTGA
Sonda IV	Sonda de Invertasa	61	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC
IVF-Taq	Cebador directo Invertasa	62	TGGCGGACGACGACTTGT
IVR-Taq	Cebador inverso Invertasa	63	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
zmDGT28 F	Cebador directo <i>dgt-28</i>	64	TTCAGCACCCGTCAGAAT
zmDGT28 FAM	Sonda de <i>dgt-28</i>	65	TGCCGAGAATTGAGGAGGT
zmDGT28 R	Cebador inverso <i>dgt-28</i>	66	TGGTCGCCATAGCTTGT

Tabla 19. Resultados de la cantidad de copias de T_0 para casos de *dgt-28*. Los casos de pocas copias consistían en 1-2 copias transgénicas, los números de copias únicas se enumeran entre paréntesis. Los casos numerosas copias contenían 3 o más copias transgénicas.

Plasmido usado para transformation	nº de casos de pocas copias (una sola copia)	nº de casos de varias copias
pDAB107663	43 (31)	10
pDAB107664	30 (24)	5
pDAB107665	40 (27)	10
pDAB107666	24 (12)	12
pDAB109812	2 (1)	0
pDAB101556	25 (15)	10
pDAB107698	3 (1)	2

- 5 Tolerancia a herbicidas en maíz transformado con *dgt-28*. Los casos de transformación (T_0) de *Zea mays* con *dgt-28* se dejaron aclimatar en el invernadero y se cultivaron hasta que las plantas habían pasado desde cultivo de tejidos a condiciones de crecimiento en invernadero (es decir, 2-4 hojas nuevas de aspecto normal había salido en el verticilo). Las plantas se cultivaron a 27°C con 16 horas de luz: 8 horas de oscuridad en el invernadero. Las plantas se trataron luego con formulaciones comerciales de DURANGO DMA™ (que contiene el herbicida glifosato) con adición de 2% p/v de sulfato de amonio. Las aplicaciones de herbicidas se realizaron con un fumigador- oruga a un volumen de fumigación de 187 l/ha, altura de fumigación de 50 cm. Las plantas de T_0 se fumigaron con un intervalo de glifosato de 280 a 4.480 g ae/ha de glifosato, que es capaz de causar un daño significativo en estirpes de maíz no transformadas. Una dosis letal se define como la proporción que causa > 95% de daño a los endogámicos de B104.
- 10 Los resultados de las plantas de maíz con *dgt-28* de T_0 demostraron que la tolerancia al glifosato se conseguía a proporciones de hasta 4.480 g ae/ha. Se usó un tipo de medio específico en la generación T_0 . La atrofia mínima y el crecimiento vegetal en general de las plantas transformadas en comparación con las referencias no transformadas demostraron que *dgt-28* proporciona una fuerte tolerancia al glifosato cuando se une a los péptidos de tránsito de cloroplasto TraP5, TraP8 y TraP23.
- 15 Las plantas de T_0 seleccionadas se autopolinizan o retrocruzan para una caracterización adicional en la siguiente generación. 100 estirpes de *dgt-28* elegidas que contienen las plantas de T_1 se fumigan con 140-1.120 g ae/ha de glufosinato o 105-1.680 g ae/ha de glifosato. Tanto el marcador seleccionable como el gen resistente al glifosato se construyen en el mismo plásmido. Por lo tanto, si se selecciona un gen tolerante a herbicida fumigando con un herbicida, se cree que ambos genes están presentes. A los 14 DDT, se cuentan las plantas resistentes y sensibles para determinar el porcentaje de estirpes que se segregaron como un solo locus, rasgo mendeliano dominante (3R:1 S) determinado por la prueba de la Ji al cuadrado. Estos datos demuestran que *dgt-28* es heredable como un gen con resistencia al glifosato robusto en una especie de monocotiledónea. Se aplican proporciones crecientes de glifosato a los supervivientes de T_1 o F_1 para caracterizar más la tolerancia y protección que proporciona el gen *dgt-28*.
- 20 Tolerancia al herbicida después del brote en maíz de T_0 transformado con *dgt-28*. Se generaron casos de T_0 de *dgt-28* unidos con TraP4, TraP5, TraP8 y TraP23 por transformación de *Agrobacterium* y se dejaron aclimatar en condiciones controladas de cámara de crecimiento hasta que aparecieron en el verticilo 2-4 hojas nuevas de aspecto normal. Se les asignaron a las plantas números de identificación individuales y se tomaron muestras para los análisis del número de copias tanto de *dgt-28* como de *aad-1*. Basándose en los análisis del número de copias, las plantas se seleccionaron para los análisis de expresión de proteínas. Las plantas se trasplantaron en macetas más grandes con nuevos medios de cultivo y se cultivaron a 27°C bajo 16 horas de luz:8 horas de oscuridad en el invernadero. Las plantas restantes de las que no se tomaron muestras para la expresión de proteínas se trataron luego con formulaciones comerciales de DURANGO DMA™ (glifosato) con la adición de 2% p/v de sulfato de amonio. Los tratamientos se distribuyeron de modo que cada grupo de plantas contenía T_0 casos del número de copia variable. Las aplicaciones de herbicidas se realizaron con un fumigador-oruga a un volumen de fumigado de 187 L/ha, altura de fumigado de 50 cm. Las plantas de T_0 se fumigaron con un intervalo de glifosato de 280 a 4.480 g ae/ha de glifosato capaz de causar un daño significativo en estirpes de maíz no transformadas. Una dosis letal se define como la proporción que causa > 95% de daño a los endogámicos de B104. B104 fue el fondo genético de los transformantes.
- 30
- 35
- 40

Los resultados de las plantas de maíz con *dgt-28* de T₀ demuestran que la tolerancia al glifosato se alcanzó hasta 4.480 g ae/ha. Tabla 20. La atrofia mínima en el crecimiento y el crecimiento de la planta en general de las plantas transformadas en comparación con las referencias no transformadas demostraron que *dgt-28* proporciona una fuerte protección al glifosato cuando se unen a TraP5, TraP8 y TraP23.

- 5 Tabla 20. Respuesta de casos de *dgt-28* de T₀ de números de copias variables a proporciones de glifosato que varían de 280 a 4.480 g ae/ha + 2,0% p/v de sulfato de amonio 14 días después del tratamiento.

TraP4 <i>dgt-28</i>	% de daño			% de daño		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
280 g ae/ha de glifosato	5	0	0	1,0	2,2	0-5
560 g ae/ha de glifosato	6	0	0	2,0	4,0	0-10
1.120 g ae/ha de glifosato	12	0	0	1,3	3,1	0-10
2.240 g ae/ha de glifosato	7	0	0	1,7	4,5	0-12
4.480 g ae/ha de glifosato	7	0	0	1,1	3,0	0-8
TraP8 <i>dgt-28</i>	% de daño			% de daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	6	0	0	0,0	0,0	0
280 g ae/ha de glifosato	5	1	0	6,7	8,8	0-20
560 g ae/ha de glifosato	0	2	0	20,0	0,0	20
1.120 g ae/ha de glifosato	7	0	0	1,4	2,4	0-5
2.240 g ae/ha de glifosato	3	1	0	7,5	15,0	0-30
4.480 g ae/ha de glifosato	6	0	0	1,7	4,1	0-10
TraP23 <i>dgt-28</i>	% de daño			% de daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	6	0	0	0,8	2,0	0-5
280 g ae/ha de glifosato	7	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	1,3	2,5	0-5
1.120 g ae/ha de glifosato	10	2	0	3,3	7,8	0-20
2.240 g ae/ha de glifosato	6	0	0	1,3	3,3	0-8
4.480 g ae/ha de glifosato	6	1	0	4,3	7,9	0-20
TraP5 <i>dgt-28</i>	% de daño			% de daño		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
280 g ae/ha de glifosato	7	1	0	5,0	14,1	0-40
560 g ae/ha de glifosato	8	0	0	0,6	1,8	0-5
1.120 g ae/ha de glifosato	7	1	0	5,0	14,1	0-40
2.240 g ae/ha de glifosato	8	0	0	0,0	0,0	0

4.480 g ae/ha de glifosato	8	0	0	0,0	0,0	0
----------------------------	---	---	---	-----	-----	---

Los análisis de expresión de proteínas por ELISA normal demostraron un intervalo medio de la proteína DGT-28 de 12,6 a 22,5 ng/cm² en los montajes probados.

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

Tabla 21. Respuesta de casos de *dgt-28* de copia única de F₁ a proporciones de glifosato que varían de 560-4.480 g ae/ha + 2,0% p/v de sulfato de amonio 14 días después del tratamiento.

B104 / TraP4::<i>dgt-28</i>	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	9,0	1,2	8-10
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	2,5	2,9	0-5
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
B104 / TraP8::<i>dgt-28</i>	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	1,3	2,5	0-5
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	5,0	4,1	0-10
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	6,3	2,5	5-10
B104 / TraP23::<i>dgt-28</i>	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	3	1	0	10,0	10,0	5-25
1.120 g ae/ha de glifosato	2	2	0	18,8	11,8	10-35
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	12,5	2,9	10-15
4.480 g ae/ha de glifosato	3	1	0	10,0	7,1	5-20
B104 / TraP5::<i>dgt-28</i>	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)

B104 / TraP23::dgt-28	% de lesión			% de lesión		
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	8,0	0,0	8
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	11,3	3,0	8-15
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	12,5	2,9	10-15
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	10,0	2,5	10-15
B104 no transformado	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
1.120 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
2.240 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
4.480 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

Los datos de expresión de proteínas demuestran una proporción de proteína DGT-28 media de 42,2 a 88,2 ng/cm² a través de los casos de T₁ y montajes analizados, demostrando la expresión de proteínas en la generación de T₁.

5 Caracterización de maíz con dgt-28 en condiciones de campo. Se enviaron casos de Ti de una sola copia a un lugar de campo para crear semillas tanto hemicigóticas híbridas como homocigóticas endogámicas para su caracterización adicional. Se crearon semillas híbridas cruzando casos Ti en la estirpe B104 de transformación del maíz para las poblaciones híbridas generadoras de la estirpe endogámica 4XP811, segregándose 1:1 (hemicigóticas:cero) para el caso. Las semillas resultantes se enviaron a 2 lugares separados. Un total de cinco casos de una sola copia por montaje se plantaron en cada lugar en un diseño de bloques completos al azar por triplicado. Los campos se diseñaron para que las aplicaciones de glifosato se produjeran en la fase de crecimiento V4 y un grupo separado de plantas se aplicaran en la fase de crecimiento V8. El híbrido convencional 4XP811/B104 se utilizó como referencia negativa.

15 Las hileras experimentales se trataron con 184 g ae/ha de ASSURE II™ (106 g ai/l de quizalofop-metil) para eliminar los segregantes nulos. Todas las entradas experimentales segregadas 1: 1 (sensible:resistente) (p = 0,05) con respecto a la aplicación ASSURE II™. Se tomaron muestras de plantas resistentes seleccionadas de cada caso para la cuantificación de la proteína DGT-28 por ELISA normal.

20 Las plantas resistentes a Quizalofop-metil se trataron con el herbicida comercial DURANGO DMA™ (480 g ae/l de glifosato) con la adición de 2,5% p/v de sulfato de amonio en las fases de crecimiento V4 o V8. Las aplicaciones de herbicidas se realizaron con un fumigador de barra calibrado para suministrar un volumen de 187 l/ha, a una altura de fumigado de 50 cm. Las plantas se fumigaron con una proporción de glifosato de 1.120 a 4.480 g ae/ha de glifosato, capaz de causar un daño significativo en las estirpes de maíz no transformadas. Una dosis letal se define como la proporción que causa > 95% de daño a la 4XP811 endogámica. Se tomaron evaluaciones del daño observado para el porcentaje de clorosis observada, porcentaje de necrosis, porcentaje de inhibición del crecimiento y daño observado total a los 7, 14 y 21 DAT (días después del tratamiento). Las evaluaciones se compararon con las referencias no tratadas de cada estirpe y las referencias negativas.

30 Los datos del daño observado para todos los momentos de evaluación demostraron una fuerte tolerancia hasta 4.480 g ae/ha DURANGO DMA™ en ambas situaciones y momentos de aplicación. Los casos representativos para la aplicación V4 se presentan desde una situación y son coherentes con otros casos, tiempos de aplicación y situaciones. Tabla 22. Un caso procedente del montaje que contiene dgt-28 unido con TraP23 (pDAB107665) fue tolerante a la selección de ASSURE II™ para la proteína AAD-1, pero fue sensible a todas las proporciones de glifosato aplicadas.

Tabla 22. Respuesta de los casos de dgt-28 aplicados con un intervalo de glifosato de 1.120-4.480 g ae/ha + 2,5% p/v de sulfato de amonio en la fase de crecimiento V4.

4XPB11//B104/TraP4::dgt-28	% de lesión	% de lesión
-----------------------------------	-------------	-------------

ES 2 738 585 T3

Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40 %	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
4XPB11//B104/TraP8::dgt-28	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40 %	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
4XPB11//B104/TraP23::dgt-2 8	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40 %	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
4XPB11//B104/TraP5::dgt-28	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40 %	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0

4XPB11//B104 no transformada	% de lesión			% de lesión		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
Proporción de aplicación						
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
2.240 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
4.480 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

Se realizaron evaluaciones adicionales durante la etapa de crecimiento reproductivo para la proporción de glifosato de 4.480 g ae/ha. Las evaluaciones observadas de las panículas, el tiempo de polinización y el relleno de la espiga fueron similares a las referencias no tratadas de cada estirpe para todos los montajes, tiempos de aplicación y lugares. Los resultados de la cuantificación de la proteína DGT-28 demostraron un intervalo de expresión media de proteínas de 186,4 a 303,0 ng/cm². Los datos demuestran una fuerte tolerancia del maíz transformado con *dgt-28* en condiciones de campo a través de las fases de crecimiento reproductivo hasta 4.480 g ae/ha de glifosato. Los datos también demostraron la detección de la proteína DGT-28 y la función basada en los resultados de tolerancia a la fumigación.

Confirmación de la heredabilidad y tolerancia del maíz con *dgt-28* en estado homocigótico. Se plantaron semillas de T₁S₂ en condiciones de invernadero como se describió anteriormente. Las mismas cinco estirpes de copia única que se caracterizaron en condiciones de campo se caracterizaron en el estado homogéneo. Las plantas se cultivaron hasta la fase de crecimiento V3 y se separaron en tres proporciones de glifosato que van desde 1.120 a 4.480 g ae/ha de glifosato (DURANGO DMA™) y cuatro réplicas por tratamiento. Las aplicaciones se realizaron en un fumigador oruga como se describió anteriormente y se formularon en sulfato de amonio al 2,0% p/v. Una aplicación de sulfato de amonio sirvió como un control no tratado para cada estirpe. Se realizaron evaluaciones a simple vista 7 y 14 días después del tratamiento como se describió anteriormente. Los datos demostraron una fuerte tolerancia hasta 4.480 g ae/ha de glifosato para todos los casos probados.

Tabla 23. Respuesta de casos *dgt-28* homocigóticos aplicados con un intervalo de glifosato de 1.120-4.480 g ae/ha + 2,0% p/v de sulfato de amonio.

TraP4:: <i>dgt-28</i>	% de lesión			% de lesión		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
Proporción de aplicación						
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	3,8	2,5	0-5
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	14,3	1,5	12-15
TraP8:: <i>dgt-28</i>	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	9,0	1,2	8-10
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	11,3	2,5	10-15

TraP23::dgt-28	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	4,5	3,3	0-8
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	7,5	2,9	5-10
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	15,0	0,0	15
TraP5::dgt-28	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	1,3	2,5	0-5
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	9,0	2,0	8-12
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	15,0	2,4	12-18
B104 no transformada	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
2.240 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
4.480 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

5 La estirpe de pDAB107665 que no fue tolerante en condiciones de campo no demostró tolerancia al glifosato y, por lo tanto, es que consiste con las observaciones de campo (datos no mostrados). Con la excepción de la estirpe mencionada anteriormente, todas las réplicas que fueron tratadas con glifosato a partir de las estirpes no fueron sensibles al glifosato. Por lo tanto, los datos demuestran la heredabilidad en una población homogénea de maíz con *dgt-28* en modo mendeliano. La expresión de la proteína DGT-28 por ELISA normal demostró un intervalo de expresión de proteína media de 27,5 a 65,8 ng/cm² en todos los casos de copia única que eran tolerantes al glifosato. Los datos demuestran la proteína funcional y la estabilidad de la proteína DGT-28 en todas las generaciones.

15 Uso de tolerancia al herbicida después del brote del glifosato como marcador seleccionable. Como se describió anteriormente, las plantas de T₀ transformadas se retiraron del cultivo de tejidos y se aclimataron en el invernadero. Los casos probados contenían *dgt-28* unido a los péptidos de tránsito de cloroplasto TraP5, TraP8 y TraP23. Se demostró que estas plantas de T₀ proporcionaron una fuerte tolerancia hasta 4.480 g ae/ha de glifosato, y las plantas no transformadas se controlaron con glifosato a concentraciones tan bajas como 280 g ae/ha. Estos datos demuestran que *dgt-28* puede utilizarse como un marcador seleccionable utilizando una concentración de glifosato que varía de 280 a 4.480 g ae/ha.

20 Una serie de semillas de estirpes fijas de maíz que contienen el transgén *dgt-28* se añaden a una serie de semillas de maíz no transformadas. Las semillas se siembran y se dejan crecer hasta la fase de desarrollo V1-V3, momento en el cual las plántulas se fumigan con una dosis selectiva de glifosato en el intervalo de 280 a 4.480 g ae/ha. Después de 7-10 días, se cuentan las plantas sensibles y resistentes, y la cantidad de plantas tolerantes al glifosato se correlaciona con el número original de semillas transgénicas que contienen el transgén *dgt-28* que se plantaron.

25 Apilamiento de maíz con *dgt-28*. La proteína AAD-1 se utiliza como marcador seleccionable en el maíz transformado con *dgt-28* para fines de investigación. El gen *aad-1* también se puede utilizar como un rasgo tolerante a herbicidas en el maíz para proporcionar una fuerte tolerancia de 2,4-D hasta una aplicación de V8 en un cultivo. Cuatro casos de los montajes pDAB107663 (TraP4::*dgt-28*), pDAB107664 (TraP8::*dgt-28*) y pDAB107666 (TraP5::*dgt-28*) se caracterizaron por la tolerancia de una aplicación de glifosato en una mezcla en tanque y 2,4-D. El estudio de

caracterización se completó con semilla F₁ en condiciones de invernadero. Se hicieron aplicaciones en un fumigador-oruga como se describió anteriormente a las siguientes proporciones: 1.120-2.240 g ae/ha de glifosato (selectivo para el gen *dgt-28*), 1.120-2.240 g ae/ha 2,4-D (selectivo para el gen *aad-1*), o una mezcla en tanque de los dos herbicidas en las proporciones descritas. Las plantas se clasificaron a 7 y 14 días después del tratamiento.

5 Los resultados de la fumigación para aplicaciones de herbicidas a 2.240 g ae/ha se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Respuesta de F₁ *aad-1* y de maíz con *dgt-28* fumigado con 2.240 g ae/ha de 2,4-D, glifosato y una combinación de mezcla en tanque de los dos herbicidas 14 días después del tratamiento.

Caso F ₁	2.240 g ae/ha 2,4-D		2.240 g ae/ha de glifosato		2.240 g ae/ha 2,4-D + 2.240 g ae/ha de glifosato	
	% de daño medio	Desv. típica	% de daño medio	Desv. típica	% de daño medio	Desv. típica
107663[3]-012.AJ001	5,0	4,1	3,8	4,8	8,8	3,0
107663[3]-029.AJ001	2,5	5,0	1,3	2,5	5,0	5,8
107663[3]-027.AJ001	2,5	2,9	11,8	2,9	13,8	2,5
107663[3]-011.AJ001	3,8	2,5	11,5	1,0	12,8	1,5
B104	27,5	17,7	100,0	0,0	100,0	0,0

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

15 Transformación de la soja. La soja transgénica (*Glycine max*) que contiene un transgén *dgt-28* integrado de manera estable se generó a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* de explantes de nudos cotiledonares de soja. Para iniciar la transformación se utilizó una cepa de *Agrobacterium* desactivada que llevaba un vector binario que contenía un *dgt-28* funcional.

20 La transformación mediada por *Agrobacterium* se llevó a cabo utilizando un procedimiento de nudo semicotiledonar modificado de Zeng *et al.* (Zeng P., Vadnais D.A., Zhang Z., Polacco J.C., (2004), *Plant Cell Rep.*, 22 (7): 478-482). En resumen, las semillas de soja (cv. Maverick) se germinaron en medios basales y los nudos cotiledonares se aislaron e infectaron con *Agrobacterium*. La iniciación de brotes, el alargamiento de brotes y los medios de enraizamiento se complementan con cefotaxima, timentina y vancomicina para la eliminación de *Agrobacterium*. La selección mediante un herbicida se empleó para inhibir el crecimiento de brotes no transformados. Los brotes seleccionados se transfieren a un medio de enraizamiento para el desarrollo de la raíz y luego se transfieren a la mezcla de suelo para la aclimatación de las plántulas.

25 Los folíolos terminales de plántulas seleccionadas se trataron por vía tópica (técnica de pintura de hojas) con un herbicida para detectar posibles transformantes. Las plántulas seleccionadas se transfirieron al invernadero, se dejaron aclimatar y luego se pintaron las hojas con un herbicida para reconfirmar la tolerancia. Se tomaron muestras de estas posibles plantas de T₀ transformadas y se utilizaron análisis moleculares para confirmar la presencia del marcador herbicida seleccionable y el transgén *dgt-28*. Se dejaron que las plantas de T₀ se autofertilizaran en el invernadero para producir semilla de T₁.

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

35 La transformación mediada por *Agrobacterium* se llevó a cabo utilizando un procedimiento de media semilla modificado de Paz *et al.*, (Paz M., Martínez J., Kalvig A., Fonger T. y Wang K., (2005) *Plant Cell Rep.*, 25: 206-213). En resumen, las semillas de soja maduras se esterilizaron durante la noche con cloro gaseoso y se embebieron con H₂O estéril veinte horas antes de la transformación de la planta mediada por *Agrobacterium*. Las semillas se cortaron por la mitad mediante un corte longitudinal a lo largo del hilio para separar la semilla y quitar la capa de la semilla. Se escindió el eje embrionario y se eliminaron todos los brotes/yemas axiales del nudo cotiledonar. Los explantes de media semilla resultantes se infectaron con *Agrobacterium*. La iniciación de brotes, el alargamiento de brotes y los medios de enraizamiento se complementaron con cefotaxima, timentina y vancomicina para la eliminación de *Agrobacterium*. Se empleó selección herbicida para inhibir el crecimiento de brotes no transformados.

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

Se tomaron muestras de supuestas plantas de T₀ transformadas y se utilizaron análisis moleculares para confirmar la presencia del marcador seleccionable y el transgén *dgt-28*. Se identificaron varios casos que contenían los transgenes. Estas plantas de T₀ se avanzaron para un análisis adicional y se les dejó autofecundarse en el invernadero para dar lugar a semillas de T₁.

Confirmación de la heredabilidad de *dgt-28* a la generación T₁. La heredabilidad de la proteína DGT-28 en la generación T₁ se evaluó en una de dos maneras. El primer método incluyó la siembra de semillas de T₁ en medios de mezcla Metro y la aplicación de 411 g ae/ha de IGNITE™ 280 SL en plantas germinadas en la 1ª fase de crecimiento trifoliar. El segundo método consistió en homogeneizar semillas para un total de 8 réplicas utilizando un cojinete de bolas y un genogrinder. Las pruebas de tira ELISA para detectar la proteína PAT se utilizaron a continuación para detectar casos hereditarios ya que el marcador seleccionable estaba en el mismo plásmido que *dgt-28*. Para cualquiera de los métodos, si una sola planta era tolerante al glufosinato o si se detectó con la prueba de la tira PAT ELISA, el caso demostró la heredabilidad para la generación T₁.

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

Tolerancia a herbicidas después del brote en soja de T₁ transformada con *dgt-28*. Semillas de los casos de T₁ que se determinaron que fueron determinadas que eran hereditarias por los métodos de selección descritos anteriormente se plantaron en medios de mezcla Metro en condiciones de invernadero. Las plantas se cultivaron hasta que el primer trifolios se expandió completamente y se trató con 411 g ae/ha de IGNITE™ 280 SL para la selección del gen *pat* como se describió anteriormente. A las plantas resistentes de cada caso se les dieron identificadores únicos y se tomaron muestras para los análisis de cigosidad del gen *dgt-28*. Los datos de cigosidad se utilizaron para asignar 2 réplicas hemicigóticas y 2 homocigóticas a cada proporción de glifosato aplicada, lo que permitió un total de 4 réplicas por tratamiento cuando existían suficientes plantas. Estas plantas se compararon con el tabaco Petite havana natural. Todas las plantas se fumigaron con un fumigador-oruga a 187 l/ha. Las plantas se fumigaron en un intervalo de 560-4.480 g ae/ha de sal de dimetilamina (DMA) DURANGO™. Todas las aplicaciones se formularon en agua con la adición de 2% p/v de sulfato de amonio (AMS). Las plantas se evaluaron a los 7 y 14 días después del tratamiento. A las plantas se les asignó una calificación del daño con respecto a la atrofia general observada, la clorosis y la necrosis. La generación de T₁ está segregando, por lo que cabe esperar una respuesta variable debido a la diferencia en la cigosidad.

Tabla 25. Los resultados de la fumigación demuestran una tolerancia sólida de 14 DAT (días después del tratamiento) de hasta 4.480 g ae/ha de glifosato de al menos un caso *dgt-28* por montaje caracterizado. Todos los casos representativos de una sola copia de los montajes proporcionaron una tolerancia de hasta 4.480 g ae ha en comparación con la referencia negativa de Maverick.

pDAB107543 (TraP4::dgt-28)	% de lesión			% de lesión		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	0	4	0	33,8	7,5	25-40
1.120 g ae/ha de glifosato	2	2	0	25,0	11,5	15-35
2.240 g ae/ha de glifosato	2	2	0	17,5	2,9	15-20
4.480 g ae/ha de glifosato	0	2	2	33,8	13,1	20-45
pDAB107545 (TraP8::dgt-28)	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	1,5	1,0	0-2
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	2,8	1,5	2-5
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	5,0	2,4	2-8
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	9,5	1,9	8-12

pDAB107548 (TraP4::dgt-28)		% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)	
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	1,8	2,4	0-5	
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	2,8	1,5	2-5	
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	3,5	1,7	2-5	
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	8,8	3,0	5-12	
pDAB107553 (TraP23::dgt-28)		% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)	
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	5,0	0,0	5	
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	9,0	1,2	8-10	
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	10,5	1,0	10-12	
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	16,5	1,7	15-18	
Maverick (referencia neg.)		% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)	
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0	
560 g ae/ha de glifosato	0	0	4	82,5	12,6	70-100	
1.120 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100	
2.240 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100	
4.480 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100	

- Protección de *dzt-28* contra proporciones elevadas de glifosato en la generación T₂. Se realizó una prueba de descendencia de 45 plantas en dos a cinco estirpes de T₂ de *dgt-28* por montaje. Las estirpes homocigóticas se eligieron en función de los análisis de cigosidad completados en la generación anterior. Las semillas se plantaron como se describió anteriormente. Las plantas se fumigaron a continuación con 411 g ae/ha de IGNITE 280 SL para la selección del marcador seleccionable *pat* como se describió anteriormente. Después de 3 DDT, se contaron las plantas resistentes y sensibles.
- 10 Para los montajes que contienen TraP4 unida a *dgt-28* (pDAB107543 y pDAB107548), nueve de las doce estirpes analizadas no se segregaron, lo que confirma estirpes homogéneas en la generación T₂. Las estirpes que contenían TraP8 unidas a *dgt-28* (pDAB107545) demostraron dos de las cuatro estirpes sin segregantes y demostrando la herencia mendeliana mediante al menos dos generaciones de *dgt-28* en la soja. Se tomaron muestras de tejido de plantas resistentes y se cuantificó la proteína DGT-28 por métodos ELISA normal. Los datos demostraron un intervalo de proteína DGT-28 promedio de 32,8 – 107,5 ng/cm² para las estirpes de T₂ probadas no segregantes.
- 15 Las estirpes del montaje pDAB107553 (TraP23::*dgt-28*) no se seleccionaron previamente con glufosinato, y la respuesta a la dosis de glifosato se utilizó tanto para probar la homogeneidad como para la tolerancia a proporciones elevadas de glifosato. Las réplicas de las estirpes del montaje pDAB107553 fueron tolerantes a proporciones que oscilaron entre 560 y 4.480 g ae/ha de glifosato y, por lo tanto, se confirmó que era una población homogénea y hereditaria hasta al menos dos generaciones.
- 20 Las proporciones de DURANGO DMA que oscilan desde 560 a 4.480 g ae/ha de glifosato se aplicaron a 2-3 plantas de soja trifoliada como se describió anteriormente. Datos del daño observado 14 DDT confirmaron los resultados de tolerancia que se demostraron en la generación T₁.

Tabla 26. Los datos demuestran una fuerte tolerancia del tabaco con *dgt-28* hasta 3.360 g ae/ha de glifosato a través de dos generaciones, en comparación con la referencia no transformada.

ES 2 738 585 T3

pDAB107543 (TraP4::dgt-28)	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	8,0	0,0	8
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	14,3	1,5	12-15
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	18,0	0,0	18
4.480 g ae/ha de glifosato	0	4	0	24,5	3,3	20-28
pDAB107545 (TraP8::dgt-28)	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	2,8	1,5	2-5
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	5,0	0,0	5
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	10,0	0,0	10
pDAB107548 (TraP4::dgt-28)	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	10,0	0,0	10
pDAB107553 (TraP23::dgt-28)	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	-	0,0	0,0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	-	10,0	0,0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	-	10,0	-4,4
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	-	13,0	-2,4
4.480 g ae/ha de glifosato	3	1	0	-	15,5	4,1

Maverick (referencia neg.)	% de lesión			% de lesión		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	0	0	4	77,5	15,0	70-100
1.120 g ae/ha de glifosato	0	0	4	97,5	2,9	95-100
2.240 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
4.480 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

5 Transformación de arroz con *dgt-28*. El arroz transgénico (*Oryza sativa*) que contiene un transgén *dgt-28* integrado de manera estable se genera por transformación mediada por *Agrobacterium* de semillas de arroz esterilizadas. Se utiliza una cepa de *Agrobacterium* desactivada que lleva un vector binario que contiene un *dgt-28* funcional para iniciar la transformación.

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

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

30 Semillas desecadas maduras de *Oryza sativa* L. japonica cv. Taipei 309 se esterilizan como se describe en Zhang *et al.* 1996. Se inducen tejidos embrionarios cultivando semillas de arroz maduras estériles en medio NB en la oscuridad. El callo principal de aproximadamente 1 mm de diámetro se retira del escutelo y se utiliza para iniciar la suspensión celular en medio líquido SZ. Las suspensiones se mantienen a continuación como se describe en Zhang
 35 1996. Los tejidos embrionarios procedentes de la suspensión se retiran del cultivo líquido 3-5 días después del subcultivo anterior y se colocan en medio osmótico NBO para formar un círculo de aproximadamente 2,5 cm de ancho en una placa de Petri y se cultivan durante 4 h antes del bombardeo. Dieciséis a veinte horas después del bombardeo, los tejidos se transfieren del medio NBO al medio de selección NBH50, asegurando que la superficie bombardeada mira hacia arriba y se incuba en la oscuridad durante 14-17 días. Los callos recién formados se separan entonces de los explantes originales bombardeados y se colocan cerca en el mismo medio. Después de 8 a
 40 12 días más, el callo opaco relativamente compacto se identifica a simple vista y se transfiere al medio de regeneración previa PRH50 durante 7 días en la oscuridad. El callo en crecimiento, que se vuelve más compacto y opaco, se subcultiva luego en medio de regeneración RNH50 durante un período de 14-21 días bajo un fotoperíodo de 16 h. Los brotes de regeneración se transfieren a cajas MAGENTA que contienen ½ medio MSH50. Múltiples plantas regeneradas a partir de un solo explante se consideran hermanas y se tratan como una estirpe vegetal independiente. Una planta se califica como positiva para el gen *dgt-28* si produce raíces gruesas y blancas y crece vigorosamente en ½ medio MSH50. Una vez que las plántulas alcanzan la parte superior de las cajas MAGENTA, se transplantan en el suelo en una maceta de 6 cm con una humedad del 100% durante una semana, y luego se llevan a una cámara de crecimiento con un período de luz de 14 h a 30°C y en la oscuridad a 21°C durante 2-3 semanas
 45 antes del trasplante en macetas de 13 cm en el invernadero. Las semillas se recogen y se secan a 37°C durante una semana antes del almacenamiento a 4°C.

Análisis de T₀ de arroz con *dgt-28*. Los transformantes de arroz transplantados obtenidos por un método de

transformación de *Agrobacterium* se transplantaron en medios y se aclimataron a las condiciones del invernadero. Se tomaron muestras de todas las plantas para la detección de *dgt-28* por PCR de y los resultados demuestran veintidós casos positivos por PCR para pDAB110827 (TraP8::*dgt-28*) y un mínimo de dieciséis casos positivos por PCR para pDAB110828 (TraP23::*dgt-28*). El análisis Southern para *dgt-28* de los casos positivos por PCR demostró 5 casos simples (1-2 copias) para ambos montajes. La expresión de la proteína de los casos de T₀ seleccionados demostró que la expresión de la proteína DGT-28 oscila desde los niveles de detección inferiores hasta 130 ng/cm². Los casos de T₀ seleccionados del montaje pDAB110828 se trataron con 2.240 g ae/ha de DURANGO DMA™ como se describió anteriormente y se evaluaron 7 y 14 días después del tratamiento. Los datos demostraron una fuerte 10 T₁ para una caracterización posterior.

Heredabilidad de *dgt-28* en arroz. Se realizó una prueba de descendencia en 100 plantas en cuatro estirpes de T₁ de *dgt-28* del montaje pDAB110827 que contiene el péptido de tránsito de cloroplasto TraP8. Las semillas se plantaron en macetas rellenas con medio. Luego, todas las plantas se fumigaron con 560 g ae/ha de DURANGO DMA™ para la selección del gen *dgt-28* como se describió anteriormente. Después de 7 DAT, se contaron las plantas resistentes 15 y sensibles. Dos de cada cuatro estirpes analizadas para cada montaje se segregaron como un solo locus, rasgo mendeliano dominante (3R:1S) determinado por la prueba de la Ji al cuadrado. *Dgt-28* es un gen hereditario de resistencia a glifosato en múltiples especies.

Tolerancia a herbicidas después del brote en arroz de T₁ transformado con *dgt-28*. A las plantas resistentes de T₁ de cada caso utilizado en las pruebas de descendencia se les dieron identificadores únicos y se tomaron muestras para 20 análisis de cigosidad del gen *dgt-28*. Los datos de cigosidad se utilizaron para asignar 2 réplicas hemicigóticas y 2 homocigóticas a cada proporción de glifosato aplicada, lo que permitió un total de 4 réplicas por tratamiento. Estas plantas se compararon con el arroz kitaake natural. Todas las plantas se fumigaron con un fumigador-oruga ajustado a 187 l/ha. Las plantas se fumigaron en un intervalo de 560-2.240 g /ha de DURANGO DMA™. Todas las 25 aplicaciones se formularon en agua con la adición de 2% p/v de sulfato de amonio (AMS). Las plantas se evaluaron a los 7 y 14 días después del tratamiento. A las plantas se les asignó una calificación del daño con respecto a la atrofia, la clorosis y la necrosis general observadas. La generación T₁ se está segregando, por eso alguna respuesta variable cabe esperar debido a la diferencia en la cigosidad.

Los resultados de la fumigación demuestran que a los 7 DDT (días después del tratamiento) se detectaron daños vegetativos mínimos a proporciones elevadas de glifosato (datos no mostrados).

30 Tabla 27. Los datos de daños observados a los 14 DDT demuestran menos del 15% de daños observados medios hasta 2.240 g ae/ha de glifosato.

TraP8::<i>dgt-28</i> Caso 1	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
TraP8::<i>dgt-28</i> Caso 2	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	3,8	4,8	0-10
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	12,0	3,6	8-15
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	15,0	6,0	8-20
Referencia no transformada	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	0	0	4	81,3	2,5	80-85

Referencia no transformada	% de lesión			% de lesión		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
1.120 g ae/ha de glifosato	0	0	4	95,0	5,8	90-100
2.240 g ae/ha de glifosato	0	0	4	96,3	4,8	90-100

La detección de proteínas de DGT-28 se evaluó para las réplicas de las cuatro estirpes de T₁ analizadas a partir de pDAB110827. Los datos demostraron que la proteína media de DGT-28 oscila entre 20 y 82 ng/cm² y entre 21 y 209 ng/cm² para las réplicas hemicigóticas y homocigóticas respectivamente. Estos resultados demostraron expresión de la proteína estable a la generación T₁ y la tolerancia del arroz con *dgt-28* hasta 2.240 g ae ha de glifosato después de una aplicación de 560 g ea/ha de glifosato usado para la selección.

Transformación del tabaco con *dgt-28*. Los trozos de hojas de tabaco (cv. Petit Havana) se transformaron utilizando *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el transgén *dgt-28*. Cada una de las colonias que contenían el plásmido que contiene el transgén *dgt-28* se inocularon en 4 ml de medio YEP que contenía espectinomicina (50 µg/ml) y estreptomycin (125 µg/ml) y se incubaron durante la noche a 28°C en un agitador a 190 rpm. El cultivo de semillas de 4 ml se usó posteriormente para inocular un cultivo de 25 ml del mismo medio en un matraz Erlenmeyer con tabiques de 125 ml. Este cultivo se incubó a 28°C con agitación a 190 rpm hasta alcanzar un DO₆₀₀ de ~1,2. A continuación se colocaron 10 ml de suspensión de *Agrobacterium* en placas de Petri™ estériles de 60 x 20 mm.

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

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

Las plantas se trasladaron al invernadero lavando el agar-agar-agar-agar de las raíces, transplantando en el suelo en macetas de 13,75 cm cuadrados, colocando la maceta en una bolsa Ziploc® (SC Johnson & Son, Inc.), poniendo agua del grifo en el fondo de la bolsa, y poniendo luz indirecta en un invernadero a 30°C durante una semana. Después de 3-7 días, la bolsa se abrió; las plantas se fertilizaron y se dejaron crecer en la bolsa abierta hasta que las plantas se aclimataron en el invernadero, momento en el que se retiró la bolsa. Las plantas se cultivaron en condiciones normales de invernadero cálido (27°C día, 24°C noche, 16 horas día, luz natural + complementaria mínima = 1.200 µE/m²s⁻¹).

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

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

Se tomaron muestras de todas las plantas positivas a PCR para la cuantificación de la proteína DGT-28 por ELISA normal. La proteína DGT-28 se detectó en todas las plantas positivas a PCR y se observó una tendencia a un aumento en la concentración de proteína al aumentar el número de copias de *dgt-28*.

Heredabilidad de *aad-12* (*v1*) en tabaco. Se realizó una prueba de descendencia de 100 plantas en cinco estirpes de

T₁ de *dgt-28* por montaje. Los montajes contenían una de las siguientes secuencias de péptidos de tránsito de cloroplasto: TraP4, TraP8 o TraP23. Las semillas se estratificaron, se sembraron y se trasplantaron con respecto al procedimiento de *Arabidopsis* ejemplificado anteriormente, con la excepción de que las plantas nulas no se eliminaron en la selección inicial antes del trasplante. Todas las plantas se fumigaron luego con 280 g ae/ha de IGNITE 280 SL para la selección del marcador seleccionable *pat* como se describió anteriormente. Después de 3 DDT, se contaron las plantas resistentes y sensibles.

Cuatro de cada cinco estirpes analizadas para cada montaje se segregaron como un solo locus, rasgo mendeliano dominante (3R:1S) determinado por la prueba de la Ji al cuadrado. *Dgt-28* es un gen hereditario de resistencia al glifosato en múltiples especies.

- 10 Tolerancia al herbicida después del brote en tabaco de T₁ transformado con *dgt-28*. A las plantas de T₁ resistentes de cada caso utilizadas en la prueba de descendencia se les dieron identificadores únicos y se tomaron muestras para análisis de cigosidad del gen *dgt-28*. Los datos de cigosidad se utilizaron para asignar 2 réplicas hemicigóticas y 2 homocigóticas a cada proporción de glifosato aplicada, lo que permitió un total de 4 réplicas por tratamiento. Estas plantas se compararon con el tabaco Petite havana natural. Todas las plantas se fumigaron con un fumigador-oruga ajustado a 187 l/ha. Las plantas se fumigaron en un intervalo de 560-4.480 g ae/ha de DURANGO DMA™.
- 15 Todas las aplicaciones se formularon en agua con la adición de 2% p/v de sulfato de amonio (AMS). Las plantas se evaluaron 7 y 14 días después del tratamiento. A las plantas se les asignó una calificación del daño con respecto a la atrofia, la clorosis y la necrosis totales observadas. La generación T₁ está segregando, por lo que cabe esperar una respuesta variable debido a la diferencia en la cigosidad.
- 20 Los resultados de la fumigación demuestran que a los 7 DDT (días después del tratamiento) se detectó un daño vegetativo mínimo a proporciones elevadas de glifosato (datos no mostrados). Después de 14 DDT, los datos del daño observado demuestran un aumento del daño con los casos de copia única del montaje que contiene TraP4 en comparación con los casos de copia única de los montajes TraP8 y TraP23. Tabla 28.

Tabla 28. A una proporción de 2.240 g ae/ha de glifosato, se demostró un daño promedio del 37,5% con el caso que contenía TraP4, donde los casos que contenían TraP8 y TraP23 demostraron un daño promedio de 9,3% y 9,5% respectivamente.

TraP4::<i>dgt-28</i> (pDAB107543)	% de lesión			% de lesión		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	2	2	0	18,0	8,1	10-25
1.120 g ae/ha de glifosato	1	3	0	24,5	4,9	18-30
2.240 g ae/ha de glifosato	0	3	1	37,5	6,5	30-45
4.480 g ae/ha de glifosato	0	2	2	42,5	2,9	40-45
TraP8::<i>dgt-28</i> (pDAB107545)	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	3,3	3,9	0-8
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	6,5	1,7	5-8
2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	9,3	3,0	5-12
4.480 g ae/ha de glifosato	2	2	0	17,5	6,5	10-25
TraP23::<i>dgt-28</i> (pDAB107553)	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	4	0	0	10,0	1,6	8-12
1.120 g ae/ha de glifosato	4	0	0	8,8	3,0	5-12

ES 2 738 585 T3

2.240 g ae/ha de glifosato	4	0	0	9,5	4,2	5-15
4.480 g ae/ha de glifosato	4	0	0	15,8	1,5	15-18
Petite havana	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha de glifosato	0	0	4	85,0	4,1	80-90
1.120 g ae/ha de glifosato	0	0	4	91,3	2,5	90-95
2.240 g ae/ha de glifosato	0	0	4	94,5	3,3	90-98
4.480 g ae/ha de glifosato	0	0	4	98,3	2,4	95-100

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

- 5 Protección de *dgt-28* contra proporciones elevadas de glifosato en la generación T₂. Se realizó una prueba de descendencia de 25 plantas en dos o tres estirpes de T₂ de *dgt-28* por montaje. Las estirpes homocigóticas se eligieron en función de los análisis de cigosidad completados en la generación anterior. Las semillas se estratificaron, se sembraron y trasplantaron como se describió anteriormente. Todas las plantas se fumigaron a continuación con 280 g ae/ha de Ignite 280 SL para la selección del marcador seleccionable *pat* según se describió anteriormente. Después de 3 DDT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Todas las estirpes analizadas
- 10 para cada montaje no se segregaron, confirmando de este modo las estirpes homogéneas en la generación T₂ y demostrando la herencia mendeliana a través de al menos dos generaciones de *dgt-28* en el tabaco.

- 15 Se aplicaron proporciones de DURANGO DMA™ que oscilaban entre 420 y 3.360 g ae/ha de glifosato a 2-3 hojas de tabaco como se describió anteriormente. Datos de daños observados 14 DDT confirmaron los resultados de tolerancia que se demostraron en la generación T₁. Los resultados foliares de estirpes de dos copias del montaje que contiene TraP4 demostraron una tolerancia similar a la de las estirpes TraP8 y TraP23 de una sola copia (datos no mostrados).

Tabla 29. Las estirpes de una sola copia del montaje que contiene TraP4 con *dgt-28* demostraron un daño mayor en comparación con las estirpes de los montajes que contienen TraP8 y TraP23 con *dgt-28*.

TraP4::<i>dgt-28</i> (pDAB107543)	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	0	4	0	23,8	4,8	20-30
840 g ae/ha de glifosato	0	4	0	30,0	4,1	25-35
1.680 g ae/ha de glifosato	0	4	0	35,0	5,8	30-40
3.360 g ae/ha de glifosato	0	4	0	31,3	2,5	30-35
TraP8::<i>dgt-28</i> (pDAB107545)	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	2,5	2,9	0-5
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	9,3	3,4	5-12
3.360 g ae/ha de glifosato	4	0	0	10,5	1,0	10-12

TraP23::dgt-28 (pDAB107553)	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	6,3	2,5	5-10
1.680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	10,0	0,0	10
3.360 g ae/ha de glifosato	3	1	0	13,8	4,8	10-20
Petite havana	% de lesión			% de lesión		
Proporción de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	0	0	4	95,0	0,0	95
840 g ae/ha de glifosato	0	0	4	98,8	1,0	98-100
1.680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	99,5	1,0	98-100
3.360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100	0,0	100

Los datos demuestran una fuerte tolerancia de tabaco con *dgt-28* hasta 3.360 g ae/ha de glifosato a través de dos generaciones en comparación con la referencia no transformada.

Se tomaron muestras de plantas seleccionadas de cada caso antes de las aplicaciones de glifosato para análisis de la proteína DGT-28 por ELISA normal de DGT-28. Los datos demostraron la expresión de la proteína media DGT-28 de las estirpes simples (1-2 copias) en todos los montajes que van de 72,8 a 114,5 ng/cm. Los datos demuestran que *dgt-28* está expresando proteínas en la generación T₂ de tabaco transformado y los datos de tolerancia confirman la proteína funcional DGT-28.

Apilamiento de *dgt-28* para aumentar el espectro de herbicidas en el tabaco (cv. Petit Havana). Las plantas homocigóticas con *dgt-28* (pDAB107543 y pDAB107545) y con *aad-12 v1* (pDAB3278) (véase PCT US2006/042133 para este último) se cruzaron recíprocamente y se recolectó la semilla de F₁. La semilla de F₁ de dos cruces recíprocos de cada gen se estratificó y se trataron 6 reps de cada cruce con 1.120 g ae/ha de glifosato (selectivo para el gen *dgt-28*), 1.120 g ae/ha de 2,4-D (selectivo para el gen *aad-12*), o una mezcla del tanque de los dos herbicidas a las proporciones descritas. Las plantas se clasificaron a los 14 DDT. Los resultados de la fumigación se muestran en la tabla 30.

Tabla 30. Respuesta de *aad-12* y *dgt-28* de F₁

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

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

Resistencia al glifosato en el trigo. Producción de vectores binarios que codifican DGT-28. Los vectores binarios que

contienen la expresión de DGT-28 y los casetes de selección de PAT se diseñaron y ensamblaron utilizando experiencias y técnicas normalmente conocidas en la técnica. Cada casete de expresión DGT-28 contenía el activador, la región 5' no traducida y el intrón del gen Ubiquitina (*Ubi*) de *Zea mays* (Toki *et al.*, *Plant Physiology* 1992, 100 1503-07), seguido de una secuencia de codificación que consiste en uno de los cuatro péptidos de tránsito (TraP4, TraP8, TraP23 o TraP5) fusionados al terminal 5' de una versión sintética del gen de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (DGT-28), que se había optimizado en el codón para la expresión en plantas. El casete de expresión DGT-28 terminado en una región 3' no traducida (UTR) que comprende el terminador de la transcripción y el sitio de poliadenilación de un gen de lipasa (*Vp1*) de *Z. mays* (Paek *et al.*, *Mol. Cells* 1998 30; 8(3) 336-42). El casete de selección PAT compuesto por el activador, la región 5' no traducida y el intrón del gen Actina (*Act1*) de *Oryza sativa* (McElroy *et al.*, *The Plant Cell* 1990 2(2) 163-171), seguido de una versión sintética de el gen de la fosfinotricina acetil transferasa (PAT) aislado de *Streptomyces viridochromogenes*, que había sido optimizado en el codón para la expresión en plantas. El gen PAT codifica una proteína que confiere resistencia a los inhibidores de la glutamina sintetasa que comprende la fosfinotricina, glufosinato y bialafós (Wohlleben *et al.*, *Gene* 1988, 70(1), 25-37). El casete de selección se terminó con el 3' UTR que comprende el terminador de la transcripción y el sitio de poliadenilación del gen 35s del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Chenault *et al.*, *Plant Physiology* 1993 101 (4), 1395-1396).

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

Cada uno de los cuatro clones de expresión binaria resultantes: pDAS000122 (TraP4-DGT28), pDAS000123 (TraP8-DGT28), pDAS000124 (TraP23-DGT28) y pDAS000125 (TraP5-DGT28) se transformaron en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

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

Resistencia al glifosato en casos de trigo con *dgt-28* de T₀. Se dejaron se aclimatar en el invernadero los casos de T₀ y se cultivaron hasta que brotaron del verticilo 2-4 hojas nuevas de aspecto normal (es decir, las plantas pasaron del cultivo de tejidos a condiciones de cultivo en invernadero). Las plantas se cultivaron a 25°C con 12 horas de iluminación complementaria en el invernadero hasta la madurez. Se completó una selección inicial de tolerancia al glifosato y análisis Taqman en plantas de T₁ cultivadas en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Los datos permitieron que la determinación de casos hereditarios de T₁ se caracterizara aún más. Se replantaron seis casos con pocas copias (1-2 copias) y dos con copias múltiples de T₁ en condiciones de invernadero y se cultivaron hasta la fase de 3 hojas. Las plantas de T₁ se fumigaron con una formulación comercial de glifosato (Durango DMA™) de un intervalo de 420 a 3.360 g ae/ha, que pueden causar daños significativos en las estirpes de trigo no transformadas. La adición de 2% p/v de sulfato de amonio se incluyó en la aplicación. Una dosis letal se define como la proporción que causa > 75% de daño a la referencia no transformada Bob White MPB26RH. Se aplicó herbicida.

En este ejemplo, las aplicaciones de glifosato se utilizaron tanto para determinar la segregación del gen *dgt-28* en la generación T₁ como para demostrar tolerancia a niveles crecientes de glifosato. La respuesta de las plantas se presenta en relación con una escala de daño observado 21 días después del tratamiento (DDT). Los datos se presentan en forma de histograma de individuos que presentan menos de 25% de daño observado (4), 25% -50% de daño observado (3), 50% -75% de daño observado (2) y más de 75% de daño (1). Se presenta una media aritmética y una desviación típica para cada montaje utilizado para la transformación del trigo. El intervalo de puntuación de cada respuesta también está indicado en la última columna para cada proporción y transformación. El trigo no transformado, natural (c.v. Bob White MPB26RH) sirvió como referencia sensible al glifosato. Las plantas hemicigóticas y homocigóticas de la generación T₁ estaban disponibles para pruebas para cada caso y, por lo tanto, se incluyeron para cada proporción de glifosato analizado. Las plantas hemicigóticas contendrán la mitad de la dosis del gen como plantas homocigóticas, por lo que cabe esperar una variabilidad de la respuesta al glifosato en la generación T₁.

ES 2 738 585 T3

Los resultados de las plantas de trigo de T₁ con *dgt-28* demostraron que la tolerancia al glifosato se consiguió a velocidades de hasta 3.360 g ae/ha con los péptidos de tránsito de cloroplastos TraP4, TraP5, TraP8 y TraP23. Tabla 31. Los datos son de un caso de T₁ de pocas copias, pero son representativos de la población para cada montaje.

5 Tabla 31. Respuesta de casos de trigo de T₁ con *dgt-28* de pocas copias al glifosato 21 días después del tratamiento.

TraP4::<i>dgt-28</i>	% de lesión				% de lesión		
Proporción de aplicación	<25%	25-50%	50-75%	>75%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
420 g ae/ha	5	0	0	0	4,00	0,00	4
840 g ae/ha	6	2	0	0	3,75	0,46	3-4
1.680 g ae/ha	4	2	0	0	3,67	0,52	3-4
3.360 g ae/ha	4	2	0	0	3,67	0,52	3-4
TraP8::<i>dgt-28</i>	% de lesión				% de lesión		
Proporción de aplicación	<25%	25-50%	50-75%	>75%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
420 g ae/ha	5	3	0	0	3,63	0,52	3-4
840 g ae/ha	3	5	0	0	3,38	0,52	3-4
1.680 g ae/ha	4	3	0	0	3,57	0,53	3-4
3.360 g ae/ha	5	5	0	0	3,50	0,53	3-4
TraP23::<i>dgt-28</i>	% de lesión				% de lesión		
Proporción de aplicación	<25%	25-50%	50-75%	>75%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
420 g ae/ha	9	2	0	0	3,82	0,40	3-4
840 g ae/ha	8	1	0	0	3,89	0,33	3-4
1.680 g ae/ha	7	5	0	0	3,58	0,0	3-4
3.360 g ae/ha	8	2	0	0	3,80	4,8	3-4
TraP5::<i>dgt-28</i>	% de lesión				% de lesión		
Proporción de aplicación	<25%	25-50%	50-75%	>75%	Prom.	Desv. Típ.	Intervalo (%)
420 g ae/ha	5	2	0	0	3,71	0,49	3-4
840 g ae/ha	4	2	0	0	3,67	0,52	3-4
1.680 g ae/ha	7	3	0	0	3,70	0,48	3-4
3.360 g ae/ha	6	0	0	0	4,00	0,00	3-4

Bobwhite MPB26RH	% de lesión				% de lesión		
	<25%	25-50%	50-75%	>75%	Prom.	Desv. Tip.	Intervalo (%)
Proporción de aplicación							
420 g ae/ha	0	1	1	10	1,25	0,62	1-3
840 g ae/ha	0	0	0	10	1,00	0,00	1
1.680 g ae/ha	0	0	0	12	1,17	0,58	1-3
3.360 g ae/ha	0	0	0	10	1,00	0,00	1

A 21 DDT, se cuentan las plantas resistentes y sensibles para determinar el porcentaje de estirpes que se segregaron como un solo locus, rasgo mendeliano dominante (3R:1 S) según lo determinado por la prueba de de la ji al cuadrado. Tabla 32. Estos datos demuestran que *dgt-28* es heredable como un gen fuerte de resistencia al glifosato en una especie de monocotiledónea.

Tabla 32. Porcentaje de casos de T₁ con *dgt-28* por montaje que demostraron la herencia de una manera mendeliana basada en una selección de glifosato a proporciones que oscilan entre 420 y 3.360 g ae/ha.

ID montaje	CTP:GOI	% de casos de T ₁ probados que segregaron a un solo locus	% de casos de T ₁ probados que segregaron a 2 locus	n° de casos de T ₁ probados
pDAS000122	TraP4:: <i>dgt-28</i>	62,5%	37,5%	8
pDAS000123	TraP8:: <i>dgt-28</i>	87,5%	12,5%	8
pDAS000124	TraP23:: <i>dgt-28</i>	12,5%	87,5%	8
pDAS000125	TraP5:: <i>dgt-28</i>	62,5%	0,0%	8

10 Ejemplo 4: Secuencias del péptido de tránsito de cloroplasto (TraP) híbrido para la expresión de transgenes de importancia agronómica en el maíz

Cry2Aa:

La proteína Cry2Aa de *Bacillus thuringiensis* ha demostrado actividad contra *Helicoverpa zea* (CEW) y *Ostrinia nubilalis* (BEM). Una versión única del gen *cry2Aa* (SEQ ID n°: 10), codón sesgado para maíz, se probó en maíz. En este experimento, Cry2Aa se evaluó sola y junto con el péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP8 en maíz para determinar la actividad de tolerancia a insectos y para evaluar el efecto que tendría la secuencia de péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP8 v2 sobre la expresión de la proteína Cry2Aa en maíz.

El montaje pDAB109807 que contiene la secuencia del péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP8 v2 (SEQ ID n°: 8) y un enlazador de codón GCA se clonaron aguas arriba del gen *cry2Aa* y se incorporaron en el montaje pDAB109807 (FIG. 11) para pruebas de tolerancia a insectos en plantas de maíz. Los montajes resultantes contenían dos unidades de transcripción en plantas (UTP). La primera UTP comprendió el activador Ubiquitina 1 de *Zea mays* (activador ZmUbil; Christensen, A., Sharrock R., y Quail P., (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation, *Plant Molecular Biology*, 18: 675-689), gen de fusión TraP8-cry2Aa (TraP8 Cry2Aa) y región 3' no traducida de Lipasa de *Zea mays* (ZmLip 3'UTR; patente de EE. UU. n° 7.179.902). Los montajes se confirmaron por digestión con enzimas de restricción y secuenciación. La segunda UTP comprendía el activador del virus baciliforme de la caña de azúcar (activador del SCBV; patente de EE. UU. n° 6.489.462), un gen *aad-1* con tolerancia a herbicida que contiene un MSV principal e intrón 6 de alcohol-deshidrogenasa 1 (AAD-1; patente de EE. UU. n° 7.838.733 y secuencia principal de MSV; n° de reg. en Genbank FJ882146.1, y el intrón de alcohol deshidrogenasa; n° de reg. en Genbank EF539368.1), y región 3' no traducida de Lipasa de *Zea mays* (ZmLip 3'JTR). Se construyó un plásmido de referencia, pDAB107687, que no contenía una secuencia peptídica de tránsito de cloroplasto aguas arriba del gen *cry2Aa* y se incluyó en los estudios (FIG. 12). Los plásmidos se introdujeron en *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de plantas.

Las espigas de la variedad cultivada B104 de *Zea mays* se cosecharon 10-12 días después de la polinización. Las espigas cosechadas se descascarillaron y se esterilizaron en la superficie por inmersión en una solución al 20% de lejía comercial (lejía germicida Ultra Clorox®, hipoclorito de sodio al 6,15%) y dos gotas de Tween 20, durante 20

minutos, seguidas de tres enjuagues en agua desionizada estéril dentro de una campana de flujo laminar. Embriones cigóticos inmaduros (1,8-2,2 mm de largitud) se extirparon asépticamente de cada espiga y se distribuyeron en uno o más tubos de microcentrifuga que contenían 2,0 ml de suspensión de *Agrobacterium* a la que se había agregado 2 µl de tensioactivo Break-Thru® S233 al 10%.

- 5 Una vez completada la actividad de aislamiento del embrión, el tubo de embriones se cerró y se colocó en una plataforma oscilante durante 5 minutos. Los contenidos del tubo se vertieron luego sobre una placa de medio de cocultivo y la suspensión líquida de *Agrobacterium* se eliminó con una pipeta de transferencia estéril y desechable. La placa de cocultivo que contenía embriones se colocó en la parte posterior de la campana de flujo laminar con la tapa entreabierta durante 30 minutos; después de lo cual, los embriones se orientaron con el escutelo hacia arriba
- 10 utilizando un microscopio. La placa de cocultivo con embriones se devolvió luego a la parte posterior de la campana de flujo laminar con la tapa entreabierta durante otros 15 minutos. Luego se cerró la placa, se selló con una cinta 3M Micropore y se colocó en una incubadora a 25°C con 24 horas de luz al día a aproximadamente 60 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidad de luz.

- Tras el período de cocultivo, los embriones se transfirieron a medio de reposo. No se trasladaron más de 36
- 15 embriones a cada placa. Las placas se envolvieron con cinta 3M Micropore y se incubaron a 27°C con 24 horas de luz al día a aproximadamente 50 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidad de la luz durante 7-10 días. Los embriones callosos se transfirieron a continuación al medio de Selección I. No se desplazaron más de 18 embriones callosos a cada placa de Selección I. Las placas se envolvieron con cinta 3M Micropore y se incubaron a 27°C con 24 horas de luz al día a aproximadamente 50 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidad de luz durante 7 días. Los embriones callosos se transfirieron al
- 20 medio de Selección II. No se desplazaron más de 12 embriones callosos a cada placa de la Selección II. Las placas se envolvieron con cinta 3M Micropore y se incubaron a 27°C con 24 horas de luz al día a una intensidad de luz de aproximadamente 50 µmol m⁻² s⁻¹ durante 14 días.

- En esta fase, los callos resistentes se desplazaron al medio de Pre-regeneración. No se desplazaron más de 9
- 25 callos a cada placa de Pre-regeneración. Las placas se envolvieron con una cinta 3M Micropore y se incubaron a 27°C con 24 horas de luz al día a aproximadamente 50 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidad de luz durante 7 días. Los callos de regeneración se transfirieron luego al medio de Regeneración en Phytatrays™ y se incubaron a 28°C con 16 horas de luz/8 horas de oscuridad al día a aproximadamente 150 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidad de luz durante 7-14 días o hasta que se desarrollan los brotes. No se colocaron más de 5 callos en cada Phytatray™. A continuación se aislaron pequeños brotes con raíces primarias y se transfirieron a medio Shoot/Root. Las plántulas con raíces de
- 30 aproximadamente 6 cm o más se trasplantaron en el suelo y se trasladaron a una cámara de crecimiento para su endurecimiento.

- A las plantas transgénicas se les asignaron identificadores exclusivos y se transfirieron de forma habitual al invernadero. Las plantas se trasplantaron de Phytatrays™ a macetas pequeñas (T. O. Plastics, SVD de 3,5 pulgadas (8,89 centímetros), 700022C) llenas de medio de cultivo (Premier Tech Horticulture, ProMix BX, 0581 P) y se
- 35 cubrieron con humidomes para ayudar a aclimatar las plantas. Las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento Conviron™ (28°C/24°C, fotoperíodo de 16 horas, 50-70% de HR, 200 µmol de intensidad de luz) hasta alcanzar la fase V3-V4. Esto ayudó a aclimatar las plantas al suelo y a temperaturas más rigurosas. Las plantas se trasladaron luego al invernadero (Tipo de exposición a la luz: Photo o Assimilation; Límite superior de luz: 1.200 PAR; duración de 16 horas al día; 27°C por el día/24°C por la noche) y se trasplantaron desde las macetas
- 40 pequeñas a macetas de 5,5 pulgadas (13,97 centímetros). Aproximadamente 1-2 semanas después del trasplante a macetas más grandes, se tomaron muestras para bioanálisis. Se bioanalizó una planta por cada caso.

- Los casos seleccionados se identificaron para avanzar a la siguiente generación basándose en el número de copias de los genes, la detección de proteínas por transferencia Western y la actividad contra los insectos del bioanálisis. Se observaron casos que contenían el gen de resistencia a la espectinomina, pero no necesariamente se omitieron
- 45 en el desarrollo. Los casos seleccionados para el desarrollo se trasplantaron en macetas de 5 galones (19 litros). Se realizaron observaciones periódicamente para rastrear cualquier fenotipo anormal. Se colocaron bolsas de brotes sobre los brotes antes de la aparición de sedas para evitar la contaminación cruzada por el polen perdido. Se anotaron todos los brotes que producen sedas antes de cubrirlos y se retiró el brote. El segundo brote se cubrió a continuación y se usó para polinizaciones. Las plantas que produjeron brotes anormales o ningún brote se
- 50 registraron en la base de datos. Se volvieron a cortar las sedas antes de las polinizaciones para proporcionar un cepillo liso para aceptar el polen y se autopolinizaron las plantas.

- Las plantas para la selección de T₁ se fumigaron 7 días después de la siembra. Se cultivaron en macetas de 4
- 55 pulgadas (10,16 centímetros) de tierra para macetas Metro 360 con 15 macetas por piso. La fase de crecimiento de las plántulas fue VI-VI.5. Las macetas con mala germinación o que contienen plantas muy pequeñas (verticilo aún cerrado) se marcaron para que no se incluyeran en la evaluación de selección. Luego se colocaron pisos enteros de plantas en bandejas portadoras secundarias para la aplicación del fumigador-oruga. Las bandejas se colocaron de dos en dos en el fumigador-oruga Mandel, calibradas para dar un volumen de 187 l/ha a la superficie objetivo utilizando una boquilla de abanico plano 8002E (Tee Jet). Para la aplicación se formuló una solución de 35 g ae/ha Assure II (quizalofop) + 1% COC (concentrado de aceite de cultivo). Se utilizó un volumen de 15 ml/pulverizador
- 60 para calcular la solución de fumigación total necesaria. Calculos: (35 g ae/ha) x (1 ha/187 l) x (1 l/97,7 g ae Asecure II) = 0,192% de solución o 28,74 µl/15 ml de H₂O + 1% v/v). Después de la aplicación, las plantas se dejaron secar

durante una hora en un laboratorio de fumigación antes del retorno al invernadero. Aproximadamente 1-2 semanas después del trasplante a macetas más grandes, se tomaron muestras para bioanálisis. Se bioanalizó una planta por cada caso.

5 Todos los casos de T₀ que pasaron la selección de análisis molecular se analizaron para determinar los niveles de expresión de la proteína Cry2Aa. Los casos del montaje de referencia, pDAB107687, que comprendían Cry2Aa sin TraP tenían un nivel de expresión medio significativamente más alto que Cry2Aa (15,0 ng/cm²) en comparación con los casos de pDAB109807 (5,0 ng/cm²) que contenían TraP8. A pesar de los niveles reducidos de expresión de los casos pDAB109807, estos casos aún expresaban la proteína Cry2Aa.

10 En los casos de T₁ también se analizaron los niveles de expresión de la proteína Cry2Aa. Los casos del montaje de referencia, pDAB107687, que comprendían Cry2Aa sin TraP tenían un nivel de expresión promedio significativamente más alto que Cry2Aa (55 y 60 ng/cm²) en comparación con los casos de pDAB109807 (aproximadamente 20 a 40 ng/cm²) que contenía TraP8. A pesar de los niveles reducidos de expresión de los casos pDAB109807, estos casos aún expresaban la proteína Cry2Aa.

15 Las plantas transgénicas que contienen genes Bt individuales se analizaron para determinar su actividad insecticida en los bioanálisis realizados con larvas de lepidópteros recién nacidas en hojas de las plantas transgénicas. Las especies de lepidópteros analizadas fueron el barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Hiibner) (BEM), y el gusano de la mazorca de maíz, *Helicoverpa zea* (CEW).

20 Se llenaron parcialmente placas de 32 pocillos (C-D International, Pitman, NJ) con una solución de agar-agar al 2% y el agar-agar se dejó solidificar. Se tomaron secciones de hojas de aproximadamente 1 pulg² (6,45 cm²) de cada planta y se colocaron una en cada uno de los pocillos de las bandejas de 32 pocillos. Se colocó un pedazo de hoja en cada pocillo y se probaron dos pedazos de hoja por planta y por insecto. Los insectos se infestaron en masa usando un pincel, colocando 10 larvas recién nacidas en cada pozo. Las bandejas se sellaron con tapas adherentes perforadas que permitían la ventilación durante la prueba. Las bandejas se colocaron a 28°C, 40% de HR, 16 horas de luz: 8 horas de oscuridad durante tres días. Después de la prueba, se tomó la puntuación del daño en porcentaje simple para cada pedazo de hoja. Las puntuaciones del daño para cada prueba se promediaron y se usaron junto con el análisis de expresión de proteínas para realizar análisis de correlación.

25 Los resultados del bioanálisis de T₀ y T₁ indicaron que la secuencia del péptido de tránsito del cloroplasto híbrido TraP8 era funcional y que los casos pDAB109807 proporcionaban protección contra los insectos probados. En los casos de T₁, las plantas que expresaban la proteína Cry2Aa sin TraP (pDAB107687) tenían un daño medio en las hojas que no era significativamente diferente de la planta que expresaba la proteína Cry2Aa con TraP8 (pDAB109807) en todas las especies de insectos probadas. Estos resultados fueron sorprendentes, dado que las plantas que expresan la proteína Cry2Aa sin un TraP (pDAB107687) expresaron concentraciones más altas de proteína en comparación con las plantas que expresan la proteína Cry2Aa con TraP8 (pDAB109807).

VIP3Ab1:

35 La proteína Vip3Ab1 de *Bacillus thuringiensis* ha demostrado actividad contra *Helicoverpa zea* (CEW) y el cogollero del maíz (FAW) y cogollero del maíz resistente (rFAW). Los genes *vip3Ab1 v6* (SEQ ID n°: 11) y *vip3Ab1 v7* (SEQ ID n°: 12) se expresaron y se probaron para la tolerancia a insectos en el maíz. En este experimento, *vip3AbJ v6* y *vip3Ab1 v7* se evaluaron solos y junto con el péptido de tránsito del cloroplasto híbrido TraP8 en maíz para determinar la actividad de tolerancia al insecto y para evaluar el efecto que tendría la secuencia del péptido de tránsito del cloroplasto híbrido TraP8 v2 sobre la expresión de las proteínas Vip3Ab1 v6 y Vip3Ab1 v7 en el maíz.

40 El montaje pDAB111481 (FIG. 13) que contiene la secuencia polinucleotídica que codifica el péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP8 v2 (SEQ ID n°: 8) y un enlazador de codón GCA se clonaron aguas arriba del gen *vip3ab1 v6* y se probó la tolerancia a insectos en plantas de maíz. El montaje resultante contenía dos unidades de transcripción en plantas (UTP). La primera UTP comprendía el activador Ubiquitina 1 de *Zea mays* (activador ZmUbi1; Christensen, A., Sharrock R., y Quail P., (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation, *Plant Molecular Biology*, 18:675-689), gen de fusión TraP8-*vip3ab1 v6* (TraP8-Vip3Ab1 v6) y región 3' no traducida de Peroxidasa 5 de *Zea mays* (ZmPer 5 3'UTR). El montaje se confirmó mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación. La segunda UTP comprendía el activador del virus baciliforme de la caña de azúcar (activador de SCBV; patente de EE. UU. n° 6.489.462), el gen de tolerancia a herbicidas *aad-1* que contiene un MSV principal y el intrón 6 de alcohol-deshidrogenasa 1 (AAD-1; patente de EE. UU. n° 7.838.733 y secuencia principal de MSV: n° de reg. en Genbank FJ882146.1, y el intrón de alcohol deshidrogenasa; n° de reg. en Genbank EF539368.1) y la región 3' no traducida de Lipasa de *Zea mays* (ZmLip 3'UTR). Se construyó un plásmido de referencia, pDAB111479, que no contenía una secuencia peptídica de tránsito de cloroplasto aguas arriba del gen *vip3ab1 v6* y se incluyó en los estudios (FIG. 14). Los plásmidos se introdujeron en *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de plantas.

55 El montaje pDAB111338 (FIG.15) que contiene la secuencia del péptido de tránsito de cloroplasto híbrido TraP8 v2 (SEQ ID n°: 8) y un enlazador del codón GCA se clonaron aguas arriba del gen *vip3ab1 v7* y se probaron para pruebas de tolerancia a insectos en plantas de maíz. El montaje resultante contenía dos unidades de transcripción

en plantas (UTP). La primera UTP estaba compuesta por el activador Ubiquitina 1 de *Zea mays* (activador de ZmUbi1; Christensen, A., Sharrock R. y Quail P., (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation, *Plant Molecular Biology*, 18: 675-689), gen de fusión TraP8-*Vip3Ab1v7* (TraP8-*vip5dW v7*) y región 3' no traducida de peroxidasa 5 de *Zea mays* (ZmPer 5 3'UTR). El montaje se confirmó por digestión con enzimas de restricción y secuenciación. La segunda UTP estaba compuesta por el activador del virus baciliforme de la caña de azúcar (activador de SCBV; patente de EE. UU. n° 6.489.462), un gen de tolerancia a herbicidas *aad-1* que contiene un MSV principal y el intrón 6 de alcohol-deshidrogenasa 1 (AAD-1; patente de EE. UU. n° 7.838.733 y la secuencia de MSV principal; n° de reg. en Genbank FJ882146.1, y el intrón de alcohol deshidrogenasa; n° de reg. en Genbank EF539368.1), y la región 3' no traducida de la Lipasa de *Zea mays* (ZmLip 3'UTR). Se construyó un plásmido de referencia, pDAB112710, que no contenía una secuencia peptídica de tránsito de cloroplasto aguas arriba del gen *Vip3Ab1v7* y se incluyó en los estudios (FIG. 16). Los plásmidos se clonaron en *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de plantas.

La transformación del maíz, la expresión de proteínas y los bioanálisis de insectos se completaron siguiendo los protocolos descritos anteriormente, y los resultados se muestran en la tabla 33. Los resultados de los bioanálisis de insectos indicaron que la secuencia del péptido de tránsito del cloroplasto híbrido TraP8 era funcional y que los casos de pDAB111338 y pDAB111481 proporcionaban protección contra los insectos probados en bioanálisis. En los casos probados, las plantas que expresaban la proteína Vip3Ab1 sin TraP (pDAB112710 y pDAB111479) presentaban un daño medio en las hojas que no era significativamente diferente al de la planta que expresaba la proteína Vip3Ab1 con TraP8 (pDAB111338 y pDAB111481). En conclusión, las transferencias Western y los bioanálisis indicaron que todos los casos probados expresaron la proteína Vip3 Ab1.

Tabla 33. Resultados de análisis bioquímico y biológico para las secuencias codificadoras de *Vip3Ab1v6* y *Vip3Ab1v7* que se fusionaron a TraP8 en comparación con las secuencias codificadoras de *Vip3Ab1v6* y *Vip3Ab1v7* que no poseen una secuencia del péptido de tránsito de cloroplasto.

Plásmido	Descripción	Resultados de análisis bioquímicos			Resultados de análisis biológicos						
		Expresión media	Método de análisis ELISA (ng/cm ²) LC/MS/MS (µmol/cm ²)	Casos positivos a Western	Casos probados	Daños totales a CEW	% de daño medio a hojas de CEW	Daños totales a FAW	% de daño medio a hojas de FAW	Daños totales a rFAW	% de daño medio a hojas de rFAW
pDAB111479	Vip3Ab1 v6 sin TraP	59	ELISA	14/17	19	205,0	10,8	368,0	19,4	325,0	17,1
pDAB111481	Vip3Ab1 v6 TraP8 v2	239	ELISA	4/4	17	124,0	7,3	110,0	6,5	77,0	4,5
pDAB112710	Vip3Ab1 v7 sin TraP	143	ELISA	18/20	20	79,0	4,0	107,0	5,4	117,0	5,9
pDAB111338	Vip3Ab1 v7 TraP8 v2	180	ELISA	5/6	9	63,0	7,0	99,0	11,0	111,0	12,3

Ejemplo 5: Escisión en la planta de secuencias del péptido de tránsito de cloroplástico híbrido (TraP)

El punto de escisión del péptido de tránsito cloroplasto híbrido TraP8 y TraP9 se determinó por espectrometría MALDI y secuenciación de degradación de Edman del terminal N. El material vegetal se obtuvo de plantas transgénicas que contenían los genes de fusión TraP8-*dgt14*, TraP8-*dgt28*, TraP9-*dgt14* y TraP9-*dgt28* y se ensayó para determinar el lugar de la escisión del péptido de tránsito cloroplástico híbrido ocurrido durante el desplazamiento dentro del cloroplasto.

Resultados de MALDI:

Las proteínas semipurificadas de una muestra vegetal se separaron por SDS-PAGE. Las bandas de proteína de un tamaño equivalente al peso molecular de YFP se cortaron del gel, se decoloraron y se secaron. A continuación, las bandas de proteínas secas se digirieron en gel con tripsina (Promega; Madison, WI) en bicarbonato de amonio 25 mM durante la noche a 37°C. Los péptidos se purificaron con un C18 ZipTip™ (Millipore, Bedford, MA) y se eluyeron

con acetonitrilo al 50%/TFA al 0,1%. Las muestras se mezclaron con ácido α-ciano-4-hidroxicinámico de la matriz en una proporción de 1:1 y la mezcla se colocó en una placa de muestra MALDI y se secó al aire.

- El espectro de masas del péptido se generó utilizando un espectrómetro de masas Voyager DE-PRO MALDI-TOF™ (Applied Biosystems; Framingham, MA). La calibración externa se realizó utilizando una Calibration Mixture 2™ (Applied Biosystems). La calibración interna se realizó utilizando los picos de autólisis de tripsina a m/z 842,508, 1045,564 y 2211,108. Todos los espectros de masas se recogieron en el modelo de reflector de iones positivos. El análisis de la huella dactilar de la masa del péptido (PMF) se realizó utilizando el programa informático público PAWS™ (Protein Analysis Worksheet) de Proteometrics LLC, haciendo coincidir la PMF de la muestra con la PMF teórica de la proteína objetivo para verificar si la muestra era la proteína objetivo. La identificación de proteínas se realizó mediante la búsqueda en la base de datos utilizando MASCOT (MatrixScience, Londres, Reino Unido) frente a la base de datos de proteínas NCBI NR.

Secuenciación del terminal N por degradación química de Edman:

- La secuenciación terminal N se realizó en un secuenciador de proteínas Procise (modelo 494) de Applied Biosystems (Foster City, CA). Las muestras de proteínas se separaron en primer lugar por SDS-PAGE y luego se transfirieron a la membrana de PVDF. Las bandas de proteína se escindieron de la membrana y se cargaron en el secuenciador Procise. Se ejecutaron ocho ciclos de degradación química de Edman para cada muestra para obtener cinco restos AA en el terminal N. Se hizo una mezcla patrón de 20 PTH-aminoácidos (Applied Biosystems) con cada muestra. Los restos de aminoácidos de cada degradación de Edman se determinaron en función de sus tiempos de retención de la columna C-18 frente a los patrones.
- Los resultados de la secuenciación MALDI indicaron que las proteínas DGT-28 y DGT14 se expresaron y que se procesaron las secuencias peptídicas de tránsito del cloroplasto híbrido TraP. La tabla 34 lista las secuencias procesadas que se obtuvieron utilizando la degradación de Edman del terminal N y la secuenciación MALDI.

Tabla 34. Puntos de escisión de TraP8 y TraP9 fusionados con las secuencias de codificación *dgt-14* o *dgt-28*. El recuadro gris indica el punto de empalme.

Montaje	Secuencia	Número de secuencias con corte y empalme
TraP8-DG T14v2	S V I R P V K A A S T G G	66/67
TraP8-DG T28v1	S V I R P V K A A R G M P	66/67
TraP9-DG T14v2	K V T A S V S A S V S A A S T G G	62/63
TraP9-DG T28v1	K V T A S V S A S V S A A R G M P	--

Listado de secuencias

- <110> Lira, Justin
Cicchillo, Robert
Yerkes, Carla
Robinson andrew

<120> PÉPTIDOS DE TRÁNSITO DE CLOROPLASTOS DERIVADOS DE BRASSICA SINTÉTICOS

<130> 2971-P10294.1US (69717)

<160> 66

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

5 <211> 69

<212> PRT

<213> Brassica napus

<400> 1

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

Ile Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Asn Gln Asn Lys Ser Pro Phe Ser
20 25 30

Val Ser Leu Lys Thr His Gln Pro Arg Ala Ser Ser Trp Gly Leu Lys
35 40 45

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

Thr Ala Ser Val Ser
65

10 <210> 2

<211> 61

<212> PRT

<213> Brassica napus

<400> 2

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

Leu Pro Lys Ser Asn His Arg Lys Ser Pro Phe Ser Val Ser Leu Lys
20 25 30

Thr His Gln Gln Gln Arg Arg Ala Tyr Gln Ile Ser Ser Trp Gly Leu
35 40 45

15 Lys Lys Ser Asn Asn Gly Ser Val Ile Arg Pro Val Lys

50

55

60

<210> 3

<211> 65

20 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido de tránsito de cloroplasto quimérico TraP8

<400> 3

ES 2 738 585 T3

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

Ile Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Asn Gln Asn Lys Ser Pro Phe Ser
 20 25 30

Val Ser Leu Lys Thr His Gln Gln Gln Arg Arg Ala Tyr Gln Ile Ser
 35 40 45

Ser Trp Gly Leu Lys Lys Ser Asn Asn Gly Ser Val Ile Arg Pro Val
 50 55 60

Lys
 65

<210> 4

<211> 65

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido de tránsito de cloroplasto quimérico TraP9

<400> 4

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

Leu Pro Lys Ser Asn His Arg Lys Ser Pro Phe Ser Val Ser Leu Lys
 20 25 30

Thr His Gln Pro Arg Ala Ser Ser Trp Gly Leu Lys Lys Ser Gly Thr
 35 40 45

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

Ser
 65

10 <210> 5

<211> 195

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> polinucleótido que codifica TraP8

<400> 5

atggctcaat cttctaggat ttgccacggt gttcaaaacc cttgctgat catctctaac 60

ctttccaagt ccaaccagaa caagtctcct ttcagcgttt ctcttaagac tcatcagcaa 120

cagagaaggg cttaccagat ttcttcatgg ggactcaaga agtctaacaa cggatctggt 180

atcagacctg tgaag 195

<210> 6

<211> 195

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polinucleótido que codifica TraP9

ES 2 738 585 T3

	<400> 6		
	atggctcaag cttctagaat ttgccagaac ccttgcgta tttccaacct ccctaagtct	60	
	aaccatagga agtctccatt ctccgtttct cttaagactc atcagcctag agcttcatct	120	
	tggggactta agaaatccgg aaccatgctt aacggatctg ttatcaggcc tgttaagggt	180	
	accgcttctg tgtct	195	
	<210> 7		
	<211> 9		
5	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> enlazador		
	<400> 7		
10	gcttctct 9		
	<210> 8		
	<211> 195		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> polinucleótido que codifica TraP8 v2		
	<400> 8		
	atggctcaat cttagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttccaat	60	
	ctctccaaat ccaaccagaa caaatctcct ttctcagtca gcctcaagac tcaccagcag	120	
	cagcgtcgtg cttaccagat atctagctgg ggattgaaga agtcaaaciaa cgggtccgtg	180	
20	attcgtccgg ttaag	195	
	<210> 9		
	<211> 195		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> polinucleótido que codifica TraP9 v2		
	<400> 9		
	atggcacaag ccagccgtat ctgccagaat ccatgtgtga tatccaatct ccccaaaagc	60	
	aaccaccgta agtccccttt ctctgtctca ctcaagacgc atcagcctag agcctcttca	120	
	tggggactta agaagtctgg caccatgctg aacggttcag tgattagacc cgtcaagggtg	180	
	acagcttctg tttcc	195	
	<210> 10		
30	<211> 1902		
	<212> ADN		
	<213> Bacillus thuringiensis		
	<400> 10		

ES 2 738 585 T3

atgaacaacg ttctcaactc tgggagaacc accatctgcg acgcgtaaca tgtggtggca 60
cacgacccat tctcatttga gcacaagagc ctggatacga tccagaaaga gtggatggaa 120
tggaaaagga cggaccattc cttgtacggt gctccagtgg tgggcaactgt gtcctcgttc 180
ctcctcaaga aagtggggtc gctgatcggg aagcggatac tctccgaact ctggggaatc 240
atctttcogt ctggctcaac aaacttgatg caagacatac tgagagagac tgagcagttc 300
ttgaatcaga ggctgaatac ggacacgctg gcgagggtga acgctgaact cattggcctc 360
caagcgaaca ttagagagtt caatcagcaa gttgataact ttctgaacc caccacagaat 420
ccagtgcctc tgtccatcac atcatctgtg aacacaatgc agcagctgtt cttgaatagg 480
ctgccacagt ttcagattca aggctatcaa ctgcttcttc tgcctctgtt tgctcaagct 540
gcgaacatgc acctcagctt catcagagac gtgattctga acgcagatga gtggggaatc 600
agcgtcgcca ctttgaggac ctacagagat tacttgagga actatacacg cgattactca 660
aactactgca tcaaacaccta tcaaacagcg tttaggggac ttaacaccag actgcacgac 720
atgcttgagt tccggactta catgttcttc aacgtctttg agtatgtctc gatttggtcc 780
ctcttcaagt atcagagcct tatggtctcc tctggtgcta acctctacgc ctcgggttcc 840
ggaccgcagc agaccagtc attcactgcc cagaactggc cattcctcta cagccttttc 900
caagtgaaca gcaactacat cttgtctggc atctctggca caaggctctc tatcacattt 960
ccgaacattg gtggcctgcc tggctccacg acgacacaca gcctcaattc cgcacgcgtc 1020
aactactogg gtggggctctc ctccggactc attggtgcca ctaacttgaa ccataacttc 1080
aactgttcaa cgggtgctgcc accccttca actccgttg tcagatcgtg gcttgattct 1140
ggcactgaca gagagggagt tgccacgagc accaactggc agaccgagtc cttccagacc 1200
acactttcgc tgcgctgcbg tgccttctca gcgaggggaa actogaacta cttcccagac 1260
tacttcatac gcaacattag cggagtcccg ttggtgatcc ggaatgagga cctcaccaga 1320
cctcttcaat acaatcagat acgcaacatc gaaagcccat ctgggacacc tggaggtgca 1380
agggcatact tggttagcgt tcacaaccgg aagaacaaca tctatgctgc taatgagaat 1440
gggaccatga ttcattctgc accggaagat tacactggct tcacgatctc acctatccat 1500
gccacccaag tgaacaacca gactcgcacg ttcattctcag agaagttcgg caaccaaggt 1560
gacagcctcc gcttogaaca gagcaacacc acagccagat acacccttag aggcaatggc 1620
aacagctaca atctctatct gaggggtgtct agcattggca attcgacatc tcgggtgacg 1680
atcaatggtc gcgtttacac ggtctccaac gtcaatacga ccaactaaca tgatggggtc 1740
aatgacaatg gtgctcgctt ctccgacatc aacatcggca acatcgtcgc ttccgacaac 1800
accaatgtta cgctggacat caatgtcacc ttgaactctg gcacaccttt cgatctgatg 1860
aacatcatgt ttgtccccc caatcttctt cccctctact ga 1902

<210> 11
5 <211> 2364
<212> ADN
<213> Bacillus thuringiensis
<400> 11

ES 2 738 585 T3

atgaatatga ataatactaa attaaacgca agagcgctgc cttcgttcat cgactacttc	60
aacggcatct acggattcgc aactgggatc aaagacatca tgaacatgat cttcaagacg	120
gacacgggtg gaaatcttac attggatgag attctgaaga atcagcagtt gctcaacgaa	180
atctctggca aactcgacgg agttaacggg tcccttaacg acctcatagc acaaggcaat	240
cttaatacag agctgtccaa ggagattctc aagattgcca atgagcaaaa tcaagttctg	300
aacgatgtca acaacaagct ggacgccatc aacacaatgt tgcacatcta tctgcccaag	360
atcacctcta tgctctccga tgttatgaag cagaactatg cgctctcgct tcaagtcgag	420
tacttgtaa agcaactgaa agagatttcc gacaaactgg atggtatcaa tgtaacgtg	480
ttgatcaata gcacactgac cgaaatcacc ccagcttacc aaaggattaa atacgtgaat	540
gaaaagttcg aggaattaac cttcgctacg gagacaactc tgaaagtgaa gaaagattcg	600
tcaccagccg acattctgga cgagttgacc gaattaactg aactggcgaa gtccgttaca	660
aagaatgacg ttgatggctt cgagttctat ctcaatacat tccacgatgt tatgggtggc	720
aataatctgt tcggacgctc tgctttgaaa actgcttctg aattaatcgc aaaggaaaa	780
gttaagacgt cgggttccga ggtcgggaac gtgtacaact tcttgatagt gctcacggca	840

ES 2 738 585 T3

ctgcaagcga aagcgtttct cacgctgacc acgtgcagaa agttgctggg attggctgat 900
atcgattata catccatcat gaacgagcac cttaacaaag aaaaggagga gttcagagtg 960
aacattcttc caacattgtc caacacattc tccaatccga actacgcaaa ggtgaaaggt 1020
tctgacgaag atgcaaagat gatcgtcgag gcgaaacctg ggcacgctct ggtcggcttc 1080
gagatttcca acgactcgat gacggtatta aaggtgtacg aggctaagtt gaagcaaac 1140
tatcaagtgg acaaggactc ctttcagag gtgatctatt cagatatgga caagctgctg 1200
tgtccggatc aatctgagca aatctactac accaataata tagttttccc taacgaatac 1260
gtcattacca agattgattt cacgaagaag atgaaaacct ttagatatga ggttactgcc 1320
aatagctacg attcatctac ggggtgaaatc gatcttaaca agaagaaggt tgaatcaagc 1380
gaagccgagt atcggactct gtcagccaat aatgacggtg tgtacatgcc tcttggtgtg 1440
atctcagaga cattccttac accaattaat ggtttcggtc tgcaagctga tgaaaactcc 1500
agattaatca ctctgacgtg taagtcctac ttgagggagt tgctcctcgc cactgatctt 1560
tccaataaag aaacaaagct gattgttcca ccgatctcgt tcatctcaaa cattgtggag 1620
aacgggaacc tcgaaggcga gaatctcga ccggtggattg cgaacaaca gaacgcttac 1680
gtggatcata ctggagggat caacggcacg aaggtcttgt acgtgcataa ggacggagag 1740
ttctcacagt tcgtgggtgg gaagttgaag agcaagaccg agtacgtcat ccagtacatt 1800
gtgaagggga aggcctcaat ctatctcaag gataaaaaga atgagaactc tatctacgag 1860
gaaataaata atgaccttga gggcttccaa actgtgacca agcggttcat aaccggaacg 1920
gactcttccg gaatccatct gatctttact tcccagaacg gagaaggtgc tttcgggtgga 1980
aacttcatca tcagcgagat ccgacgtca gaggagttgc ttagcccaga attgatcatg 2040
tcggacgcgt ggggtgggaag ccaaggcacg tggatctctg gcaactccct caccattaat 2100
tccaacgtga atggcacggt taggcagaat ctccctcttg agtcgtattc aacctatagc 2160
atgaacttca cggttaacgg atttgggaag gtgacgggtcc gcaattctcg cgaggtgctc 2220
tttgaagagt cgtatcctca gctctctcca aaggacatca gcgagaagtt caccaccgca 2280
gcgaataata ctggattgta tgtcgaactc tcaagatcga cttctgggtg tgcaataaac 2340
tttcgggact tctcaattaa gtga 2364

<210> 12

<211> 2364

<212> ADN

5 <213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 12

atgaacatga ataatactaa attaaacgcg agggcgctgc cgagcttcat cgactacttc 60
aacggcatct acggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacg 120

ES 2 738 585 T3

gataccggcg gcaacctgac cctggacgag atcctgaaga accagcagct gctgaacgag 180
atcagcggca agctggacgg cgtgaacggc agcctgaacg acctgatcgc ccaaggcaac 240
ctgaatacag agctgagcaa ggagatcctg aagatcgcga acgagcagaa tcaagtgctg 300
aacgacgtga acaacaagct ggacgcgac aacaccatgc tgcacatcta cctgcccagg 360
atcacctcca tgctgagcga cgtgatgaag cagaactacg cgctgtccct ccaagtggag 420
tacctgagca agcagctgaa ggagatcagc gacaagctgg acgtgatcaa cgtgaacgtg 480
ctgatcaact ccacctgac cgagatcacc cggcctacc agaggattaa atacgtgaat 540
gaaaagtctg aggaattaac cttcgccacc gagaccacc tgaaggtgaa gaaggacagc 600
tccccggcgg acatcctgga cgagctgacc gaattaaccg agctggcgaa gtccgtgacc 660
aagaacgacg tggacggctt cgagttctac ctgaatacat tccacgacgt gatggtgggc 720
aataatctgt tcgggaggag cgccctcaag accgccagcg aattaatcgc caaggagaac 780
gtcaagacca gcggcagcga ggtgggcaac gtctacaact tctgatcgt gctgaccgcc 840
ctccaagcga aggcgttctt gaccctgacc acctgccgca agctgctggg cctggcggac 900
atcgactata catccatcat gaacgagcac ctgaacaagg agaaggagga gttccgcgtg 960
aacatcctgc cgacctgtc caacacctc agcaaccgca actacgcaa ggtgaagggg 1020
tccgacgagg acgcaagat gatcgtggag gccaaagcgg gccacgcgct ggtgggcttc 1080
gagatcagca acgacagcat gaccgtatta aaggtgtacg aggcgaagct gaagcagaac 1140
taccaagtgg acaaggactc cctgagcgag gtgatctaca gcgacatgga caagctgctg 1200
tgccccgacc agtccgagca aatctactac accaataata tcgtgttccc gaacgagtac 1260
gtgatcacca agatcgactt caccaagaag atgaaaacc tgcgctacga agtgaccgcc 1320
aacagctacg actcctcaac cggcgagatc gacctgaaca agaagaaggt ggaatcaagc 1380
gaggcggagt accgcaccct gagcgcgaat aatgacggcg tgtacatgcc gctgggcgtg 1440
atctccgaga ccttctgac cccaattaat gggttcggcc tccaagccga tgaaaactcc 1500
agattaatca ccctgacctg caagtcctac ctgagggagc tgctgctggc gaccgacctg 1560
agcaataaag agaccaagct gatcgtgccg ccgatctcct tcatctcaa catcgtggag 1620
aacggcaacc tggaggggca gaacctggag ccgtggatcg cgaacaaca gaacgcgtac 1680
gtggatcaca cgggagggcat caacggcacc aaggtgctgt acgtccaca ggacggcgag 1740
ttcagccagt tcgtggggcg caagctgaag agcaagacc agtacgtgat ccagtacatc 1800
gtgaagggca aggcctccat ctacctgaag gataaaaaga acgagaactc catctacgag 1860
gaaataaata atgacctgga gggcttccag accgtgacca agaggttcat caccggcacc 1920
gactcctccg gcatccacct gatcttcacc tctcagaacg gcgagggcgc gttcggcggc 1980
aacttcatca tcagcgagat ccgcacctcc gaggagctgc tgtccccgga gctgatcatg 2040
tccgacgcct gggtagggcag ccaaggcacc tggatctccg gcaactccct gaccattaat 2100
agcaactgta acggcacctt ccgccagaac ctgccgctgg agagctacag cacctactcc 2160
atgaacttca ccgtgaacgg gttcggcaag gtgacggtga ggaactcccg cgaggtgctg 2220
ttcgagaagt cctaccgca gctcagcccc aaggacatct cagagaagtt caccaccgcc 2280
gccaataata ccggcctgta cgtggagctg tcaaggagca ccagcggcgg cgcaataaac 2340
ttccgcgact tctcaattaa gtga 2364

ES 2 738 585 T3

<210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> secuencia SVSL
 <400> 13
 Ser Val Ser Leu
 1
 10 <210> 14
 <211> 207
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <223> polinucleótido que codifica Brassica napus EPSPS
 <400> 14
 atggcgcaat cttagcagaat ctgccatggc gtgcagaacc catgtggtat catctccaat 60
 ctctccaaat ccaaccaaaa caaatcacct ttctcogtct cettgaagac gcatcagcct 120
 cgagcttctt cgtggggatt gaagaagagt ggaacgatgc taaacgggtc tgtaattcgc 180
 ccggttaagg taacagcttc tgtttcc 207
 <210> 15
 <211> 183
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> polinucleótido que codifica Brassica rapa EPSPS
 <400> 15
 atggcgcaag cttagcagaat ctgccagaac ccatgtgtta tctccaatct ccccaaatcc 60
 aaccaccgca aatcgccctt ctctgtctcg ctgaagacgc accagcagca gcgtcgagct 120
 tatcagatat ctctgtgggg attgaagaag agtaacaacg gctccgtgat tcgtccggtt 180
 25 aag 183
 <210> 16
 <211> 1248
 <212> ADN
 <213> Streptomyces sviveus
 30 <400> 16

ES 2 738 585 T3

atgagagga tgccagcctt gtctttacct ggatcaaaga gtatcacagc tagggcactc 60
 tttcttgctg ctgctgctga tggggttact actttggtga ggccattgag aagtgacgac 120
 acagaaggat tcgctgaggg gttagttcgt ttaggctatc gtgtaggag gacacccgat 180
 acttgcaag tcgatggcag accacaagga ccagcagtgg ctgaggctga cgtctactgt 240
 agagacggag caaccaccgc tagattcttg ccaaccttag cagctgctgg tcacggaaca 300
 tacagatttg atgcttcacc acagatgagg agacgtctc ttttgccctt aagcagagcc 360
 ttgagggatt tgggtgctga tcttagacac gaagaagctg aaggatcatca ccctctgact 420
 gtccgtgctg ctggggttga aggaggagag gttactttgg atgctggca gtcaagtcaag 480
 tatctcactg ccttgctgct ccttggtccc cttacaagac aaggactgag gataagggtt 540
 actgatttg tgctcagcacc atacgtggag attacgcttg caatgatgag ggctttcgga 600
 gttgaagtgg caaggagggg agatgtgttc gttgttcac ctggtggata tcgtgcaact 660
 acgtatgcta tagaaccgca cgcaagtact gcttcttact tcttcgcagc tgctgctttg 720
 actcctggag ctgaagtgac tgtacctggg ttaggcacgg gagcacttca aggagatttg 780
 ggatttgtag atgtcttaag gagaatggga gccgaggtgt ccgtaggagc tgatgcaacc 840
 actgttagag gaactggtga attgctggc cttacagcca acatgagaga cataagtgat 900
 acgatgccga ccctogctgc aatagcacc tttgctagtg ctccagttag aatcgaggat 960
 gttgcccaaca ctgctgtcaa agaattgac agacttgagg cttgtgcaga gaaccttagg 1020
 aggttgaggag taagggttgc aacgggtccg gactggattg agatacacc tggtccagct 1080
 actggtgctc aagtcacaag ctatggtgat cacagaattg tgatgtcatt tgcaagtact 1140
 ggacttcgtg tgctctggat cagcttcgac gaccctggct gtgttcgtaa gacttttctc 1200
 gggtttcacg aggttttcgc agaattgagg cgtggcattg ggagctga 1248

<210> 17
 <211> 1251
 <212> ADN

5 <213> *Streptomyces sviveus*

<400> 17
 atggcaagag ggatgccagc cttgtcgtg cctggctcaa agtcgatcac ggctagagca 60
 ctctttctcg cagcagcagc cgacggagtc accacgcttg tgagaccgct gcggtcagac 120
 gacaccgagg gttttgcgga aggcctcgtc agactgggct atcgggttgg gaggactccc 180
 gacacgtggc aagtggacgg aaggccacaa ggtccagcag ttgccgaggc tgatgtgtat 240

ES 2 738 585 T3

tgtagagacg gtgcaacaac ggctaggttc ctccccacac tcgcagctgc tggacacggg 300
 acctacagat ttgatgcctc tccccagatg aggagaaggc cactgctgcc tctttctagg 360
 gctttgaggg accttggcgt tgatcttcgc cacgaggaag cggaaggga ccacccttg 420
 accgtgagag ctgctggagt cgagggaggt gaggttacac tcgatgctgg acagtctct 480
 cagtacttga cggcactgct gctgctcggc ccgctcacac gccaaagggt ggggattcgc 540
 gtcactgacg tggttagcgc tccgtacgtg gagattacac ttgcatgat gagagctttt 600
 ggggtcgagg ttgcacgcga aggcgacgtt ttcgtggtgc ctctgggtgg ctacagagcg 660
 actacgtacg cgattgagcc agatgccagc accgcaagct acttctttgc agctgctgcg 720
 ttgacacctg gagccgaggt cacagtgcct ggactcggga ccggagcgc tcaaggggat 780
 ctcggttcg tggacgtgct ggggagatg ggtgccgagg tcagcgtggg agcagacgct 840
 acgactgtta gaggcacggg tgagcttaga ggccttacag caaacatgag ggacatatcc 900
 gacacgatgc cgacgcttgc tgccatcgct ccgttcgctt cagcaccgct cagaattgaa 960
 gatgtggcga acaactcgcgt caaagagtgc gacagacttg aagcgtgtgc cgagaacttg 1020
 aggaggttg gagtgagagt cgcaactggt ccagactgga tcgagatcca ccctggtcca 1080
 gctactggag cgcaagtcac aagctatggc gaccatagga ttgttatgtc attcgcagtg 1140
 accggactca gagttcctgg gatctcttcc gacgacctg gttgctgctg gaaaacgttc 1200
 cctggcttcc acgaggcatt tgccggagctg cggagaggaa ttggttctg a 1251

<210> 18

<211> 1599

<212> ADN

5 <213> Glicina máx.

<400> 18

atggctcaag tctcccggtg tcacaatctt gctcagtcaa cccaaatctt tggacattca 60
 agcaactcaa acaaactgaa gtctgtgaat tctgtctcac ttcgcccacg cctttgggga 120
 gcatccaaga gtcgcatacc aatgcacaag aatgggagtt tcatgggcaa cttcaatggt 180
 gggaaaggca attctgggtg cttcaaagtt tcagcttctg ttgcagccgc agagaaaccc 240
 agcacttccc ctgagattgt tcttgaacct attaaaggact tcagtggaac aatcactctg 300
 cctggatcaa agagtctttc aaacagaata cttctcttgg cagctctgag tgaaggaacc 360
 actgtagttg acaacctttt gtactctgaa gatattcatt acatgttggg tgctctcaga 420
 actcttgggt tgagagttga agatgacaag accacaaaac aagccatagt tgaaggatgt 480
 ggtgggttgt ttccaacaag caaagaatcc aaagatgaga tcaacttgtt tcttggcaat 540
 gctggaattg caatgagaag cctcactgct gcagtagttg cagctgggtg gaatgcaagt 600
 tatgtccttg atggtgtccc cagaatgagg gaaaggccca tcggtgacct tgtggctggc 660

ES 2 738 585 T3

ctgaaacagc ttggagcaga tgttgattgc ttcttgggca caaactgcc tccagtgaga 720
 gtgaatggga agggaggttt gcctggtgga aaggtaaac tgagtggatc agtctcttcc 780
 cagtatctga ctgccttgct catggctgcc cctctggctt tgggtgatgt ggagattgaa 840
 atagtggaca agttgatttc tgttccatat gtggaatga ccctcaaact catggagagg 900
 tttggagttt ctgttgaaca ttctggcaac tgggatcgtt tccttgtaaca tggaggtcag 960
 aagtacaaaa gccctggcaa tgcctttggt gaaggggatg caagctctgc ttcctatctc 1020
 ttggctgggg ctgccatcac tgggtggacc atcactgtga atggctgtgg cacctcatcc 1080
 cttcaagggtg atgtaaagtt tgcagaggtc ttggagaaaa tgggtgccaa ggtcacctgg 1140
 tctgagaaca gtgtaactgt gtctggacct cccagagact tcagtggcag aaaggttctc 1200
 cgtggaattg atgtgaacat gaacaagatg ccagatgtgg ccatgaccct cgctgttgta 1260
 gccctgtttg caaatggacc aactgcaatc cgtgatgttg cttcatggag ggtgaaggag 1320
 acagagagga tgattgccat ttgcacagaa ctccgcaaac ttggtgcaac agttgaagag 1380
 ggaccagatt actgtgtgat aacccacct gagaagctca atgtgacagc cattgacacc 1440
 tatgatgacc acagaatggc aatggcttcc tcccttgctg cctgtggtga tgtgcctgtg 1500
 actatcaaag accctgggtg cacaaggaag acatttccag actactttga agttttggag 1560
 aggttgacaa agcactgagt agttagctta atcacctag 1599

<210> 19
 <211> 1551
 <212> ADN

5 <213> Brassica napus

<400> 19
 atggctcaat cttcaaggat ttgccacggt gttcagaacc cttgtgtgat catatccaat 60
 ctcaagtaaga gcaatcagaa caaatcacc ttctctgtct ccctcaaaac tcatcaacca 120
 cgtgcatcta gttggggatt gaagaaaagt gggacaatgc tgaacggatc agtcattagg 180
 cctgtaaagg ttacagcctc tgtgtccacg agtgaaaagg caagcgagat cgtcttacia 240
 ccgattagag aatctctgg gcttatcaag ttgcctggct ccaaatcact ctccaatagg 300
 atacttcttt tggtgcact gagtgaaggc acaactggtt tggacaactt gctcaactcc 360
 gatgatatca actacatgct tgacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat 420
 agcgttaaca atcgtgctgt cgtagaagga tgtggtggca tctttcctgc atctctggat 480
 tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgctgcaa cagccatgag accgttaact 540
 gctgctgtta ccgcagctgg aggaaatgct agttatgtgc ttgatggtgt tccaagaatg 600
 agggaaaggc caatagggga tttggtcgtc ggactgaaac agctcgggtc tgacgttgaa 660
 tgtactttag gcacaaactg tcctcccgtg cgtgttaacg caaatggtg actgcctggt 720

ES 2 738 585 T3

ggaaaggtca agttgtctgg ctccatttcc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct 780
gcaccacttg ccttaggtga tgtggagatt gagatcattg acaagctcat atctgttccg 840
tacgtggaaa tgacacttaa gctgatggaa agattcggag tttcagccga acattccgat 900
agctgggatc gtttctttgt aaaggggtggg cagaagtaca agtctcctgg caatgcttat 960
gtggaaggtg acgcttcttc agctagttag ttcttggtg gtgcagccat aactggcgag 1020
acagttaccg tggaggatg cggaaactacc agcctccaag gtgatgtcaa gttcgcagag 1080
gtgttgaaa agatgggggtg caaagtttcc tggacagaga actcagttac tgtaacggga 1140
cctagtaggg atgcttttgg gatgcgtcac cttagggcag ttgacgtgaa catgaacaag 1200
atgccagatg tcgctatgac tttagcagtt gtggcactgt ttgccgatgg tcctacaacg 1260
attagggacg tagcttcttg gagagtcaaa gaaactgaga ggatgatcgc catttgtact 1320
gagcttcgta agttgggtgc cacagttgaa gaaggggccg attactgctg gattactcct 1380
ccagctaaag ttaagcctgc tgagattgat acctatgatg accacagaat ggctatggcc 1440
tttagcctcg ctgcatgtgc cgatgttcca gtcacgatca aggaccctgg ctgtactaga 1500
aagacatttc ccgactactt tcaagtgtt gagtcaatca cgaaactg a 1551

<210> 20
<211> 1551
<212> ADN

5 <213> Brassica napus

<400> 20
atggctcaat cttcaaggat ttgccacggt gttcagaacc cttgtgtgat catatccaat 60
ctcagtaaga gcaatcagaa caaatcacc ttctctgtct ccctcaaac tcatcaacca 120
cgtgcatcta gttggggatt gaagaaaagc ggaacaatgc tgaacggatc agtcattagg 180
cctgtaaagg ttactgcatc tgtgtccacg agtgaagagg caagcgagat cgtcttacia 240
ccgattagag aaatctctgg gcttatcaag ttgcctggct ccaaatcact ctccaatagg 300
atacttcttt tggctgcact gagtgaaggc acaactgttg tggacaactt gctcaactcc 360
gatgatatca actacatgct tgacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat 420
agcgttaaca atcgtgctgt cgtagaagga tgtggtggaa tctttcctgc atctctggat 480
tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgctgcaa cagccatgag atccttaact 540
gctgctgtta ccgcagctgg tggaaatgct agttatgtgc ttgatgggtg tccaagaatg 600
agggaaaggc caatagggga tttggctgct ggactcaaac agctcgggtc tgacgttgaa 660
tgtactttag gcacaaactg toctcccgtg cgtgttaacg caaatgggtg actgcctggt 720
ggaaaagtca agttgtctgg ctccatttcc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct 780
gcaccacttg ccttaggtga tgtggagatt gagatcattg acaagctcat atctgttccg 840

ES 2 738 585 T3

tacgtggaaa tgacacttaa gctgatggaa agattcggag tttcagccga acattccgat 900
 agctgggatac gtttctttgt aaagggaggg cagaagtaca agtctcctgg aaacgcatac 960
 gtggaagggtg acgcttcttc agctagttag ttcttggtg gtgcagccat aactggcgag 1020
 acagttaccg tggaggatg cggaaactacc agcctccaag gtgatgtcaa gttcgcagag 1080
 gtgttgaaa agatgggggtg caaagtttcc tggacagaga actcagttac tgtaacggga 1140
 cctagtaggg atgcttttgg gatgcgtcac cttagagccg ttgacgtgaa catgaacaag 1200
 atgccagatg tcgctatgac cttagctgtg gttgactgt ttgccgatgg tcctacaacg 1260
 attagggacg tagcctcttg gagagtcaaa gaaaccgaga ggatgatcgc catttgtact 1320
 gagcttcgta agttgggtgc cacagttgaa gaagggctcg attactgct gattactcct 1380
 ccagctaaag ttaagccagc agagattgat acctatgatg accacagaat ggctatggct 1440
 ttcagcctcg ctgcatgtgc cgatgttcca gtcacgatca aggaccctgg ctgtactaga 1500
 aagacatttc ccgactactt tcaagtgtt gagtcaatca cgaaactg a 1551

<210> 21
 <211> 1551
 <212> ADN

5 <213> Brassica napus

<400> 21
 atggctcaat cttcaaggat ttgccacggt gttcagaacc cttgtgtgat catatccaat 60
 ctgagtaaga gcaatcagaa caaatcacc ttctctgtct ccctgaaaac tcatcaacca 120
 cgtgcatcta gttggggatt gaagaaaagt ggcacaatgc tgaacggatc agtcattagg 180
 cctgtaaagg ttacagcctc tgtgtccacg agtgaagagg caagcgagat cgtcttacia 240
 ccgattagag aaatctctgg gcttatcaag ttgcctggct ccaaatcact ctccaatagg 300
 atacttcttt tggtgcact gagtgaaggg acaactgttg tggacaactt gctcaactcc 360
 gatgatatca actacatgct tgacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat 420
 agcgttaaca atcgtgctgt cgtagaagga tgtggtggaa tctttcctgc atctctggat 480
 tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgctggca tcgccatgag atccttaact 540
 gctgctgta ccgcagctgg tggaaatgct agttatgtgc ttgatgggtg tccaagaatg 600
 agggaaaggc caatagggga tttggttgc ggactcaaac agctcgggtc tgacgttgaa 660
 tgtactttag gcacaaactg tcctcccgtg cgtgttaacg caaatgggtg actgcctggg 720
 ggaaaggca agttgtctgg ctccatttcc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct 780
 gcaccacttg ccttaggtga tgtggagatt gagatcattg acaagctcat atctgttccg 840
 tacgtggaaa tgacacttaa gctgatggaa agattcggag tttcagccga acattccgat 900
 agctgggatac gtttcttcgt aaagggaggg cagaagtaca agtctcctgg gaacgcatac 960

ES 2 738 585 T3

gtggaaggtg acgcttcttc agctagttac ttcttggtg gtgcagccat aactggcgag 1020
 acagttaccg tggaggatg cggaactacc agccttcaag gtgatgtcaa gttcgcagag 1080
 gtgttgaaa agatgggggtg caaagtttcc tggacagaga actcagttac tgtaacggga 1140
 cctagtaggg atgcttttgg aatgagacac cttagggcag ttgacgtgaa catgaacaag 1200
 atgccagatg tcgctatgac tttagctgta gtggcactgt tcgcagatgg tcctacaacg 1260
 ataagggacg tagcctcttg gagagtcaaa gaaaccgaga ggatgatcgc catttgtact 1320
 gagcttcgta agttgggtgc cacagttgaa gaagggccg attactgctg gattactcct 1380
 ccagctaaag ttaagccagc agagattgat acctatgatg accacagaat ggctatggcc 1440
 tttagcctcg ctgcatgtgc cgatgttcca gtcacgatca aggaccctgg ctgtactaga 1500
 aagacatttc ccgactactt tcaagtgcct gagtcaatca cgaaactg a 1551

<210> 22
 <211> 1533
 <212> ADN

5 <213> Triticum aestivum

<400> 22
 atggcaatgg ctgctgctgc tactatggct gcaagcgctt cctcttccgc tgtgagctta 60
 gacagagcag ctccagcacc atctaggcgt ctgccaatgc cagcagctag accagctagg 120
 agagtgacag tccgtttgtg gggaccaagg ggagcagctg cacgtgctac aagtgtcgca 180
 gcaccagcag caccgagtgg agctgaggaa gtcgtgcttc aacctatcag agagatcagc 240
 ggtgccgtcc agtcocctgg gtcaaagtca cttagcaaca gaatacttct tttgagcgca 300
 ttgtcagagg gcacgacagt ggtggataac cttctgaact ctgaagatgt tcactacatg 360
 cttgaggctt tggaggcatt aggtcttctt gttgaagccg ataaggttgc taagcgtgct 420
 gtggtggttg gttgocggag gagattccca gttgagaaag atgctcaaga ggaagtaag 480
 ctgtttctgg gaaatgctgg gattgcaatg aggagcttga ctgctgctgt ggttgctgct 540
 ggtggaaatg ccacatacgt ccttgatgga gtgcctagaa tgagagagag accgattggg 600
 gatctggtgg ttggccttca gcaacttggg gcagacgctg actgcttctt tggacaacaac 660
 tgtccacccg ttaggatcaa cgggaaagga ggtctccctg gtgggaaggt taagtgtctt 720
 ggatcaatct ctagtcatga tctgtcatca cttctcatgg ctgcacctct tgcacttgaa 780
 gatgttgaga ttgaaatcat agacaaactc atatcagttc catacgtgga aatgacgctg 840
 aagctgatgg agaggttcgg agtgacagca gagcactcag attcttgga taggttctac 900
 atcaagggag gtcagaagta caaatcacct gggaaacgctt acgtggaagg tgatgcctct 960
 tctgcttctt acttccctcg tggagcagca atcaccggag gaactgttac tgtcgaaggt 1020
 tgcggaacta cttccttgca aggggacgct aagtctgcag aagtcttaga aatgatggga 1080

ES 2 738 585 T3

gctaaagtta cttggaccga tacaagtgtt acagtgactg gtcctccacg tcaacccttt 1140
 ggaaggaagc acctcaaagc cgttgatggt aacatgaaca agatgccaga tgtcgccatg 1200
 acgcttgccg ttgtggctct gttcgcatg ggtcccacag ccattagaga cgtggccagc 1260
 tggagggtga aagaaactga aaggatggtc gccattagaa cagagttaac caaacttggg 1320
 gctactgtgg aagagggacc cgactattgc atcattacac ctcccagaaa gctgaacata 1380
 accgctattg acacttatga tgatcatcgt atggctatgg ccttttcatt agcagcttgc 1440
 gctgaggtgc cagtaacat tagagatcct ggggtgacta ggaaaacttt ccctaactac 1500
 ttcgatgtcc tttcaacatt cgtgaagaat tga 1533

<210> 23
 <211> 1281
 <212> ADN

5 <213> Streptomyces roseosporus

<400> 23
 atgacggtga tagagatacc tgggtctaag tctgttacag ccagagcact gttcttggca 60
 gctgctgccg atgggacgac tactcttctt agaccattgc gtagcgatga cactgagggc 120
 ttcgcagaag gactgaggaa tctgggctat gctgtggaac aagaggctga taggtggcgt 180
 gtccaaggca gaccagctgg accagcagcc acggaagcag atgtctattg cagagatggt 240
 gccaccaccg ctaggttcct tccgacactg gcagcagcag ctgcttccgg aacctacaga 300
 ttcgacgctt cagcacagat gcgtcgtcgt ccccttgctc cattgacaag ggcacttaca 360
 gccttgggtg tggatcttag acacgaagga gcagacggac atcatccgct caccgttctg 420
 gcagctggca tcgaaggagg agaattgacg ctcgacgctg gcgagtccag ccaatacttg 480
 acagcactgc tcatgctcgg acctcttaca acaaaggac ttcgcatcga agttacagaa 540
 ctctctctg caccctacgt ggaaatcacc ctcgctatga tgagagactt tgggtgtggag 600
 gttgagaggg aggggaatac cttcaccgtt ccaagccat cttcaagact taggtccaat 660
 agaggtggac ccataggagg ctatagagct actacgtatg ctgtcgagcc agatgcctca 720
 actgcctctt acttctttgc agctgctgcc ctactggtc gcgaggtcac agtgcctgga 780
 ttggggactg gagctttgca aggtgatttg cgtttcgtgg atgtgctgag agaaatgggt 840
 gccgaggtgt ctgttggctc ggacgccaca actgtgogct caactggcag attgagggga 900
 atcactgtga acatgagaga tatctcagac acgatgccta cactcgcagc tattgcacct 960
 tatgccgatg gtccagtggg gattgaagat gttgccaaca cccgtgtgaa ggagtgtgac 1020
 cgtctggagg cttgtgctga gaatctgagg gcaatgggaa tcaccgtcca tacgggtccg 1080
 gataggatag aaatccatcc tggaacacct aaaccgactg ggatcgccac ccacggagat 1140
 caccgcatag tcatgtcatt tgccgtcgtc ggccttcgca ctctggcct cacttacgac 1200
 gaccctggct gcgtgcgtaa gaccttcctt agatttcacg aggtgtttgc cgacttcgct 1260
 cacgaccttg agggaaggtg a 1281

10 <210> 24
 <211> 1248
 <212> ADN
 <213> Streptomyces griseus

ES 2 738 585 T3

<400> 24
atgggtgcag tgacagtcac cgacattcct ggaagcaaga gcgtgacagc aagggcactc 60
ttcttggcag cagcagccga tggaaacgaca aactgcttc gtcctctgag gtcagacgac 120
acggaggggt ttgccgaggg tcttaagaat ctcggttatg ccggtgagca agaggctgac 180
cgttgagggg tcgaaggcag accgcatggt ccagctgctc cggatgcaga tgtctactgc 240
cgtgatggtg caacgactgc acgctttctt ccaaccctcg tcgcagcagc agcttctgga 300
acgtatcggt tcgacgcctc agcacagatg aggagacgtc ccttggctcc actcactagg 360
gcactgacag ctcttggcgt ggatttgaga catggtggag aggaggggtca tcatccactg 420
actgtcagag ctgctggcat agaaggtggc gatgtgtcc ttgacgctgg tgaatcttct 480
cagtatctca cagcccttct tatgttgggt ccgttgactg ccaaaggtct tagaatcgaa 540
gtcactgatc tcgtgagcgc tccttacggt gaaatcactc tggccatgat gagagatttc 600
ggagtgatg ttagcagaga aggaaacact ttcaccgtgc cgtccggagg ctatagagct 660
acagcctacg ctgtggagcc agacgcaagc acgcttctt acttctttgc agcagctgcc 720
ctcactggac gcgaggtgac ggtccctggg ctgggaattg gtgctcttca aggagacctt 780
cgttttgtgg acgtgctgcg tgatatggga gcagaggtgt ctggtggacc agatgccacg 840
acagtgcgct caactggcag actccgtggc attacagtta ctatgagaga catttcagac 900
acgatgcca cactcgctgc tattgcacct cacgctgatg gaccctccg tattgaggac 960
gtggcaaaca ctcggtgcaa ggaatgtgat aggcttgagg catgtgctca aaaccttaga 1020
gctatgggaa tcacgggtgca tactgggcac gattggattg agattctccc tgggactcca 1080
aagccaacgg gaatagctac gcacggagat cacagaatcg ttatgtcctt cgcagtggct 1140
ggtttgttga ccctgggct gacatacgat gatcctggct gcgtccgcaa gacttttcca 1200
aggttccacg aagttttcgc tgactttgct gcatcaccct aagcctga 1248

<210> 25

<211> 1245

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> nucleótido DGT-31 v3

<400> 25

ES 2 738 585 T3

atgactgtga ttgacatccc tggctcaaag tcagttactg ccagagcatt gttcctcgca 60
gcagctgctg atggcactac aactcttttg agacctcttc acagcgatga cacggaaggc 120
ttcactgagg gtctcactcg tttgggatac gcagtggta gagaaccgga taggtggcac 180
atagaaggac gtcctcccg tccagcagca gcagatgcag aagttcactg tagggacggt 240
gctacaactg ctcgctttct tccaaccctt gcagctgctg ctgcctccgg aacgtatcgt 300
ttcgacgcat cagctcagat gaggcgtaga cccctcgctc ccctcacgga agctcttaga 360
acacttgag tggaccttag gcatgatgga gctgaaggcc accaccctt gacaattcaa 420
gcctctggtg ttaaggggag aggacttacg ctcgacgctg gtgagtcac tcagtacttg 480
acagctctgc tcactgcttg tccctcgacc gcagagggac tgagaataga agttacggag 540
cttgctctg ctccctatgt ggagatcacc cttgcaatga tgagaggctt tgggtggag 600
gttgtaggg aggggaatac tttcactgtg cctcctggag gttacagagc tacaacttat 660
gccatagaac cggacgcaag cacagcttcc tacttctttg cagcagcagc cctcactggg 720
agggaaagta cggcgcctgg cttgggcact ggagcacttc aaggtgatct taggttcacg 780
gaggtcctca gaaggatgga cgctgatggt cgcacaacgt ccgactctac aacagtgcgc 840
tcagatggtc gccttgctgg gttgactgtc aacatgaggg acataagcga cacaatgcca 900
acactggcag ctatagctcc gtacgcaagc tcaccagtta ggatcgagga tgtcgcaaac 960
accctgtgta agaatgtga taggctggag gcttgcgctc agaactctccg ctcaatgggc 1020
atcaccgttc gcactggacc agattggatt gagatccatc ctgggactcc tagaccgacc 1080
gagatagcca cacacgggta tcatagaatc gtcatgtcat ttgccgtggc tggacttaga 1140
accctgggga tgtcttacga tgaccctggc tgcgttcgca agacttttcc tcgttttcat 1200
gaagagtttg cagccttcgt ggagcgctca tccgctggag agtga 1245

<210> 26
<211> 213
<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de tránsito de cloroplasto

<400> 26
atgcttgcta gacaagggtg aagtctgaga gcttctcaat gcaacgctgg acttgctaga 60
agagttgaag ttggtgctct tgttgctcct agacctatct ctgtaacga cgttgctcct 120
cacgtttact ctgctccact ttctgctgct agaaggctt gctctaagtc ctccattagg 180
tccactagaa ggettcaaac tactgtgtgc tct 213

10 <210> 27
<211> 186
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
15 <223> Péptido de tránsito de cloroplasto

<400> 27

ES 2 738 585 T3

	atgcaactcc tgaatcagag gcaagccctg cgtcttggtc gttcatctgc ttcaaagaac	60
	cagcaagttg ctccactggc ctctaggcct gcttcttctc tgagcgtcag cgcattccagc	120
	gtcgcacctg cacctgcttg ctcagctcct gctggagctg gaaggcgtgc tgttgcctg	180
	agagca	186
	<210> 28	
	<211> 198	
	<212> ADN	
5	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido de tránsito de cloroplasto	
	<400> 28	
	atggctcaat cttagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttccaat	60
	ctctccaaat ccaaccagaa caaatctcct ttctcagtca gcctcaagac tcaccagcag	120
	cagcgtcgtg cttaccagat atctagctgg ggattgaaga agtcaaacia cgggtccgtg	180
	attcgtccgg ttaaggca	198
10	<210> 29	
	<211> 198	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Péptido de tránsito de cloroplasto	
	<400> 29	
	atggcacaag ccagccgtat ctgccagaat ccatgtgtga tatccaatct ccccaaaagc	60
	aaccaccgta agtccccttt ctctgtctca ctcaagacgc atcagcctag agcctcttca	120
	tggggactta agaagtctgg caccatgctg aacggttcag tgattagacc cgtcaagggtg	180
	acagcttctg tttccgca	198
	<210> 30	
	<211> 225	
20	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido de tránsito de cloroplasto	
	<400> 30	
25	atggcacaat cttagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttcaaat	60
	ctctcaaagt ccaatcagaa caaatcacct ttctcogtct ccctcaagac acaccagcat	120
	ccaagggcat acccgataag cagctcatgg ggactcaaga agagcggaat gactctgatt	180
	ggctctgagc ttcgtcctct taaggttatg tctctgttt ccgca	225
	<210> 31	
	<211> 207	
30	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido de tránsito de cloroplasto	
	<400> 31	

ES 2 738 585 T3

atggcacaag ttagcagaat ctgtaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc 60
 tcaaagtcca gccaacgtaa gtctcccctc agcgtgtctc tgaaaactca gcagcccaga 120
 gcttcttcat ggggtttgaa gaaatctgga acgatgctta acggctcagt cattcgtccg 180
 gttaaggtga cagcctccgt ctccgct 207

<210> 32
 <211> 1464
 <212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Fusión en marco de dgt-28 v5 y TraP4 v2

<400> 32
 atgcttgcta gacaaggtgg aagtctgaga gcttctcaat gcaacgctgg acttgctaga 60
 agagttgaag ttggtgctct tgttgctcct agacctatct ctgttaacga cgttgctcct 120
 cacgtttact ctgctccact ttctgctgct agaaggtcct gctctaagtc ctccattag 180
 tccactagaa ggcttcaaac tactgtgtgc tctgctgcaa gagggatgcc agccttgtct 240
 ttacctggat caaagagtat cacagctagg gcaactcttc ttgctgctgc tgctgatggg 300
 gttactactt tgggtgaggcc attgagaagt gacgacacag aaggattcgc tgagggggtta 360
 gttcgtttag gctatcgtgt agggaggaca cccgatactt ggcaagtcga tggcagacca 420
 caaggaccag cagtggctga ggctgacgtc tactgtagag acggagcaac caccgctaga 480
 ttcttgccaa ccttagcagc tgctggtcac ggaacataca gatttgatgc ttcaccacag 540
 atgaggagac gtcctctttt gcccttaagc agagccttga gggatttggg tgtcgatctt 600
 agacacgaag aagctgaagg tcatcacctt ctgactgtcc gtgctgctgg ggttgaagga 660
 ggagaggtta ctttgatgac tggtcagtca agtcagtatc tcaactgcctt gttgctcctt 720
 ggtcccctta caagacaagc actgaggata agggttactg atttggtgtc agcaccatac 780
 gtggagatta cgcttgcaat gatgagggct ttcggagttg aagtggcaag ggagggagat 840
 gtgttcggtt tccaccctgg tggatctcgt gcaactacgt atgctataga acccgacgca 900
 agtactgctt ctacttctt cgcagctgct gctttgactc ctggagctga agtgactgta 960
 cctggggttag gcacgggagc acttcaagga gatttgggat ttgtagatgt ctttaaggaga 1020
 atgggagccg aggtgtccgt aggagctgat gcaaccactg ttagaggaac tgggtgaattg 1080
 cgtggcctta cagccaacat gagagacata agtgatacga tgccgaccct cgctgcaata 1140
 gcaccctttg ctagtgtctc agttagaatc gaggatggtt ccaacactcg tgtcaaagaa 1200
 tgtgacagac ttgaggcttg tgcagagaac cttaggaggt tgggagtaag ggttgcaacg 1260
 ggtccggact ggattgagat acaccctggt ccagctactg gtgctcaagt cacaagctat 1320
 ggtgatcaca gaattgtgat gtcatttga gtgactggac ttcgtgtgcc tgggatcagc 1380
 ttcgacgacc ctggctgtgt tcgtaagact ttcctgggt ttcacgaggc tttcgcagaa 1440
 ttgaggcgtg gcattgggag ctga 1464

<210> 33
 <211> 1434
 <212> ADN

15 <213> secuencia artificial

ES 2 738 585 T3

<220>

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

<400> 33

atgcaactcc tgaatcagag gcaagccctg cgtcttggtc gttcatctgc ttcaaagaac	60
cagcaagttg ctccactggc ctctaggcct gcttcttcct tgagcgtcag cgcattccagc	120
gtcgcacctg cacctgcttg ctcagctcct gctggagctg gaaggcgtgc tgttgctcgtg	180
agagcagcaa gagggatgcc agccttgtct ttacctggat caaagagtat cacagctagg	240
gcactctttc ttgctgctgc tgctgatggg gttactactt tggtgaggcc attgagaagt	300
gacgacacag aaggattcgc tgaggggtta gttcgtttag gctatcgtgt agggaggaca	360
cccgatactt ggcaagtcca tggcagacca caaggaccag cagtggctga ggctgacgtc	420
tactgtagag acggagcaac caccgctaga ttcttgccaa ccttagcagc tgctggtcac	480
ggaacataca gatttgatgc ttcaccacag atgaggagac gtcctctttt gcccttaagc	540
agagccttga gggatttggg tgtcgatctt agacacgaag aagctgaagg tcatcacctt	600
ctgactgtcc gtgctgctgg ggttgaagga ggagaggta ctttgatgc tggtcagtca	660
agtacgtatc tcaactgcctt gttgctcctt ggtcccctta caagacaagg actgaggata	720
agggttactg atttggtgct agcaccatac gtggagatta cgcttgcaat gatgagggt	780
ttcggagttg aagtggcaag ggagggagat gtgttcgttg ttccacctgg tggatatcgt	840
gcaactacgt atgctataga acccgacgca agtactgctt cttacttctt cgcagctgct	900
gctttgactc ctggagctga agtgactgta cctggggttag gcacgggagc acttcaagga	960
gatttgggat ttgtagatgt cttaaggaga atgggagccg aggtgtccgt aggagctgat	1020
gcaaccactg ttagaggaac tggatgaattg cgtggcctta cagccaacat gagagacata	1080
agtgatacga tgccgacctc cgctgcaata gcaccctttg ctagtgtctc agttagaatc	1140
gaggatggtg ccaacactcg tgtcaaagaa tgtgacagac ttgaggcttg tgcagagAAC	1200
cttaggaggt tgggagtaag ggttgcaacg ggtccggact ggattgagat acaccctggt	1260
ccagctactg gtgctcaagt cacaagctat ggtgatcaca gaattgtgat gtcatttgca	1320
gtgactggac ttcgtgtgcc tgggatcagc ttcgacgacc ctggctgtgt tcgtaagact	1380
tttctgggtt ttcacgaggc tttcgcagaa ttgaggcgtg gcattgggag ctga	1434

5

<210> 34

<211> 1446

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220>

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

<400> 34

ES 2 738 585 T3

atggetcaat cttagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttccaat 60
ctctccaaat ccaaccagaa caaatctcct ttctcagtca gcctcaagac tcaccagcag 120
cagcgtcgtg cttaccagat atctagctgg ggattgaaga agtcaaacia cgggtccgtg 180
attcgtccgg ttaaggcagc aagagggatg ccagccttgt ctttacctgg atcaaagagt 240
atcacagcta gggcactcct tcttgctgct gctgctgatg gggttactac tttggtgagg 300
ccattgagaa gtgacgacac agaaggattc gctgaggggt tagttcgttt aggctatcgt 360
gtagggagga cacccgatac ttggcaagtc gatggcagac cacaaggacc agcagtggct 420
gaggctgacg tctactgtag agacggagca accaccgcta gattccttgc aaccttagca 480
gctgctggtc acggaacata cagatttgat gcttcaccac agatgaggag acgtcctcct 540
ttgcccttaa gcagagcctt gagggatttg ggtgtcgatc ttagacacga agaagctgaa 600
ggatcatcacc ctctgactgt ccgtgctgct ggggttgaag gaggagaggt tactttggat 660
gctggtcagt caagtcagta tctcactgcc ttgttgcctc ttggtcccct tacaagacia 720
ggactgagga taagggttac tgatttggtg tcagcaccat acgtggagat tacgcttgca 780
atgatgaggg ctttcggagt tgaagtggca agggagggag atgtgttcgt tgttccacct 840
ggtgatatac gtgcaactac gtatgctata gaaccocagc caagtactgc ttcttacttc 900
ttcgcagctg ctgctttgac tcttgagct gaagtgactg tacctgggtt aggcacggga 960
gcacttcaag gagatttggg atttgtagat gtcttaagga gaatgggagc cgaggtgtcc 1020
gtaggagctg atgcaaccac tgtagagga actggtgaat tgcgtggcct tacagccaac 1080
atgagagaca taagtgatac gatgccgacc ctgctgcaa tagcaccctt tgctagtgt 1140
ccagttagaa tcgaggatgt tgccaacact cgtgtcaaag aatgtgacag acttgaggct 1200
tgtgcagaga accttaggag gttgggagta agggttgcaa cgggtccgga ctggattgag 1260
atacaccctg gtccagctac tgggtgctcaa gtcacaagct atggatgatca cagaattgtg 1320
atgtcatttg cagtgactgg acttcgtgtg cctgggatca gcttcgacga ccctggctgt 1380
gttcgtaaga cttttcctgg gtttcacgag gctttcgcag aattgaggcg tggcattggg 1440
agctga 1446

<210> 35

5 <211> 1446

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

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

10 <400> 35

ES 2 738 585 T3

atggcacaag ccagccgatat ctgccagaat ccatgtgtga tatccaatct ccccaaaagc 60
aaccaccgta agtccccttt ctctgtctca ctcaagacgc atcagcctag agcctcttca 120
tggggactta agaagtctgg caccatgctg aacggttcag tgattagacc cgtcaagggtg 180
acagcttctg tttccgcagc aagagggatg ccagccttgt ctttacctgg atcaaagagt 240
atcacagcta gggcactcct tcttgctgct gctgctgatg gggttactac tttggtgagg 300
ccattgagaa gtgacgacac agaaggattc gctgaggggt tagttcgttt aggctatcgt 360
gtagggagga cacccgatac ttggcaagtc gatggcagac cacaaggacc agcagtggtc 420
gaggctgacg tctactgtag agacggagca accaccgcta gattccttgc aaccttagca 480
gctgctggtc acggaacata cagatttgat gcttcaccac agatgaggag acgtcctcct 540
ttgcccttaa gcagagcctt gagggatttg ggtgtcgatc ttagacacga agaagctgaa 600
ggtcatcacc ctctgactgt ccgtgctgct ggggttgaag gaggagaggt tactttggat 660
gctggtcagt caagtcagta tctcactgcc ttgttgctcc ttggtcccct tacaagacaa 720
ggactgagga taagggttac tgatttggtg tcagcaccat acgtggagat tacgcttgca 780
atgatgaggg ctttcggagt tgaagtggca agggagggag atgtgttcgt tgttccacct 840
ggtggatata gtgcaactac gtatgctata gaaccgcagc caagtactgc ttcttacttc 900
ttcgcagctg ctgctttgac tctcggagct gaagtgactg tacctgggtt aggcacggga 960
gcacttcaag gagatttggg atttgtagat gtcttaagga gaatgggagc cgaggtgtcc 1020
gtaggagctg atgcaaccac tgtttagagga actggtgaat tgcgtggcct tacagccaac 1080
atgagagaca taagtgatac gatgccgacc ctcgctgcaa tagcaccctt tgctagtgtc 1140
ccagttagaa tcgaggatgt tgccaacact cgtgtcaaag aatgtgacag acttgaggct 1200
tgtgcagaga accttaggag gttgggagta agggttgcaa cgggtccgga ctggattgag 1260
atacaccctg gtccagctac tggtgctcaa gtcacaagct atggtgatca cagaattgtg 1320
atgtcatttg cagtgactgg acttcgtgtg cctgggatca gcttcgacga ccctggctgt 1380
gttcgtaaga cttttcctgg gtttcacgag gctttcgcag aattgaggcg tggcattggg 1440
agctga 1446

<210> 36

5 <211> 1473

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

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

10 <400> 36

ES 2 738 585 T3

atggcacaat ctagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttcaaat 60
ctctcaaagt ccaatcagaa caaatcacct ttctcogtct cctcaagac acaccagcat 120
ccaagggcat acccgataag cagctcatgg ggactcaaga agagcggaat gactctgatt 180
ggctctgagc ttctcctct taaggttatg tcctctgttt ccgcagcaag agggatgcc 240
gccttgtctt tacctggatc aaagagtatc acagctaggg cactctttct tgctgctgct 300
gctgatgggg ttactacttt ggtgaggcca ttgagaagtg acgacacaga aggattcgt 360
gaggggttag ttctgttagg ctatcgtgta gggaggacac ccgatacttg gcaagtcgat 420
ggcagaccac aaggaccagc agtggctgag gctgacgtct actgtagaga cggagcaacc 480
accgctagat tcttgccaac cttagcagct gctggctcag gaacatacag atttgatgct 540
tcaccacaga tgaggagacg tcctcttttg cccttaagca gagccttgag ggatttgggt 600
gtcgatctta gacacgaaga agctgaaggt catcacctc tgactgtccg tgctgctggg 660
gttgaaggag gagaggttac tttggatgct ggtcagtcaa gtcagtatct cactgccttg 720
ttgctccttg gtccccttac aagacaagga ctgaggataa gggttactga tttggtgtca 780
gcaccatacg tggagattac gcttgcaatg atgagggctt tcggagttga agtggcaagg 840
gagggagatg tgttcgttgt tccacctggt ggatatcgtg caactacgta tgctatagaa 900
cccgacgcaa gtactgcttc ttacttcttc gcagctgctg ctttgactcc tggagctgaa 960
gtgactgtac ctgggttagg cacgggagca cttcaaggag atttgggatt tgtagatgtc 1020
ttaaggagaa tgggagccga ggtgtccgta ggagctgatg caaccactgt tagaggaact 1080
ggtgaattgc gtggccttac agccaacatg agagacataa gtgatacgtat gccgaccctc 1140
gctgcaatag caccctttgc tagtgctcca gttagaatcg aggatggtgc caaactcgt 1200
gtcaaagaat gtgacagact tgaggcttgt gcagagaacc ttaggaggtt gggagtaagg 1260
gttgcaacgg gtccggactg gattgagata caccctggtc cagctactgg tgctcaagtc 1320
acaagctatg gtgatcacag aattgtgatg tcatttgagc tgactggact tcgtgtgct 1380
gggatcagct tcgacgacct tggctgtggt cgtaagactt ttctggggt tcacgaggct 1440
ttcgcagaat tgaggcgtgg cattgggagc tga 1473

<210> 37

5 <211> 1455

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

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

10 <400> 37

ES 2 738 585 T3

atggcacaag ttagcagaat ctgtaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc 60
 tcaaagtcca gccaacgtaa gtctcccctc agcgtgtctc tgaaaactca gcagcccaga 120
 gcttcttcat ggggtttgaa gaaatctgga acgatgctta acggctcagt cattcgtccg 180
 gttaagtgga cagcctccgt ctccgctgct agagggatgc cagccttgtc tttacctgga 240
 tcaaagagta tcacagctag ggcactcttt cttgctgctg ctgctgatgg ggttactact 300
 ttggtgaggc cattgagaag tgacgacaca gaaggattcg ctgaggggtt agttcgttta 360
 ggctatcgtg tagggaggac acccgatact tggcaagtcg atggcagacc acaaggacca 420
 gcagtggctg aggctgacgt ctactgtaga gacggagcaa ccaccgctag attcttgcca 480
 acctagcag ctgctggta cggaacatac agatttgatg cttcaccaca gatgaggaga 540
 cgtcctcttt tgcccttaag cagagccttg agggatttgg gtgtcgatct tagacacgaa 600
 gaagctgaag gtcacacccc tctgactgtc cgtgctgctg gggttgaagg aggagaggtt 660
 actttggatg ctggtcagtc aagtcagtat ctcaactgct tgttgctcct tgggtcccctt 720
 acaagacaag gactgaggat aagggttact gatttgggtg cagcaccata cgtggagatt 780
 acgcttgcaa tgatgagggc tttcggagtt gaagtggcaa gggagggaga tgtgttcggt 840
 gttccacctg gtggatatcg tgcaactacg tatgctatag aaccggacgc aagtactgct 900
 tcttacttct tcgcagctgc tgctttgact cctggagctg aagtgactgt acctgggta 960
 ggcacgggag cacttcaagg agatttggga tttgtagatg tcttaaggag aatgggagcc 1020
 gaggtgtccg taggagctga tgcaaccact gttagaggaa ctggtgaatt gcgtggcctt 1080
 acagccaaca tgagagacat aagtgatacg atgccgacc tcgctgcaat agcacccttt 1140
 gctagtgtctc cagttagaat cgaggatggt gccaacactc gtgtcaaaga atgtgacaga 1200
 cttgaggctt gtgcagagaa ccttaggagg ttgggagtaa gggttgcaac ggggtccggac 1260
 tggattgaga tacaccctgg tccagctact ggtgctcaag tcacaagcta tggatgatcac 1320
 agaattgtga tgtcatttgc agtactgga cttcgtgtgc ctgggatcag cttcgacgac 1380
 cctggctgtg ttcgtaagac ttttctggg tttcacgagg ctttcgcaga attgaggcgt 1440
 ggcatggga gctga 1455

<210> 38
 5 <211> 186
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de tránsito de cloroplasto

10 <400> 38
 atgatacttg gatctagccc aactctgcca cacgcatcac atccagccag acctggtcct 60
 gccagaccga tttcagtga cgcagctcgtt ccccatgtct actccgctcc tctctccgtg 120
 gctaggcgtt cttgtagcaa gtccagcatt aggtctacgc gtagattgca gaccacagtc 180
 tgctca 186

<210> 39
 <211> 186
 <212> ADN
 15 <213> secuencia artificial

ES 2 738 585 T3

<220>

<223> Péptido de tránsito de cloroplasto

<400> 39

atggcacaga tcaacaagtc tgctaattggg gtttaggaacg cttcactgat aagcaacttc 60

tccaataccc gtcaagccaa atcccccttc tcctctcat gcggaacaag actgaagaac 120

agcagcagag gtttgaagaa ggtggcagtt aggctcattg gctcccgtgt caaagtgtct 180

gcctca 186

5 <210> 40

<211> 207

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido de tránsito de cloroplasto

<400> 40

atgcaactgc tcaaccagag acaagccttg aggctcggga ggtcctctgc ctctaagaat 60

cagcaagtgg caccgcttgc cagccgtccc atttctgtga acgacgtcgt gccacacgtc 120

tacagcgcac ctctgtccgt tgctagacgc tcctgctcta agtcatcaat ccgcagcaact 180

agaaggcttc agacgaccgt ttgttca 207

<210> 41

<211> 1467

15 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Fusión en marco de dgt-32 v3 y TraP14 v2

<400> 41

ES 2 738 585 T3

atgatacttg gatctagccc aactctgcca cacgcatcac atccagccag acctggtcct 60
gccagaccga tttcagtga cgcgctcgtt ccccatgtct actccgctcc tctctccgtg 120
gctaggcggtt cttgtagcaa gtccagcatt aggtctacgc gtagattgca gaccacagtc 180
tgctcaatga cggtagataga gatacctggg tctaagtctg ttacagccag agcactgttc 240
ttggcagctg ctgccgatgg gacgactact cttcttagac cattgcgtag cgatgacact 300
gagggcttcg cagaaggact gaggaatctg ggctatgctg tggacaaga ggctgatagg 360
tggcgtgtcc aaggcagacc agctggacca gcagccacgg aagcagatgt ctattgcaga 420
gatggtgcca ccaccgctag gttccttccg aactggcag cagcagctgc ttccggaacc 480
tacagattcg acgcttcagc acagatgctg cgtcgtcccc ttgctccatt gacaagggca 540
cttacagcct tgggtgtgga tcttagacac gaaggagcag acggacatca tccgctcacc 600
gttctgtcag ctggcatcga aggaggagaa ttgacgctcg acgctggcga gtccagccaa 660
tacttgacag cactgctcat gctcggacct cttacaaca agggacttcg catcgaagtt 720
acagaactcg tctctgcacc ctacgtgga atcaccctcg ctatgatgag agactttggt 780
gtggagggtg agagggagg gaataccttc accgttcaa gccatcttc aagacttagg 840
tccaatagag gtggacccat aggaggctat agagctacta cgtatgctgt cgagccagat 900
gcctcaactg cctcttactt ctttgacgct gctgccctca ctggctcgcga ggtcacagtg 960
cctggattgg ggactggagc tttgcaagg gatttgcgtt tcgtggatgt gctgagagaa 1020
atgggtgccg aggtgtctgt tggctcggac gccacaactg tgcgctcaac tggcagattg 1080
aggggaatca ctgtgaacat gagagatatc tcagacacga tgcttactact cgcagctatt 1140
gcaccttatg ccgatggtcc agtggtgatt gaagatggtt ccaacacccg tgtgaaggag 1200
tgtgaccgctc tggaggcttg tgctgagaat ctgagggcaa tgggaatcac cgtccatacg 1260
ggtccggata ggatagaaat ccatcctgga acacctaacc cgactgggat cgccaccac 1320
ggagatcacc gcatagtcac gtcatttgc gtcgctggcc ttcgactcc tggcctcact 1380
tacgacgacc ctggctgctg gcgtaagacc ttccttagat ttcacgaggt gtttgccgac 1440
ttcgtcacg accttgaggg aaggtga 1467

<210> 42
<211> 1455
<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>
<223> fusión en marco de dgt-33 v3 y TraP24 v2

<400> 42

ES 2 738 585 T3

atgcaactgc tcaaccagag acaagccttg aggctcggga ggtcctctgc ctctaagaat 60
cagcaagtgg caccgcttgc cagccgtccc atttctgtga acgacgtcgt gccacacgtc 120
tacagcgcac ctctgtccgt tgctagacgc tcctgctcta agtcatcaat ccgcagcact 180
agaaggcttc agacgaccgt ttgttcaatg ggtgcagtga cagtcatcga cattcctgga 240
agcaagagcg tgacagcaag ggcactcttc ttggcagcag cagccgatgg aacgacaaca 300
ctgcttcgtc ctctgaggtc agacgacacg gaggggtttg ccgagggctct taagaatctc 360
ggttatgccg ttgagcaaga ggctgaccgt tggagggctg aaggcagacc ggatggtcca 420
gctgctccgg atgcagatgt ctactgccgt gatggtgcaa cgactgcacg ctttcttcca 480
accctcgtcg cagcagcagc ttctggaacg tatcgtttcg acgcctcagc acagatgagg 540
agacgtccct tggtccact cactagggca ctgacagctc ttggcgtgga tttgagacat 600
ggtgagagg agggctcatca tccactgact gtcagagctg ctggcataga aggtggcgat 660
gttgccttg acgctggtga atcttctcag tatctcacag cccttcttat gttgggtccg 720
ttgactgcc aaggtcttag aatcgaagtc actgatctcg tgagcgctcc ttacgttgaa 780
atcactctgg ccatgatgag agatttcgga gttgatgta gcagagaag aaacactttc 840
accgtccgt ccggaggcta tagagctaca gcctacgctg tggagccaga cgcaagcacg 900
gcttcttact tctttgcagc agctgccctc actggacgcg aggtgacggt ccctgggctg 960
ggaatggtg ctcttcaagg agacctcgt tttgtggacg tgctgctga tatgggagca 1020
gagggtgctg ttggaccaga tgccacgaca gtgcgctcaa ctggcagact ccgtggcatt 1080
acagttacta tgagagacat ttcagacacg atgccaacac tcgctgctat tgcacctcac 1140
gctgatggac ccgtccgtat tgaggacgtg gcaaacactc gtgtcaagga atgtgatagg 1200
cttgaggcat gtgctcaaaa ccttagagct atgggaatca cgggtgcatac tgggcacgat 1260
tgattgaga ttctccctgg gactccaaag ccaacgggaa tagctacgca cggagatcac 1320
agaatcgta tgccttcgc agtggctggt ttgttgacct ctgggctgac atacgatgat 1380
cctggctgcg tccgcaagac ttttccaagg ttccacgaag ttttcgctga ctttgctgca 1440
tcacccaag cctga 1455

<210> 43

<211> 1431

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcciones DGT-31 y TRAP23

<400> 43

ES 2 738 585 T3

atggcacaga tcaacaagtc tgctaatggg gttaggaacg cttcactgat aagcaacttc 60
 tccaataccc gtcaagccaa atccccttcc tccctctcat gcggaacaag actgaagaac 120
 agcagcagag gtttgaagaa ggtggcagtt aggctcattg gctcccgtgt caaagtgtct 180
 gcctcaatga ctgtgattga catccctggc tcaaagtcag ttactgccag agcattgttc 240
 ctgcgagcag ctgctgatgg cactacaact cttttgagac ctcttcacag cgatgacacg 300
 gaaggcttca ctgagggctc cactcgtttg ggatacgcag tggttagaga acccgatagg 360
 tggcacatag aaggacgtcc ctccggcca gcagcagcag atgcagaagt tcaactgtagg 420
 gacggtgcta caactgctcg ctttcttcca acccttgagc ctgctgctgc ctccggaacg 480
 tatcgtttcg acgcatcagc tcagatgagg cgtagacccc tcgctcccct cacggaagct 540
 cttagaacac ttggagtgga ccttaggcat gatggagctg aaggccacca ccccttgaca 600
 attcaagcct ctggtgtaa ggggtggagga cttacgctcg acgctgggta gtcactctcag 660
 tacttgacag ctctgctcat gcttggctct ctgaccgcag agggactgag aatagaagtt 720
 acggagcttg tctctgctcc ttatgtggag atcacccttg caatgatgag aggctttggt 780
 gtggagggtt ttagggaggg gaatacttcc actgtgcctc ctggaggtta cagagctaca 840
 acttatgcca tagaacggga cgcaagcaca gcttcctact tctttgcagc agcagccctc 900
 actgggaggg aagtgacggt gcctggcttg ggcactggag cacttcaagg tgatcttagg 960
 ttcacggagg tcctcagaag gatggacgct gatgttcgca caacgtccga ctctacaaca 1020
 gtgcgctcag atggctgcct tgctgggttg actgtcaaca tgagggacat aagcgacaca 1080
 atgccaacac tggcagctat agctccgtac gcaagctcac cagttaggat cgaggatgtc 1140
 gcaaacaccc gtgtgaagga atgtgatagg ctggaggctt gcgctcagaa tctccgctca 1200
 atgggcatca ccgttcgcac tggaccagat tggattgaga tccatcctgg gactcctaga 1260
 ccgaccgaga tagccacaca cggatgatcat agaatcgtca tgcatttgc cgtggctgga 1320
 cttagaaccc ctgggatgtc ttacgatgac cctggctgag ttcgcaagac ttttctctgt 1380
 tttcatgaag agtttgcagc cttcgtggag cgctcatccg ctggagagtg a 1431

<210> 44
 <211> 19
 <212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico

<400> 44
 agccacatcc cagtaacga 19

10 <210> 45
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico

<400> 45
 cctccctctt tgacgcc 17

<210> 46

- <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
- <220>
 5 <223> Secuencia de la sonda oligonucleotídica
- <400> 46
 cagcccaatg aggcatcagc 20
- <210> 47
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
- <220>
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico
- <400> 47
 15 ctcaaggag attgggatt tgt 23
- <210> 48
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico
- <400> 48
 gagggtcggc atcgat 17
- <210> 49
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
- <220>
 <223> Secuencia de la sonda oligonucleotídica
- 30 <400> 49
 agagaagttt cgacggatt cgggc 25
- <210> 50
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> secuencia artificial
- <220>
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico
- <400> 50
 gaggattagg gttcaacgg ag 22
- 40 <210> 51
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
- <220>
 45 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico
- <400> 51
 gagaattgag ctgagacgag g 21
- <210> 52
 <211> 24
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

- <220>
<223> Secuencia del cebador oligonucleotídico
- <400> 52
ctgcaggtca acggatcagg atat 24
- 5 <210> 53
<211> 24
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- <220>
10 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico
- <400> 53
tgggctgaat tgaagacatg ctcc 24
- <210> 54
<211> 20
15 <212> ADN
<213> secuencia artificial
- <220>
<223> Secuencia del cebador oligonucleotídico
- <400> 54
20 cgtccacaaa gctgaatgtg 20
- <210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- 25 <220>
<223> Secuencia del cebador oligonucleotídico
- <400> 55
cgaagtcatg gaagccactt 20
- <210> 56
30 <211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- <220>
<223> Secuencia del cebador oligonucleotídico
- 35 <400> 56
ctcaaggag attgggatt tgt 23
- <210> 57
<211> 17
<212> ADN
40 <213> secuencia artificial
- <220>
<223> Secuencia del cebador oligonucleotídico
- <400> 57
gagggtcggc atcgtat 17
- 45 <210> 58
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- <220>
50 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico

<400> 58
 tgttcgggttc cctctaccaa 20

<210> 59
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de la sonda oligonucleotídica

<400> 59
 10 cacagaaccg tcgcttcagc aaca 24

<210> 60
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico

<400> 60
 caacatccat caccttgact ga 22

<210> 61
 20 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de la sonda oligonucleotídica

25 <400> 61
 cgagcagacc gccgtgtact tctacc 26

<210> 62
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico

<400> 62
 tggcggacga cgacttgt 18

35 <210> 63
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 40 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico

<400> 63
 aaagttgga ggctgccgt 19

<210> 64
 <211> 18
 45 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del cebador oligonucleotídico

<400> 64
 50 ttcagcacc gtcagaat 18

<210> 65
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

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

<400> 65
tgccgagaac ttgaggaggt 20

10 <210> 66
<211> 17
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de cebador oligonucleotídico

15 <400> 66
tggtcgcat agcttgt 17

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una proteína híbrida, comprendiendo el polinucleótido:

5 una secuencia de nucleótidos sintética procedente de *Brassica* que codifica un péptido híbrido único que comprende una secuencia de aminoácidos contigua de un primer péptido de tránsito de cloroplasto (CTP) de *Brassica*, comprendiendo además el péptido híbrido una secuencia de aminoácidos contigua de un segundo CTP diferente, en donde el péptido híbrido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3 o a la SEQ ID NO: 4; y

10 una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés operativamente unida a la secuencia de nucleótidos sintética procedente de *Brassica*,

en donde la molécula de ácido nucleico aislado, satisface al menos uno de los puntos siguientes:

- (i) el polinucleótido está operativamente unido a una o más secuencias reguladoras;
- (ii) el primer CTP de *Brassica* es de *Brassica napus* o *Brassica rapa*, en donde preferiblemente el segundo CTP diferente es de una *Brassica* sp. distinto del primer CTP de *Brassica*;
- 15 (iii) el primer CTP de *Brassica* de la proteína híbrida codificada por el polinucleótido es de un gen de 3-enolpiruvilshikimato-5-fosfato sintetasa (EPSPS);
- (iv) el segundo CTP diferente de la proteína híbrida codificada por el polinucleótido es de un gen de EPSPS;
- (v) el péptido híbrido codificado por el polinucleótido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95%, preferiblemente al menos 98% y aún más preferible 100% idéntica a la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4;
- 20 (vi) el polipéptido de interés de la proteína híbrida codificado por el polinucleótido no es la SEQ ID NO: 1 ni la SEQ ID NO: 2; y
- (vii) la secuencia nucleotídica que codifica el péptido híbrido se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, n° 6, n° 8 y n° 9.

25 2. La proteína híbrida codificada por la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde preferiblemente la proteína híbrida satisface al menos uno de los puntos siguientes:

- (i) el polipéptido de interés se dirige a un plástido en una célula que contiene plástidos, en donde preferiblemente el CTP híbrido se retira de la proteína híbrida cuando el polipéptido de interés se dirige al plástido; y
- 30 (ii) el polipéptido de interés satisface al menos uno de los apartados siguientes:
 - (a) el polipéptido de interés es una enzima, preferiblemente el polipéptido de interés se selecciona del grupo que consiste en: acetolasa sintasa (ALS), ALS mutada, precursores de ALS y 3-enolpiruvilshikimato-5-fosfato sintetasa (EPSPS),
 - 35 (b) el polipéptido de interés se expresa en un plástido de una célula en donde el polipéptido de interés se expresa de forma natural,
 - (c) el polipéptido de interés está involucrado en un proceso vegetal seleccionado del grupo que consiste en resistencia a virus, resistencia a patógenos bacterianos, resistencia a insectos, resistencia a nematodos, resistencia a hongos, vigor de la planta, rendimiento de la planta, tolerancia a temperaturas, tolerancia al estado del suelo, tolerancia a la cantidad baja de luz, tolerancia a la cantidad baja de agua, tolerancia a la cantidad alta de agua, tolerancia al entorno químico, color de la semilla, modificación del almidón, síntesis de aminoácidos, fotosíntesis, síntesis de ácidos grasos, síntesis de aceite, síntesis de carotenoides, síntesis de terpenoides, síntesis de almidón y resistencia a herbicidas, preferiblemente el polipéptido de interés está involucrado en la resistencia a herbicidas,
 - 40 (d) el polipéptido de interés se selecciona del grupo que consiste en zeaxantina epoxidasa, colina monooxigenasa, ferroquelatasa, ácido graso omega-3 desaturasa, glutamina sintetasa, provitamina A, hormonas y proteínas de la toxina Bt; y
 - 45 (e) el polipéptido de interés es un polipéptido fluorescente.

3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1(i), en donde una o más secuencias reguladoras incluye un activador que es funcional en una célula vegetal, y en donde la molécula es un vector de expresión vegetal.

4. Un material vegetal transgénico que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 (i), en donde una o más secuencias reguladoras incluyen un activador que es funcional en una célula vegetal en donde preferiblemente el material vegetal satisface al menos uno de los puntos siguientes:

- 5 (i) el material vegetal se selecciona del grupo que consiste en una célula vegetal, un tejido vegetal, un cultivo de tejido vegetal, un cultivo de callo y una parte de la planta;
- (ii) el material vegetal comprende una proteína híbrida codificada por el polinucleótido, en donde preferiblemente el polipéptido de interés se dirige a un plástido en una célula del material vegetal;
- (iii) la molécula de ácido nucleico está integrada de manera estable en el genoma de una célula del material vegetal; y
- 10 (iv) el material vegetal procede de una planta seleccionada del grupo que consiste en *Arabidopsis*, alfalfa, *Brassica*, alubias, brécol, col, zanahoria, coliflor, apio, col china, algodón, pepino, berenjena, etc. lechuga, melón, guisante, pimienta, cacahuete, patata, calabaza, rábano, colza, espinaca, soja, calabacín, remolacha, girasol, tabaco, tomate, sandía, maíz, cebolla, arroz, sorgo, trigo, centeno, mijo, caña de azúcar, avena, triticale, hierba de pradera y césped.

15 5. El material vegetal transgénico de la reivindicación 4, en donde el material vegetal es una planta transgénica.

6. Un procedimiento para producir un material vegetal transgénico, procedimiento que comprende:

transformar el material vegetal con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde preferiblemente el procedimiento incluye al menos uno de los puntos siguientes:

- 20 (i) el material vegetal se selecciona del grupo que consiste en una célula vegetal, un tejido vegetal, un cultivo de tejido vegetal, un cultivo de callo, una parte de la planta y una planta completa; y
- (ii) el material vegetal no es una planta completa.

7. El material vegetal transgénico de la reivindicación 4(ii), en donde el polipéptido de interés satisface al menos uno de los puntos siguientes:

- 25 (i) el polipéptido de interés está involucrado en un proceso vegetal seleccionado del grupo que consiste en resistencia a virus, resistencia a patógenos bacterianos, resistencia a insectos, resistencia a nematodos, resistencia a hongos, vigor de la planta, rendimiento de la planta, tolerancia a temperaturas, tolerancia al estado del suelo, tolerancia a la cantidad baja de luz, tolerancia a la cantidad baja de agua, tolerancia a la cantidad alta de agua, tolerancia al entorno químico, color de la semilla, modificación del almidón, síntesis de aminoácidos, fotosíntesis, síntesis de ácidos grasos, síntesis de aceite, síntesis de carotenoides, síntesis de terpenoides, síntesis de almidón y resistencia a herbicidas, en donde preferiblemente el polipéptido de interés está involucrado en la resistencia a herbicidas, y el material vegetal presenta mayor resistencia a herbicidas o tolerancia a herbicidas en comparación con un material vegetal natural de la misma especie;
- 30 (ii) el polipéptido de interés se selecciona del grupo que consiste en zeaxantina epoxidasa, colina monooxigenasa, ferroquelatasa, ácido graso omega-3 desaturasa, glutamina sintetasa, provitamina A, hormonas y proteínas de la toxina Bt; y
- 35 (iii) el polipéptido de interés se selecciona del grupo que consiste en: acetolasa sintasa (ALS), ALS mutada, precursores de ALS y 3-enolpiruvilshikimato-5-fosfato sintetasa (EPSPS).

8. El material vegetal transgénico de la reivindicación 5, en donde el polipéptido de interés satisface al menos uno de los puntos siguientes:

- 40 (i) el polipéptido de interés está involucrado en un proceso vegetal seleccionado del grupo que consiste en resistencia a virus, resistencia a patógenos bacterianos, resistencia a insectos, resistencia a nematodos, resistencia a hongos, vigor de la planta, rendimiento de la planta, tolerancia a temperaturas, tolerancia al estado del suelo, tolerancia a la cantidad baja de luz, tolerancia a la cantidad baja de agua, tolerancia a la cantidad alta de agua, tolerancia al entorno químico, color de la semilla, modificación del almidón, síntesis de aminoácidos, fotosíntesis, síntesis de ácidos grasos, síntesis de aceite, síntesis de carotenoides, síntesis de terpenoides, síntesis de almidón y resistencia a herbicidas, en donde preferiblemente el polipéptido de interés está involucrado en la resistencia a herbicidas, y el material vegetal presenta mayor resistencia a herbicidas o tolerancia a herbicidas en comparación con un material vegetal natural de la misma especie;
- 45 (ii) el polipéptido de interés se selecciona del grupo que consiste en zeaxantina epoxidasa, colina monooxigenasa, ferroquelatasa, ácido graso omega-3 desaturasa, glutamina sintetasa, provitamina A, hormonas y proteínas de la toxina Bt; y
- 50 (iii) el polipéptido de interés se selecciona del grupo que consiste en: acetolasa sintasa (ALS), ALS mutada,

precursores de ALS y 3-enolpiruvilshikimato-5-fosfato sintetasa (EPSPS).

9. Un producto básico vegetal transgénico producido a partir del material vegetal de la reivindicación 4, en donde el producto básico comprende el polinucleótido que codifica la proteína híbrida.

FIG. 1.

Molécula de ARNm que comprende una secuencia codificadora del péptido de tránsito de cloroplastos procedente de *Brassica*

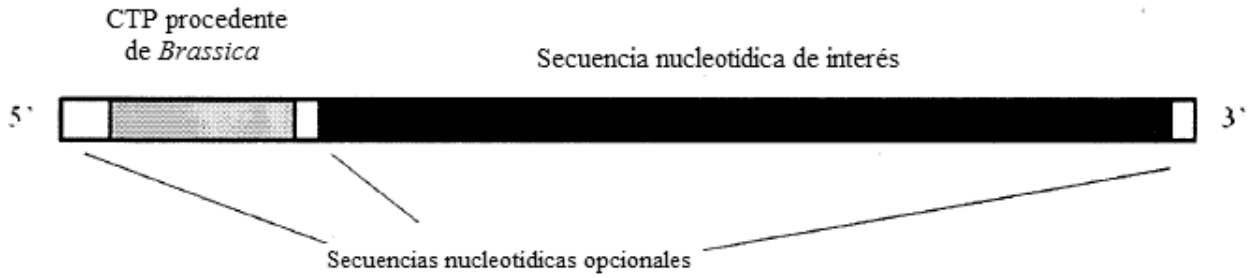


FIG. 2

Cartografía plasmídica de pDAB101977

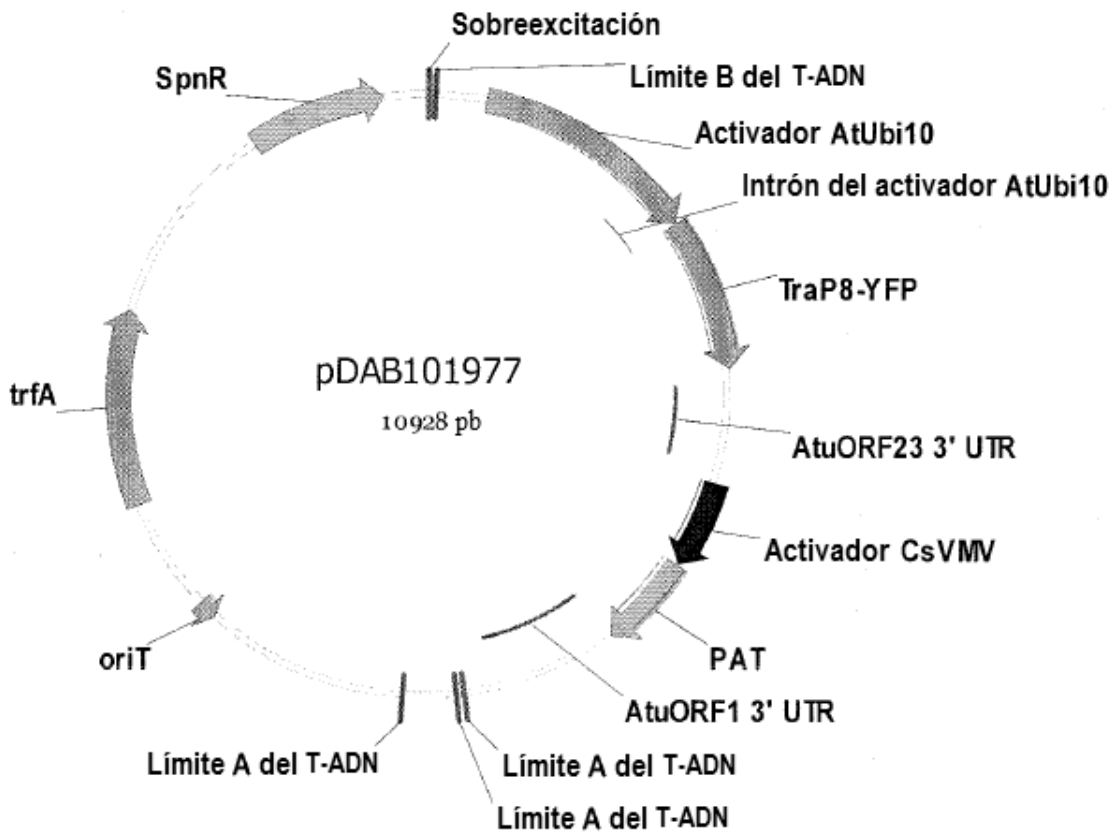


FIG. 3

Cartografía plasmídica de pDAB101908

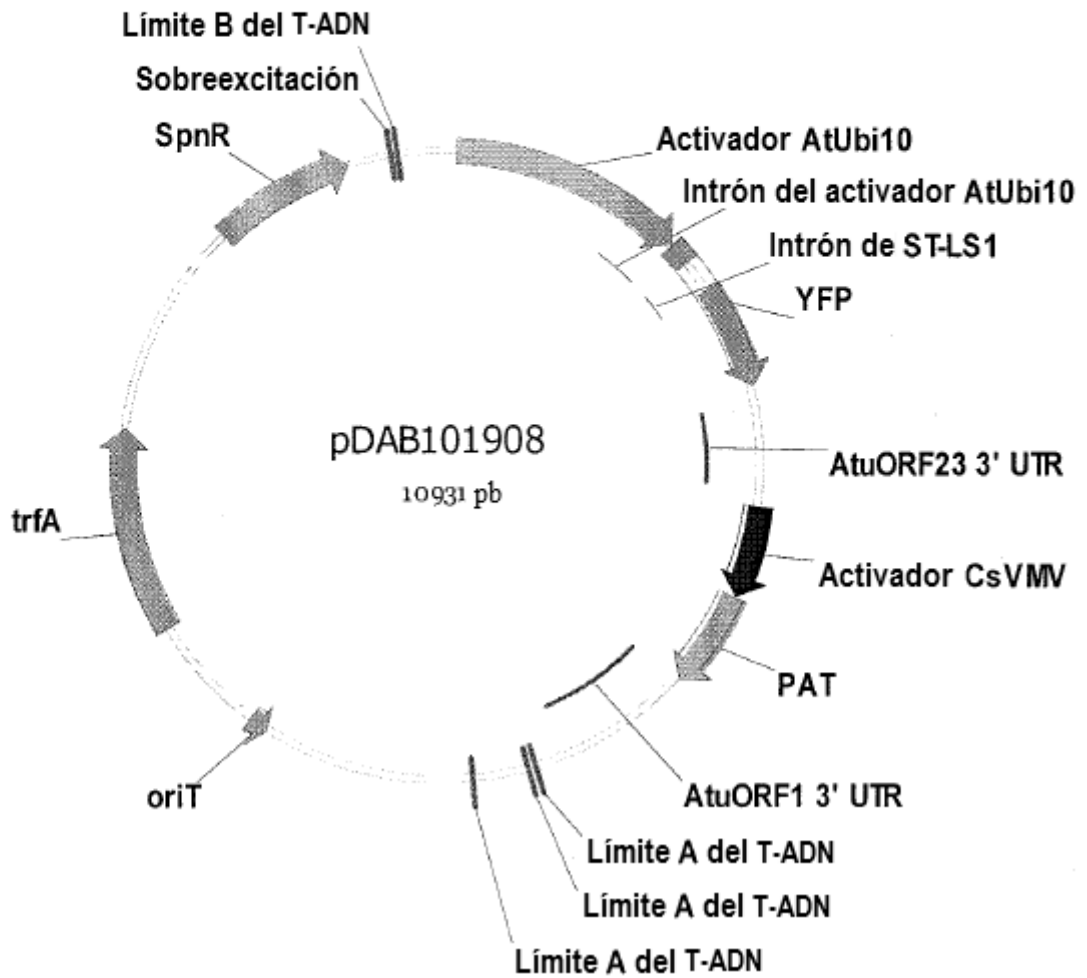


FIG. 4

TraP8-YFP infiltrado en el tejido de la hoja de tabaco se desplazó a los cloroplastos del tejido de la hoja del tabaco

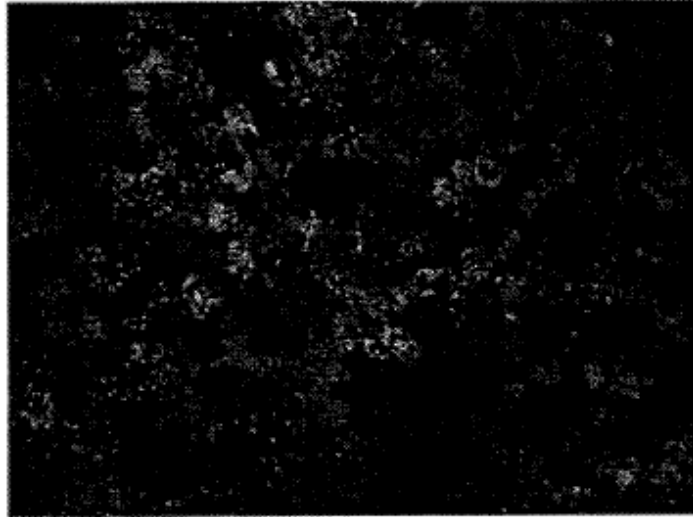


FIG. 5

TraP9-YFP infiltrado en el tejido de la hoja de tabaco se desplazó a los cloroplastos del tejido de la hoja del tabaco

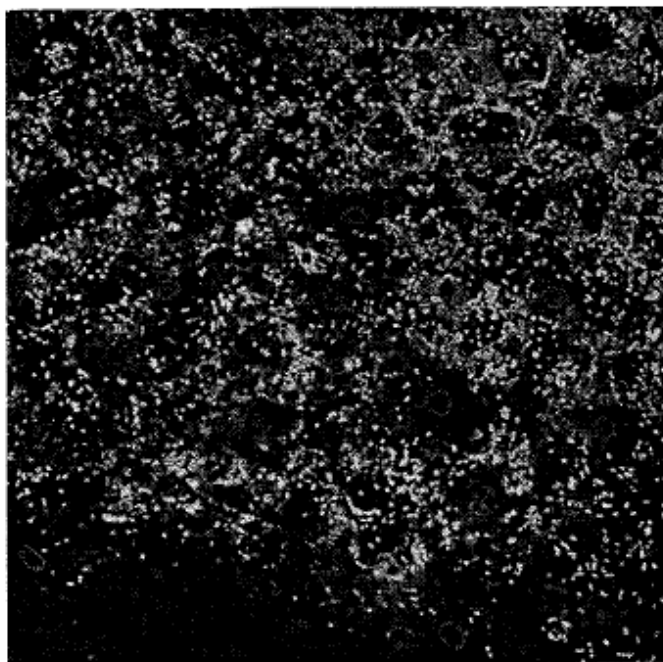


FIG. 6

Las referencias de YFP no dirigidas que se infiltraron en tejido de la hoja de tabaco no se incorporaron en los cloroplastos en tejido de la hoja de tabaco

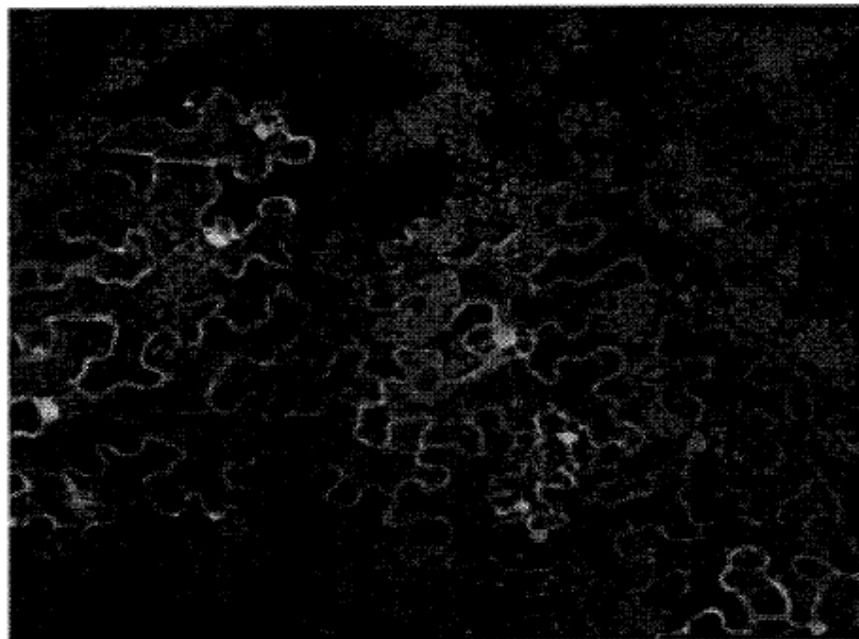


FIG. 7

Cartografía plasmídica de pDAB106597

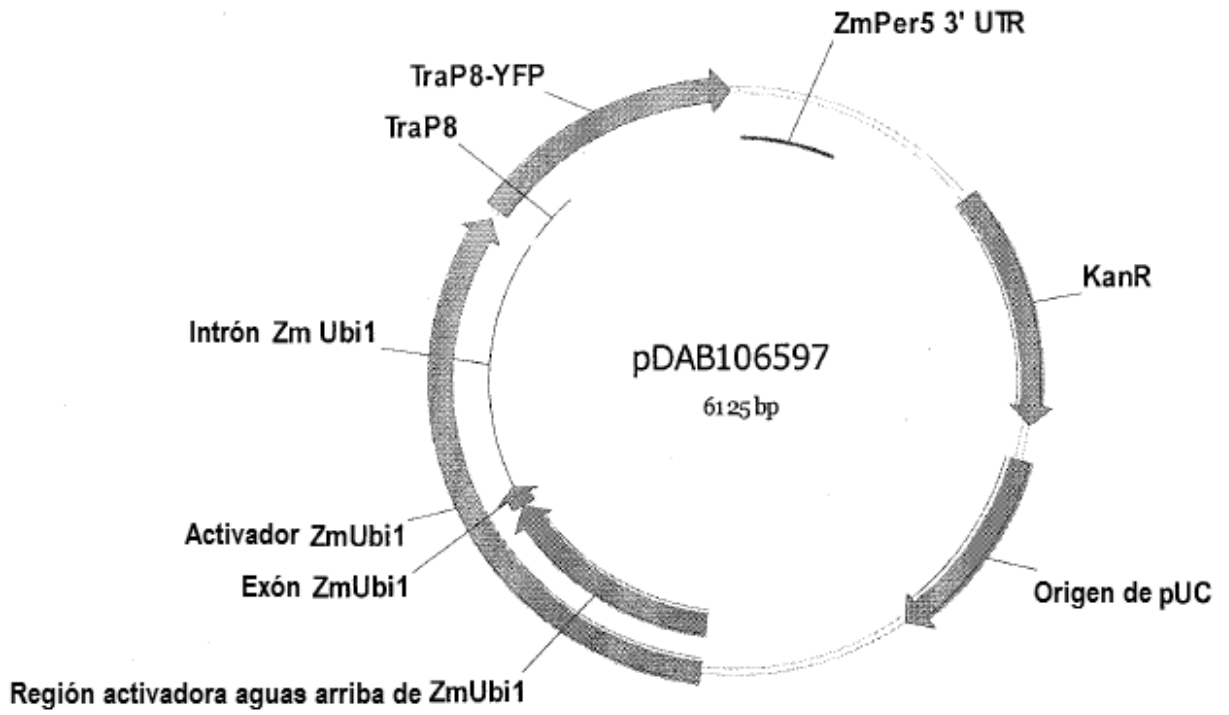


FIG. 8

TraP8-YFP transformado en los protoplastos de maíz se desplazó en los cloroplastos del protoplasto del maíz

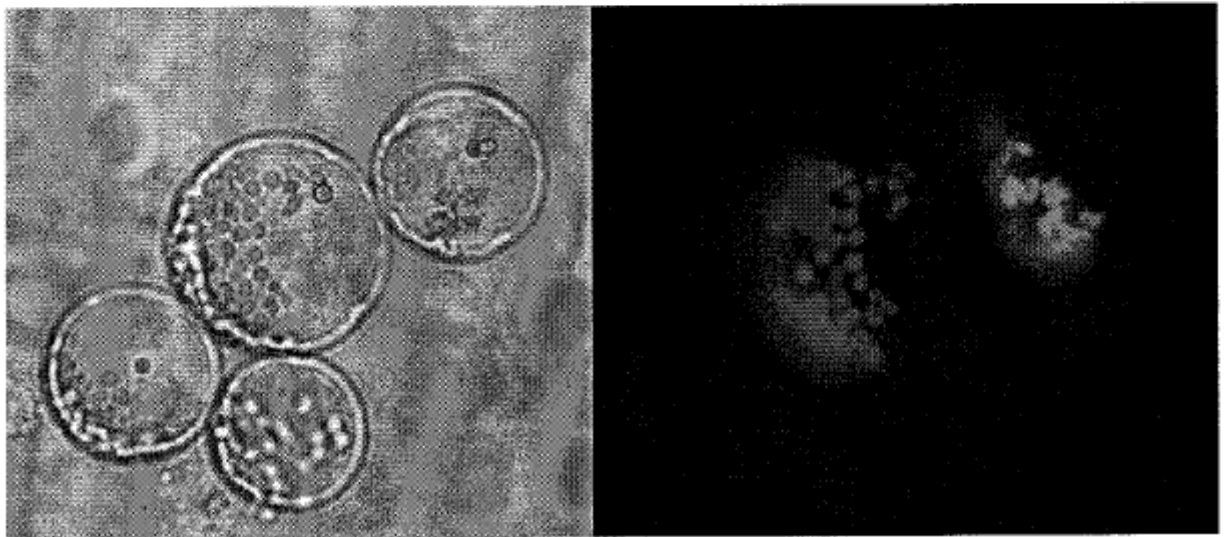


FIG. 9

Cartografía plasmídica de pDAB105526

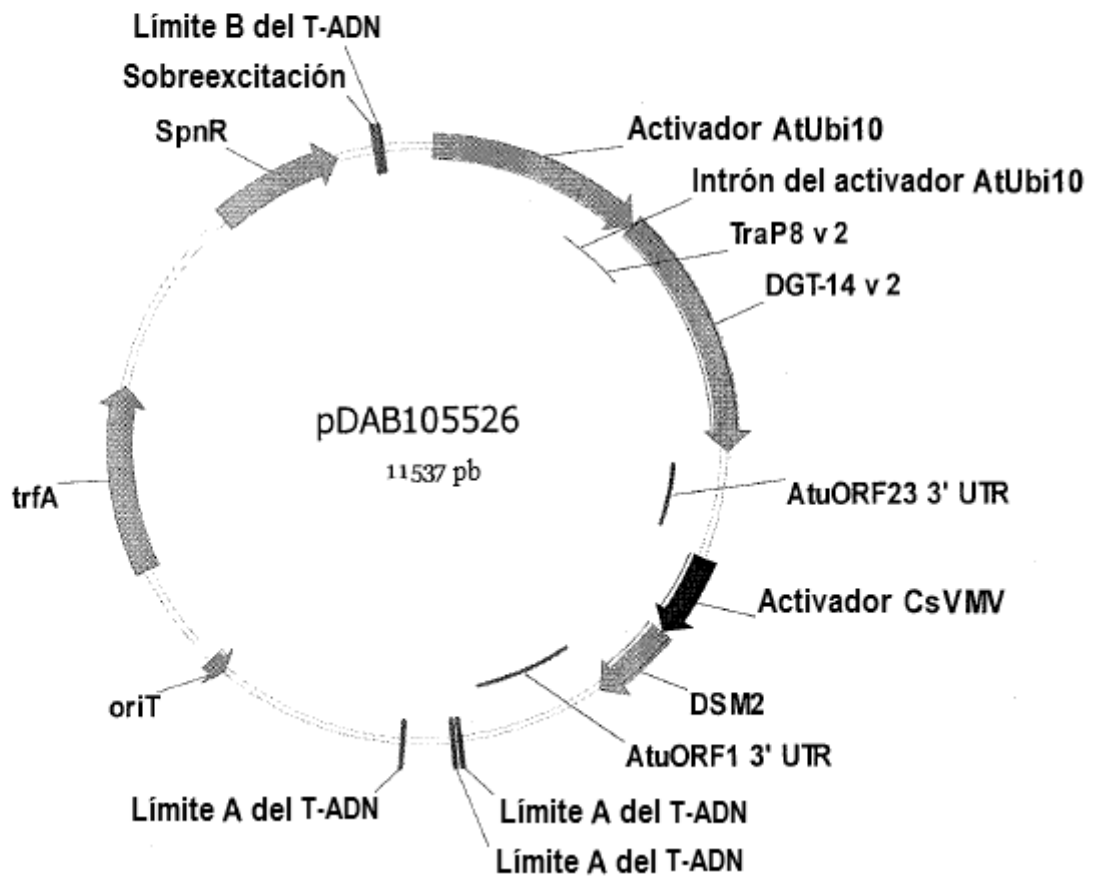


FIG. 10

Cartografía plasmídica de pDAB105527

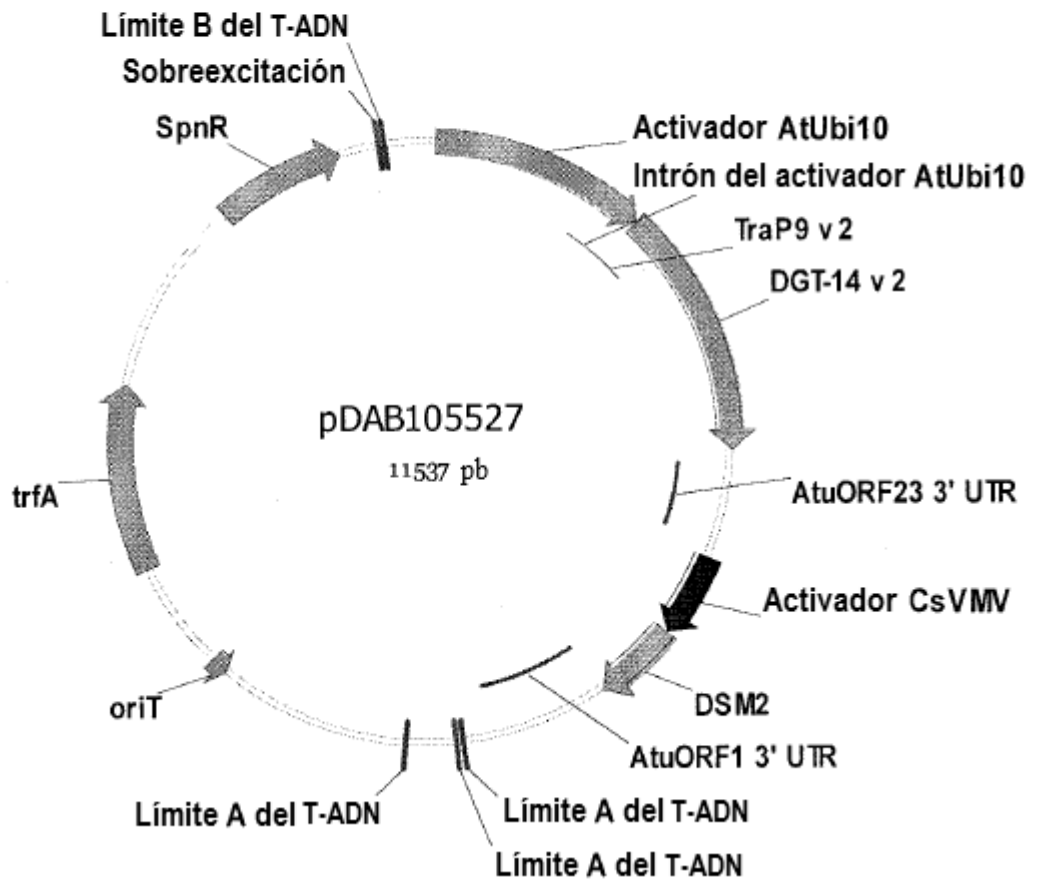


FIG. 11

Cartografía plasmídica de pDAB109807

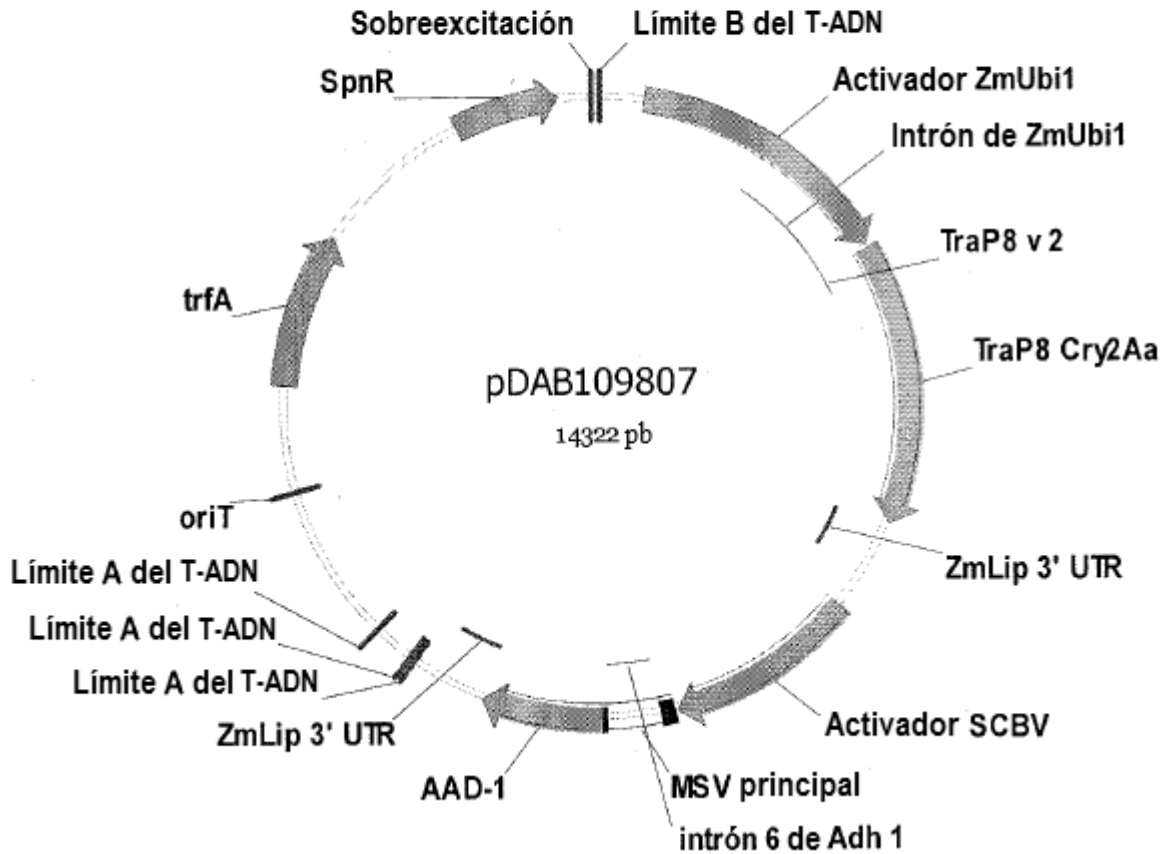


FIG. 12

Cartografía plasmídica de pDAB107687

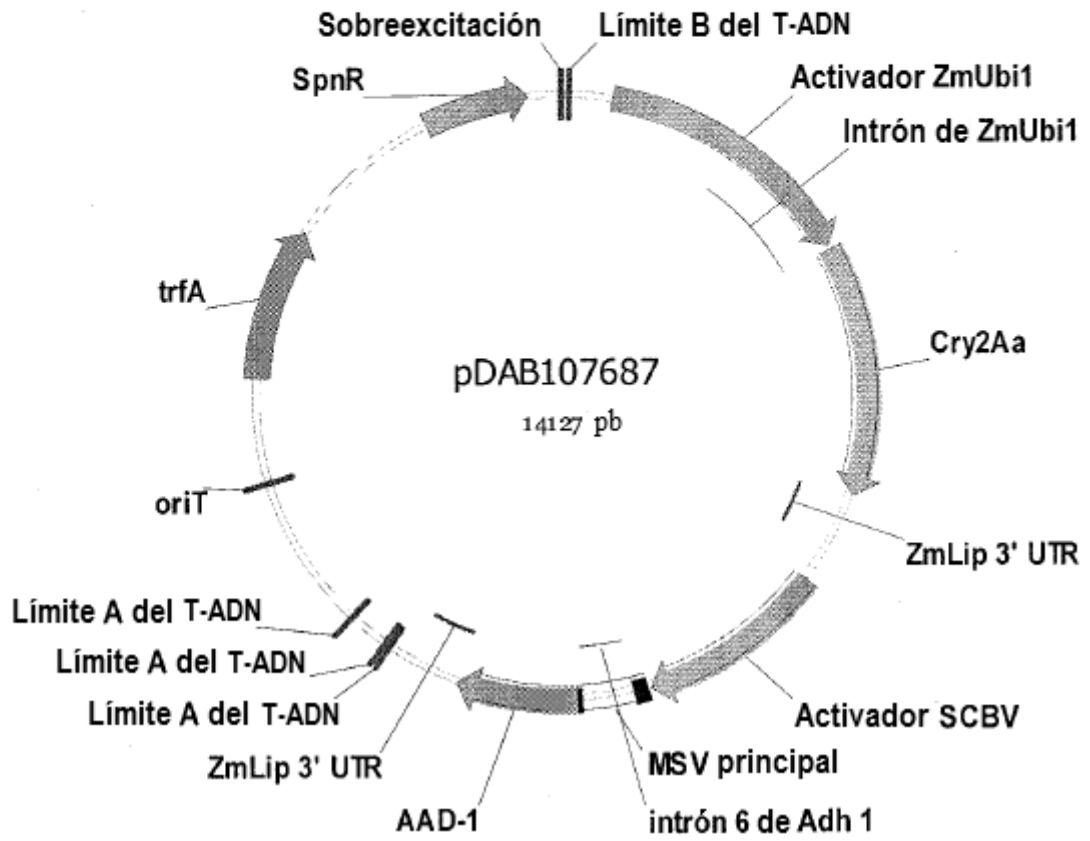


FIG. 13

Cartografía plasmídica de pDAB111481

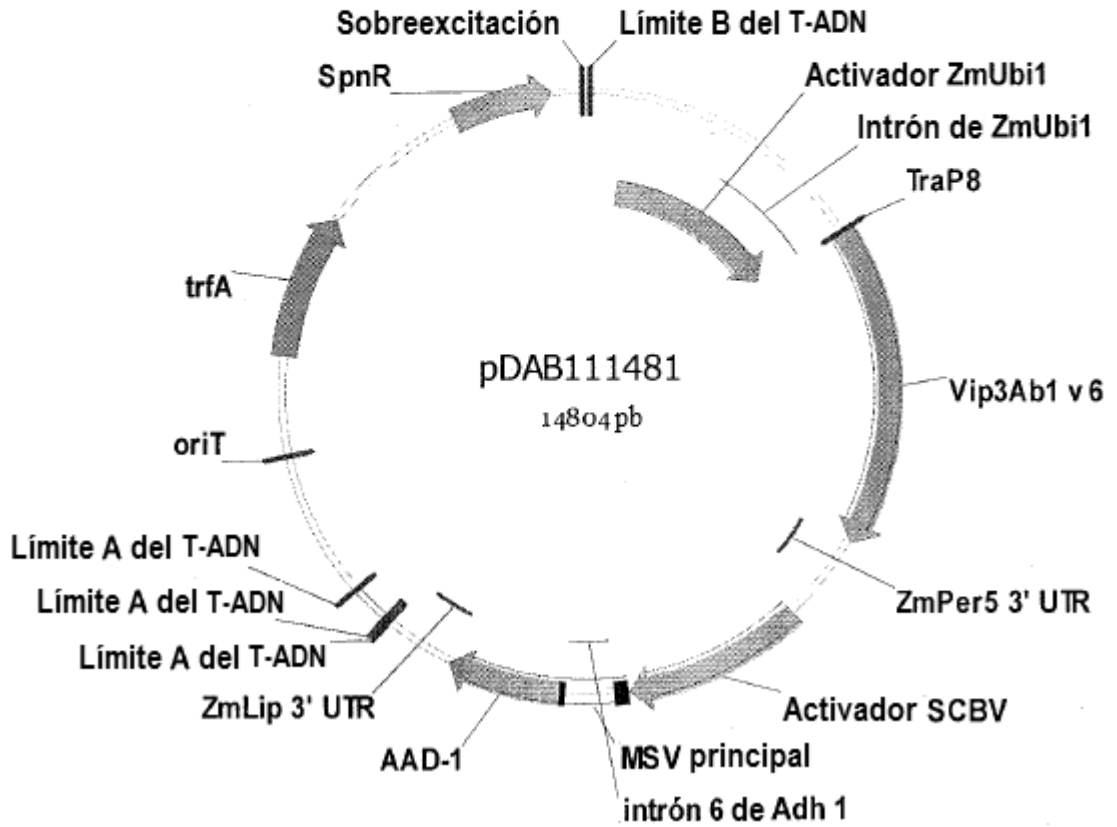


FIG. 14

Cartografía plasmídica de pDAB111479

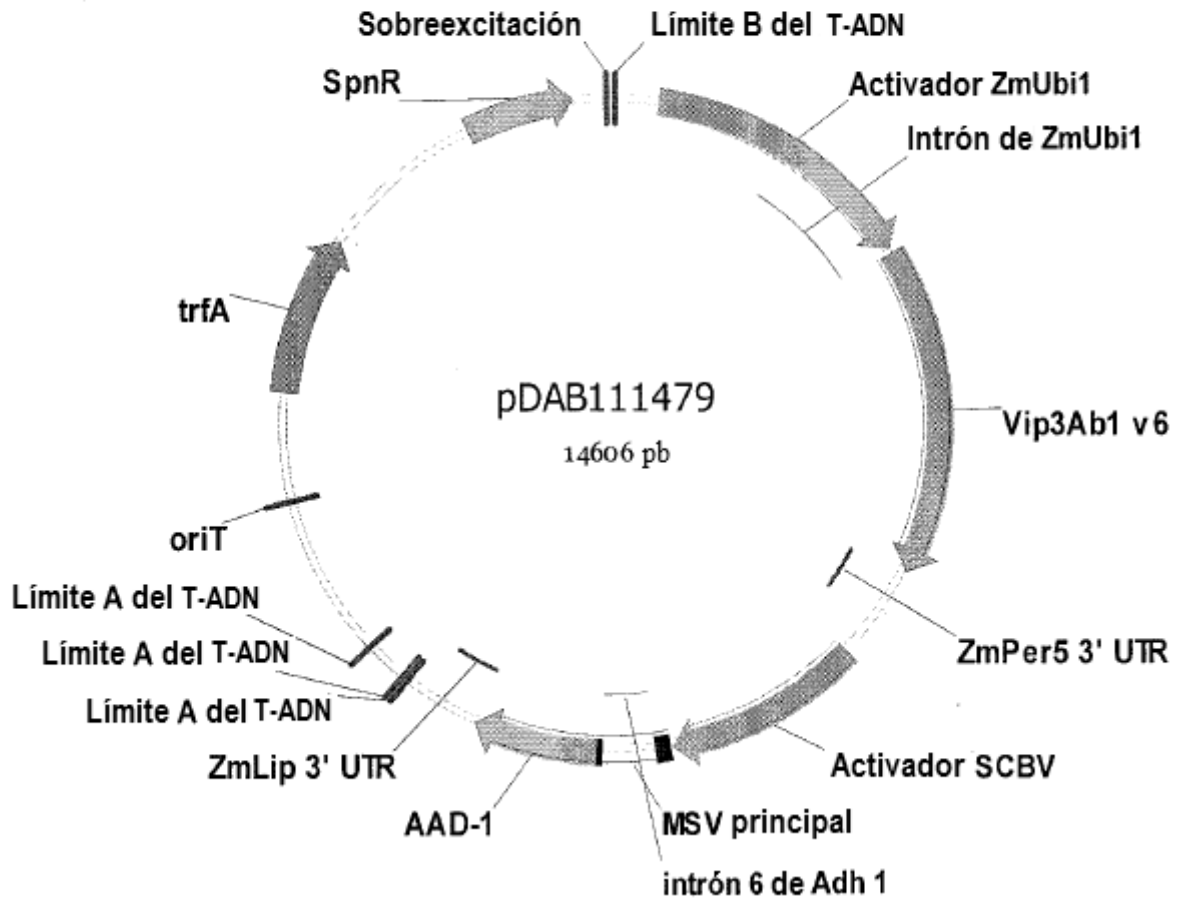


FIG. 15

Cartografía plasmídica de pDAB111338

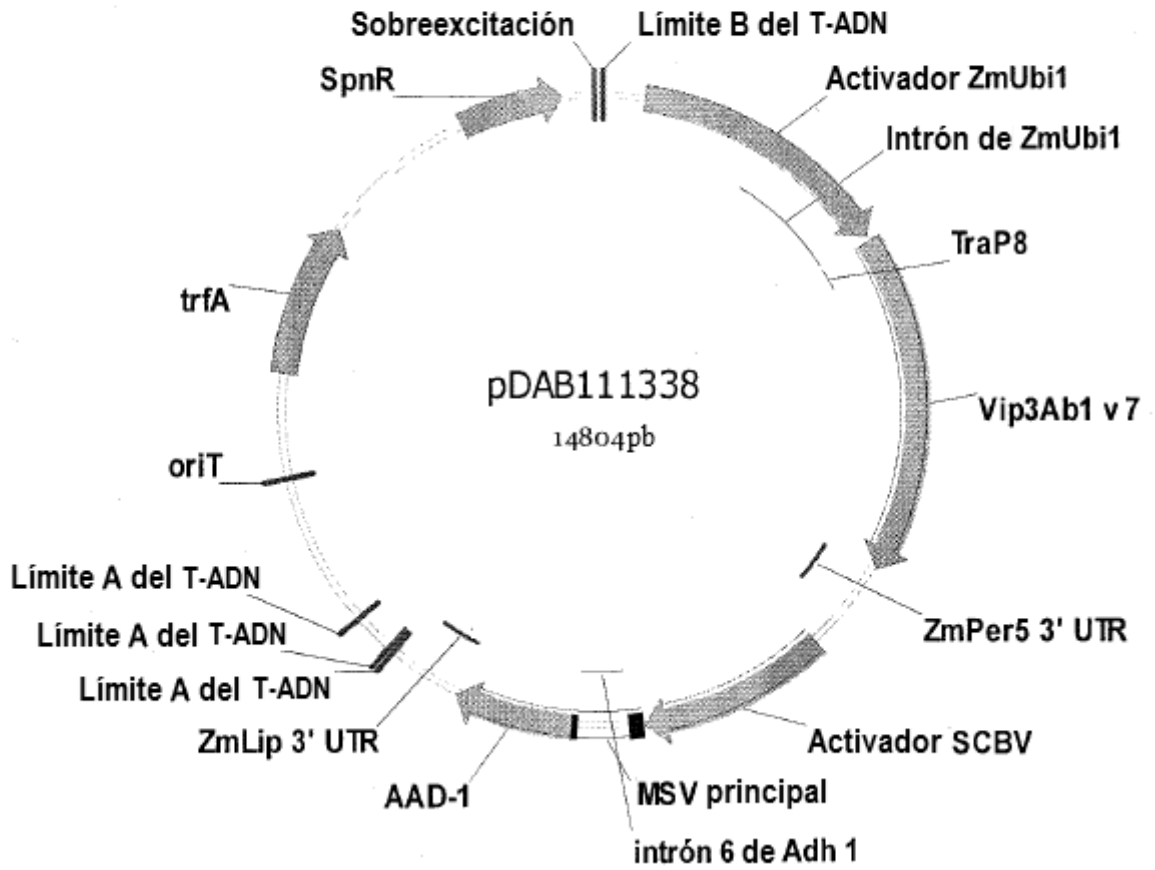


FIG. 16

Cartografía plasmídica de pDAB112710

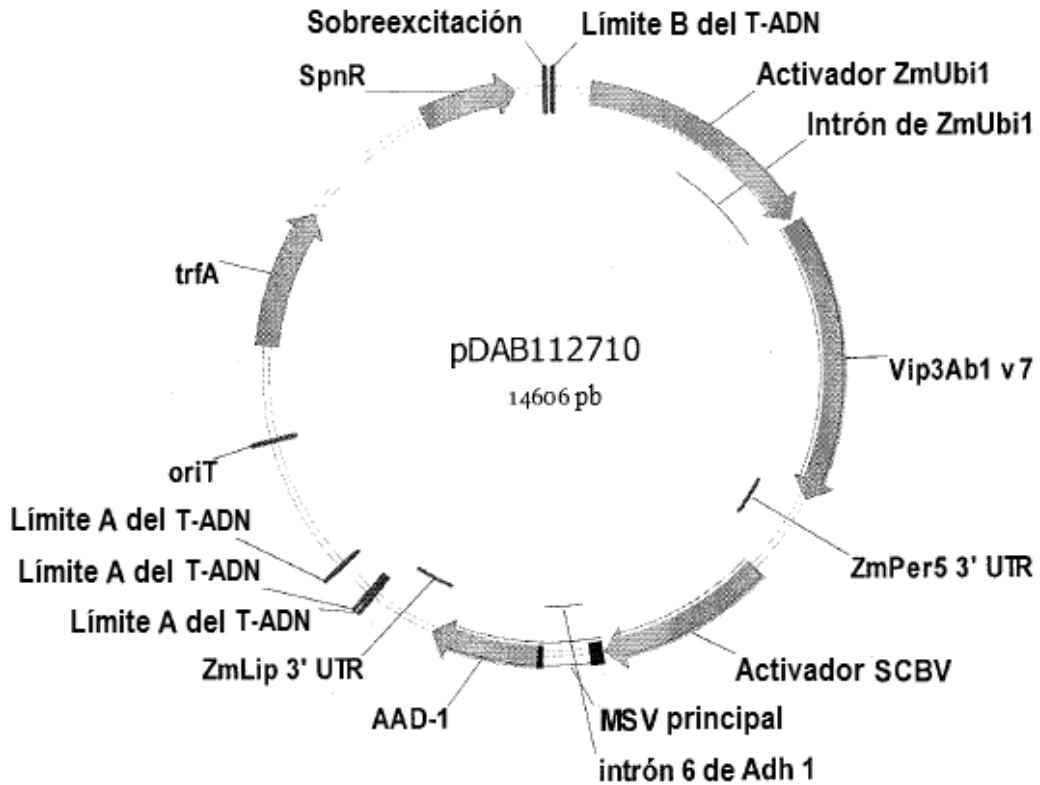


FIG. 17

Alineación de los péptidos de tránsito al cloroplasto previstos para la proteína EPSPS de *Brassica napus* (SEQ ID n°: 1) y *Brassica rapa* (SEQ ID n°: 2). El asterisco indica donde se soltaron y recombinaron las secuencias para formar TraP8 y TraP9.

		1		*	40
<i>Brassica napus</i> (SEQ ID NO:1)	(1)	MAOSSRICHGVQNPCVLIISNLSKSNQNKSPFSVSL-KTHQP			
<i>Brassica rapa</i> (SEQ ID NO:2)	(1)	MAQASRICO---NPCVIS-NLPKSNHRKSPFSVSL-KTHQQ			
		41			74
<i>Brassica napus</i> (SEQ ID NO:1)	(41)	R-----ASSWGLKKS GMTLNGSVIRPVKVTASVS			
<i>Brassica rapa</i> (SEQ ID NO:2)	(37)	QRRAYQISSWGLKKS--N-NGSVIREPVK-----			

FIG. 18

Cartografía plasmídica de pDAB107527

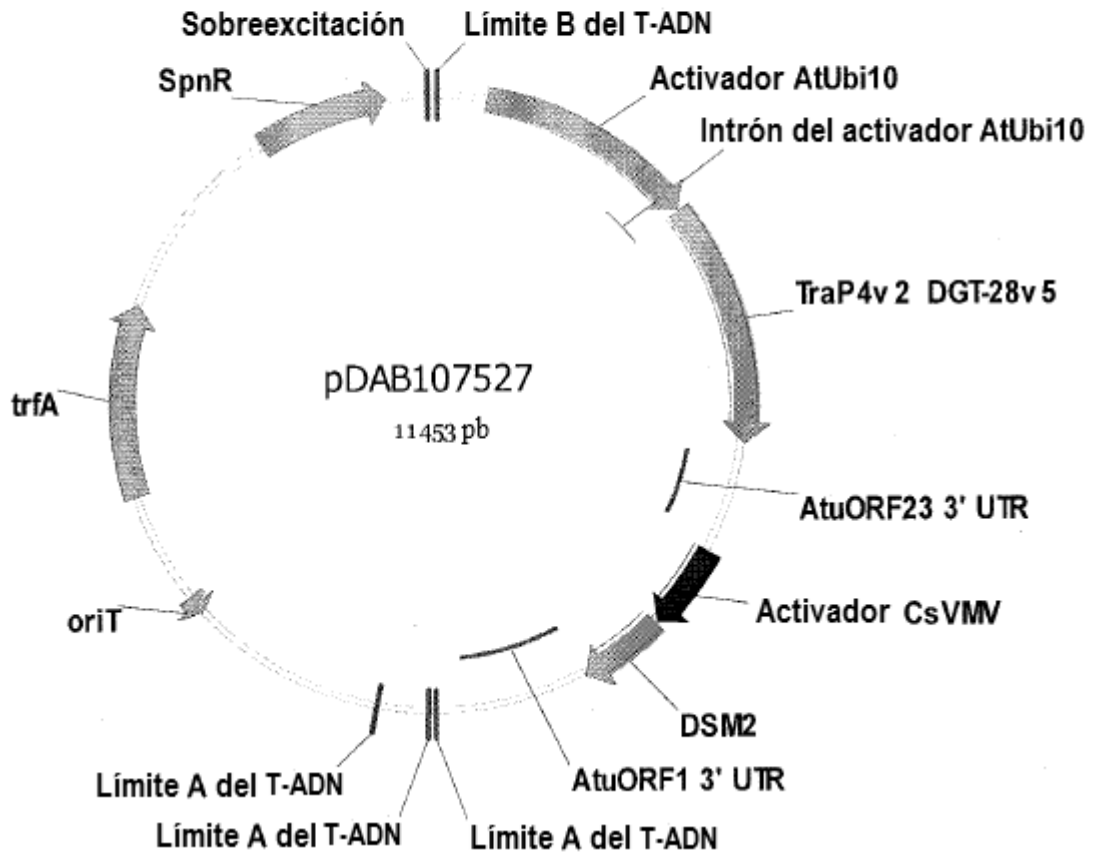


FIG. 19

Cartografía plasmídica de pDAB105530

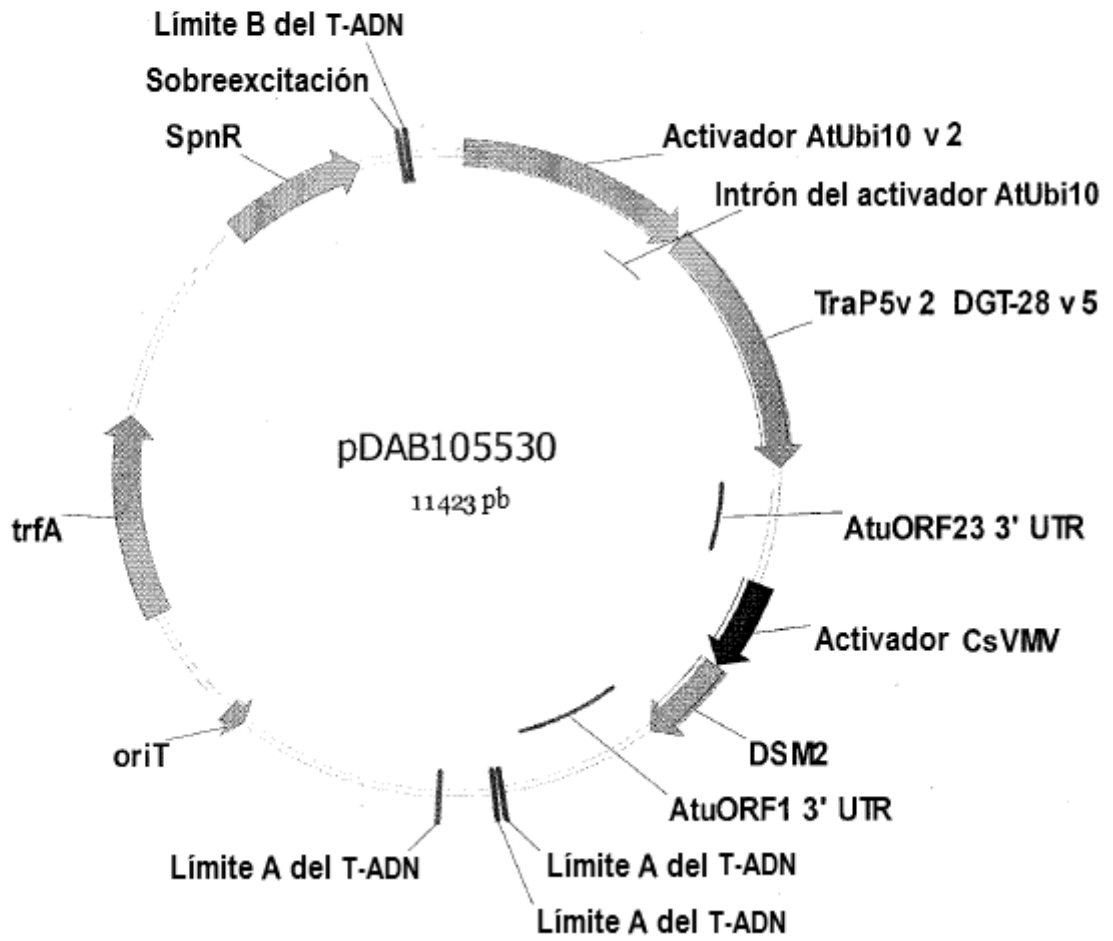


FIG. 20

Cartografía plasmídica de pDAB105531

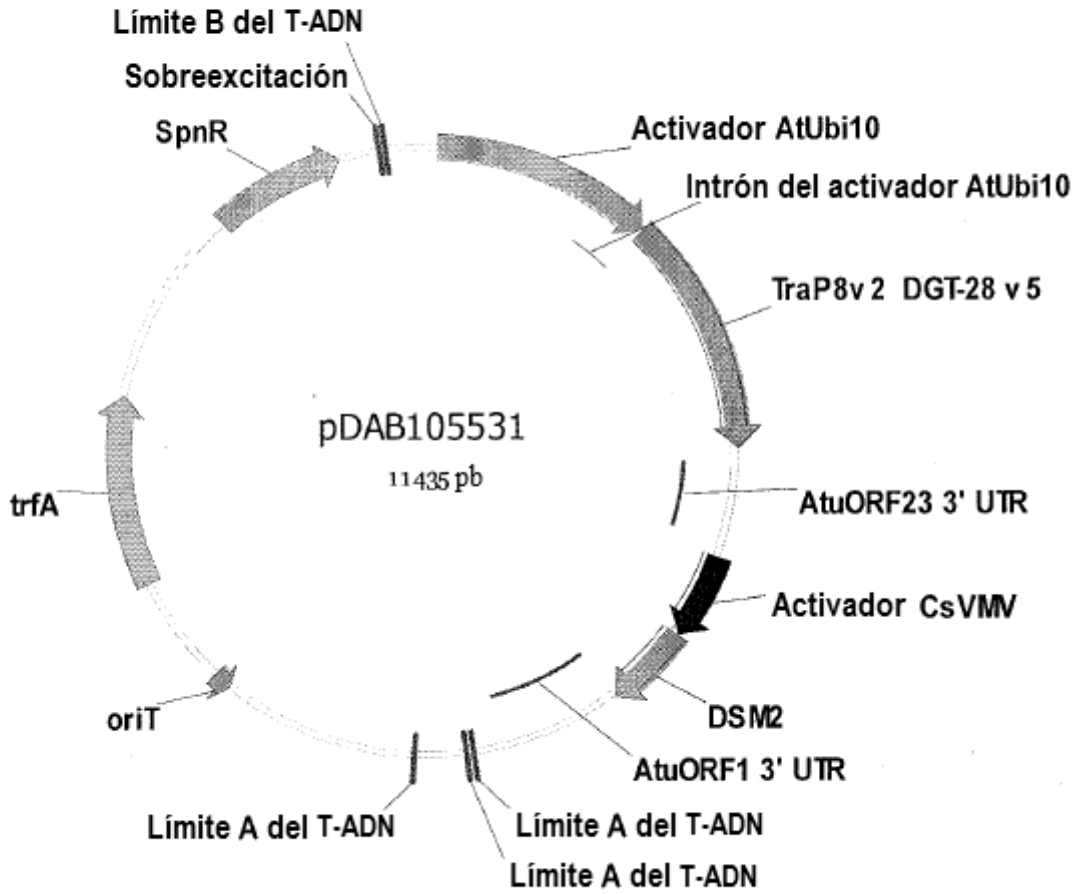


FIG. 21

Cartografía plasmídica de pDAB105532

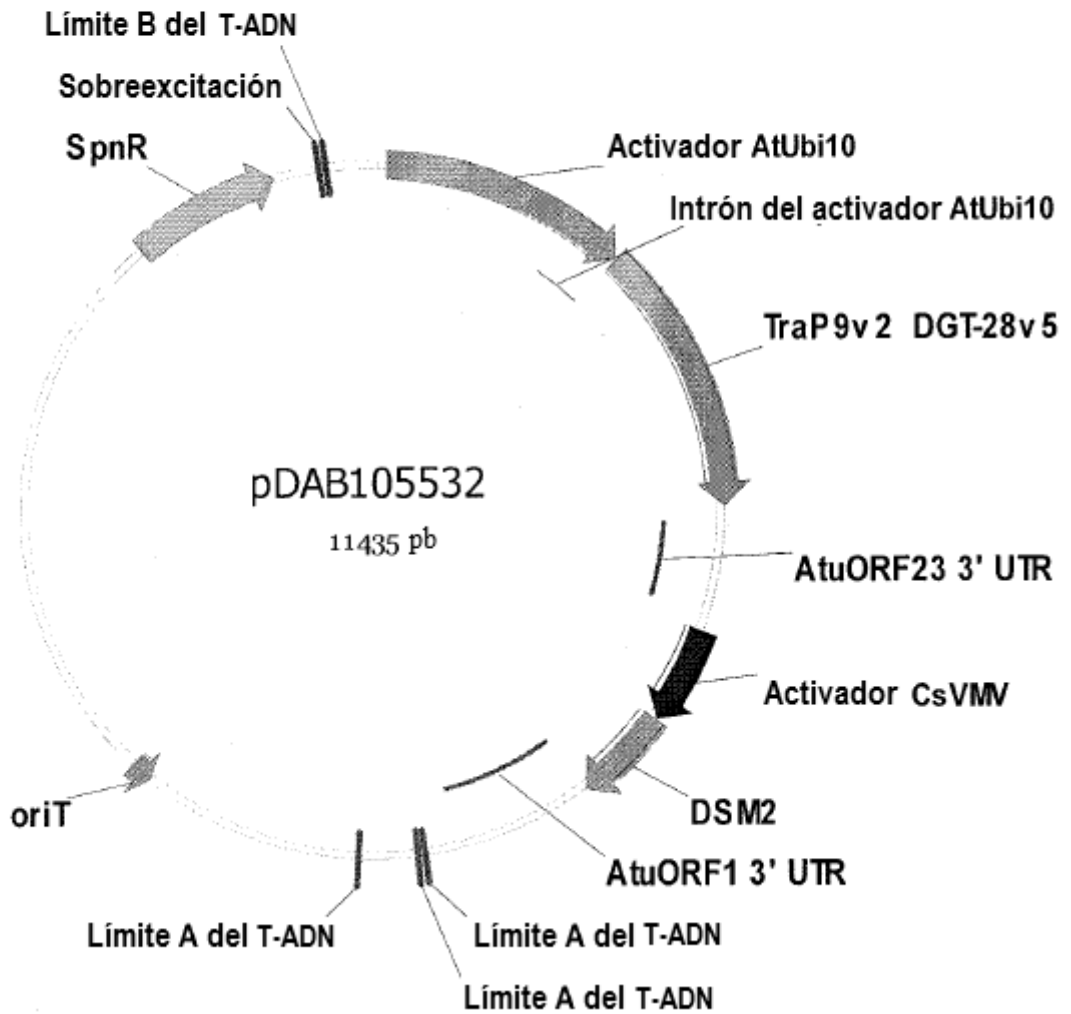


FIG. 22

Cartografía plasmídica de pDAB105533

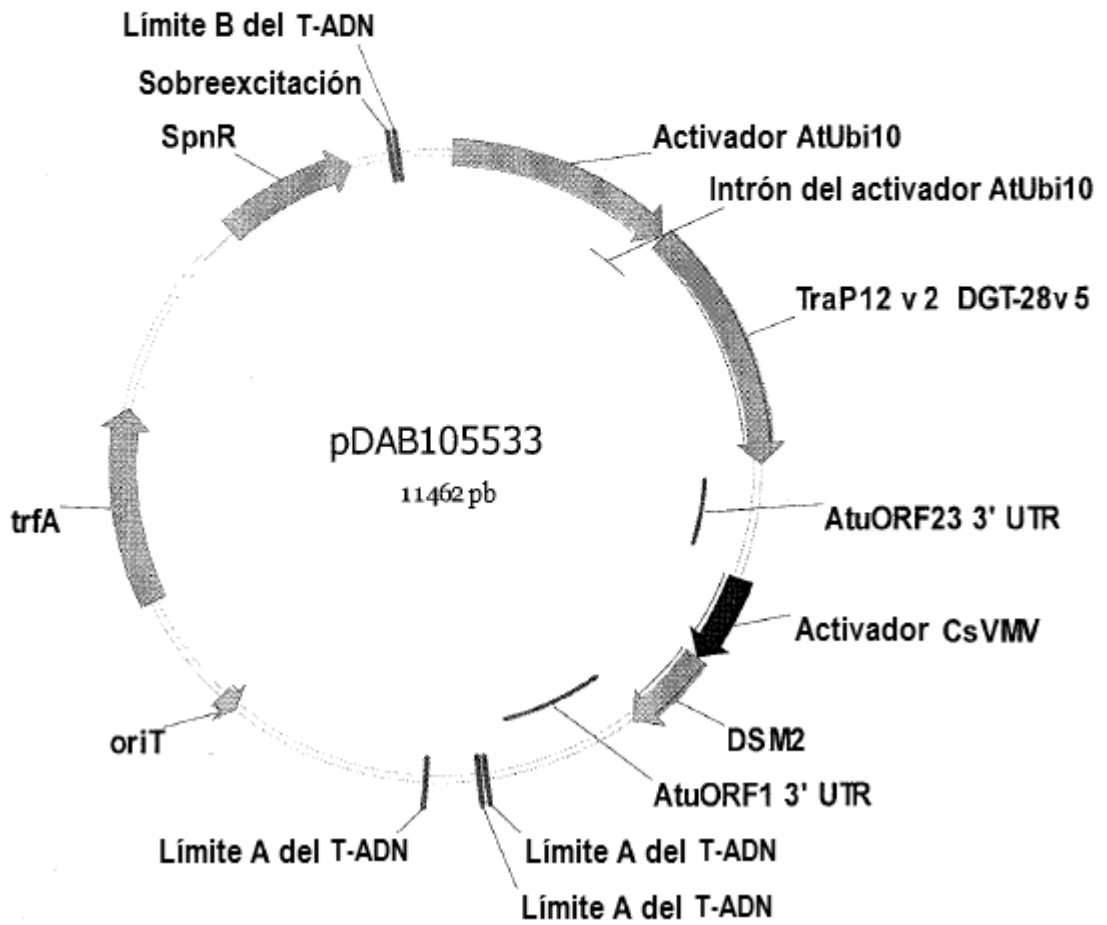


FIG. 23

Cartografía plasmídica de pDAB105534

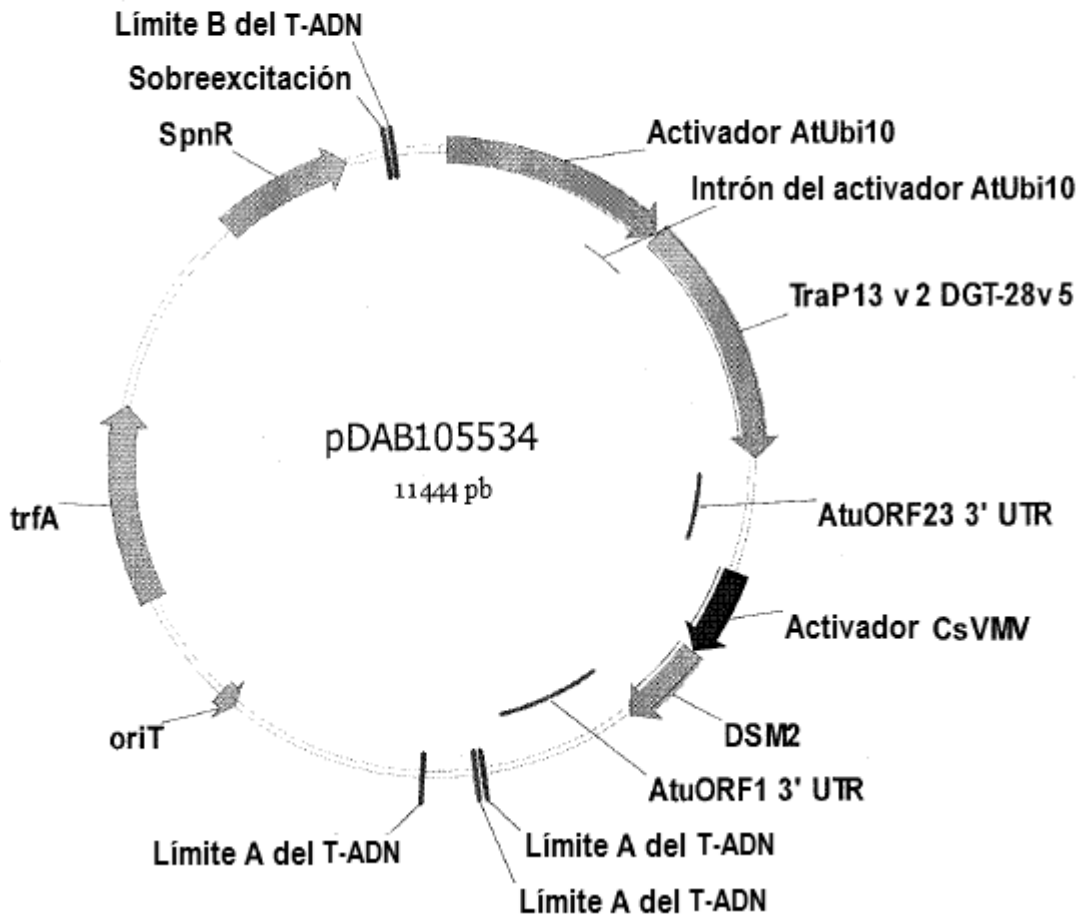


FIG. 24

Cartografía plasmídica de pDAB107532

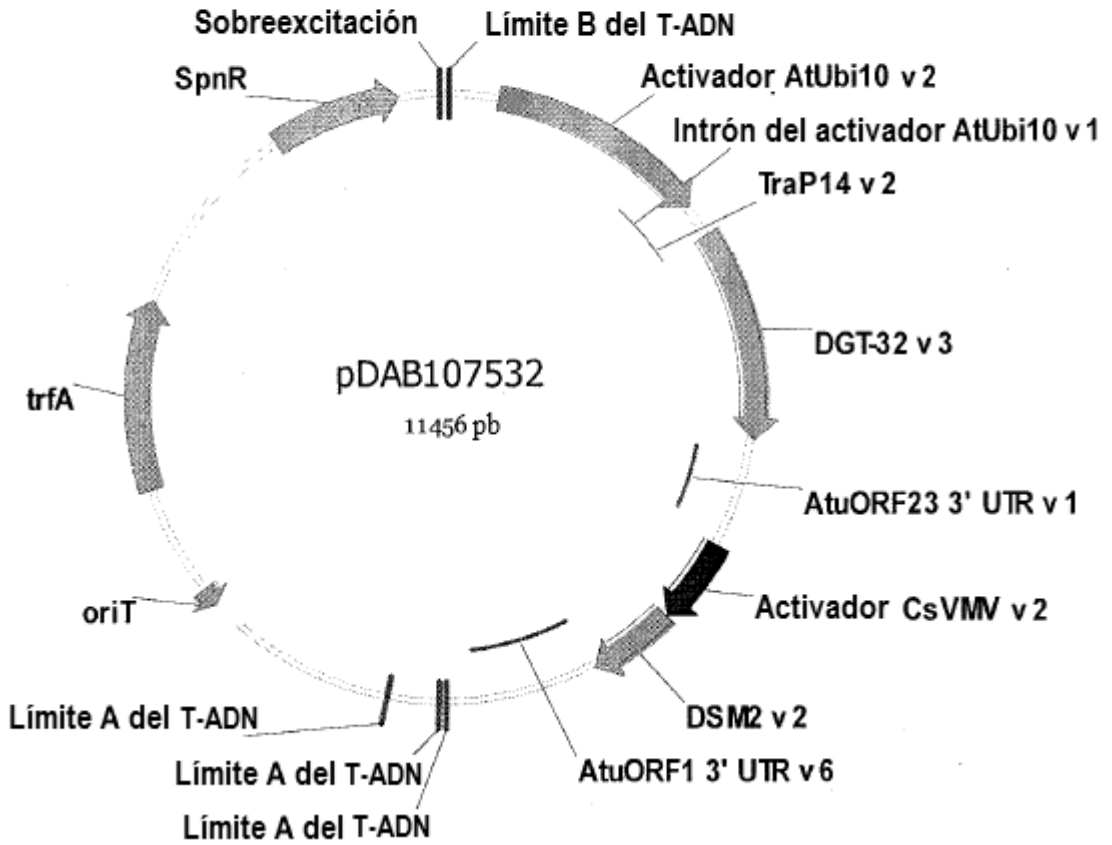


FIG. 25

Cartografía plasmídica de pDAB107534

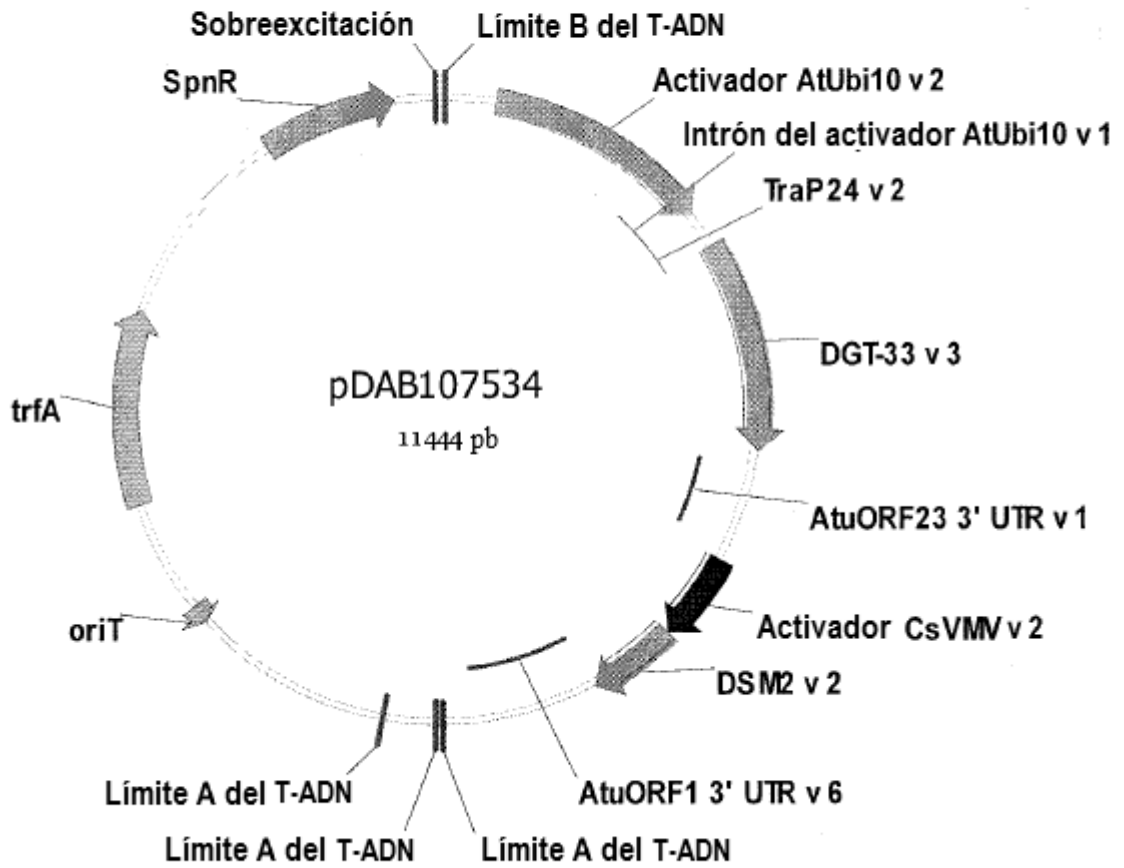


FIG. 26

Cartografía plasmídica de pDAB107533

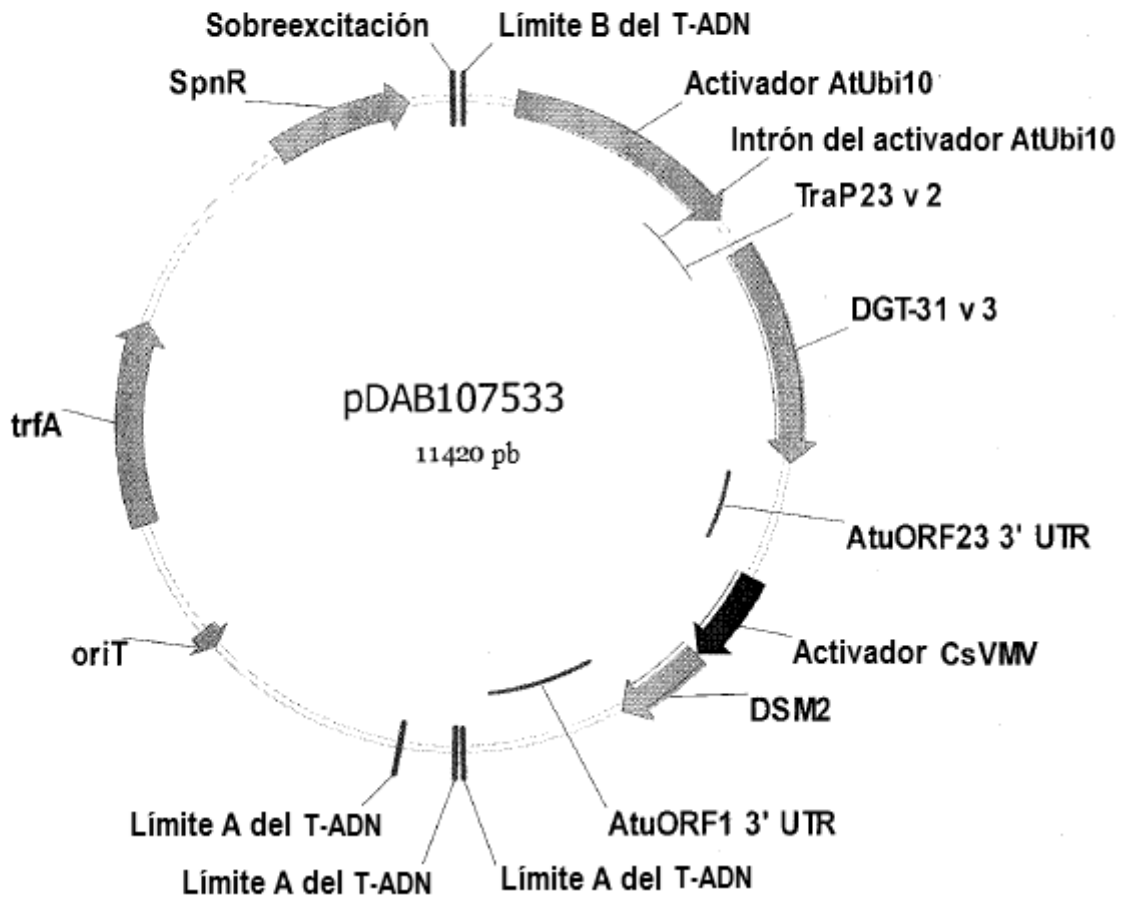


FIG. 27

Cartografía plasmídica de pDAB4104

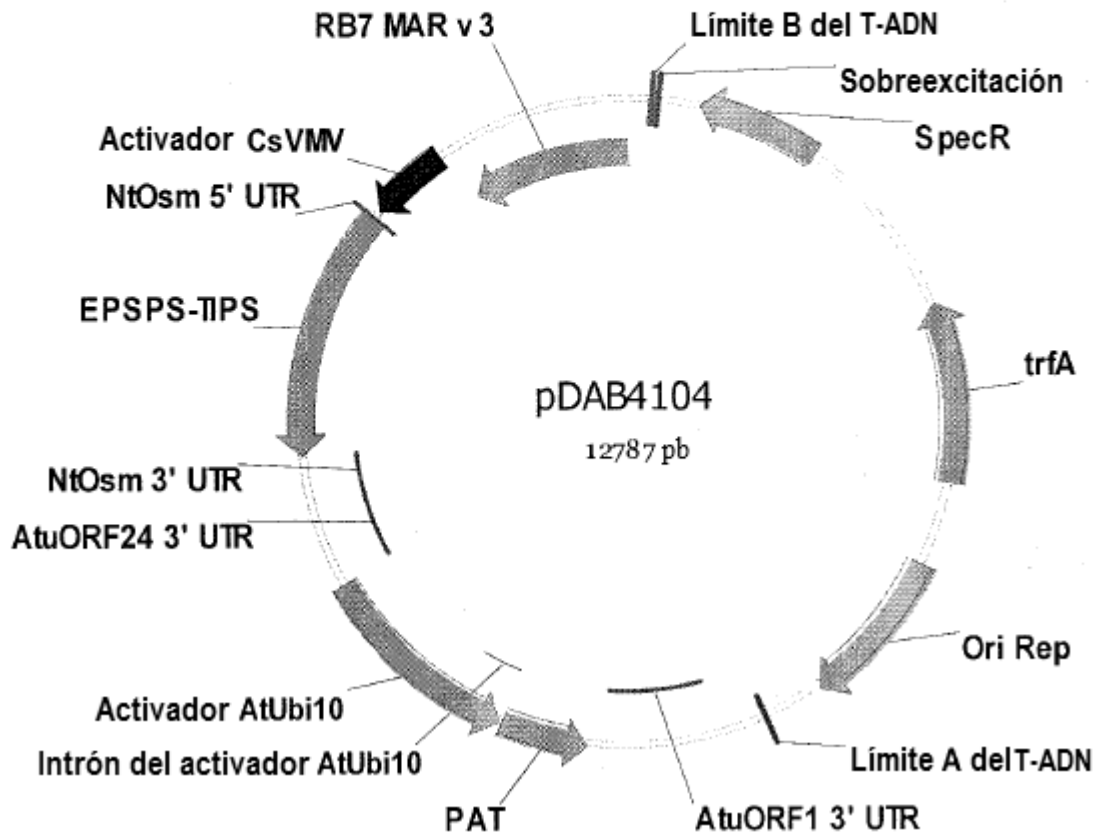


FIG. 28

Cartografía plasmídica de pDAB102715

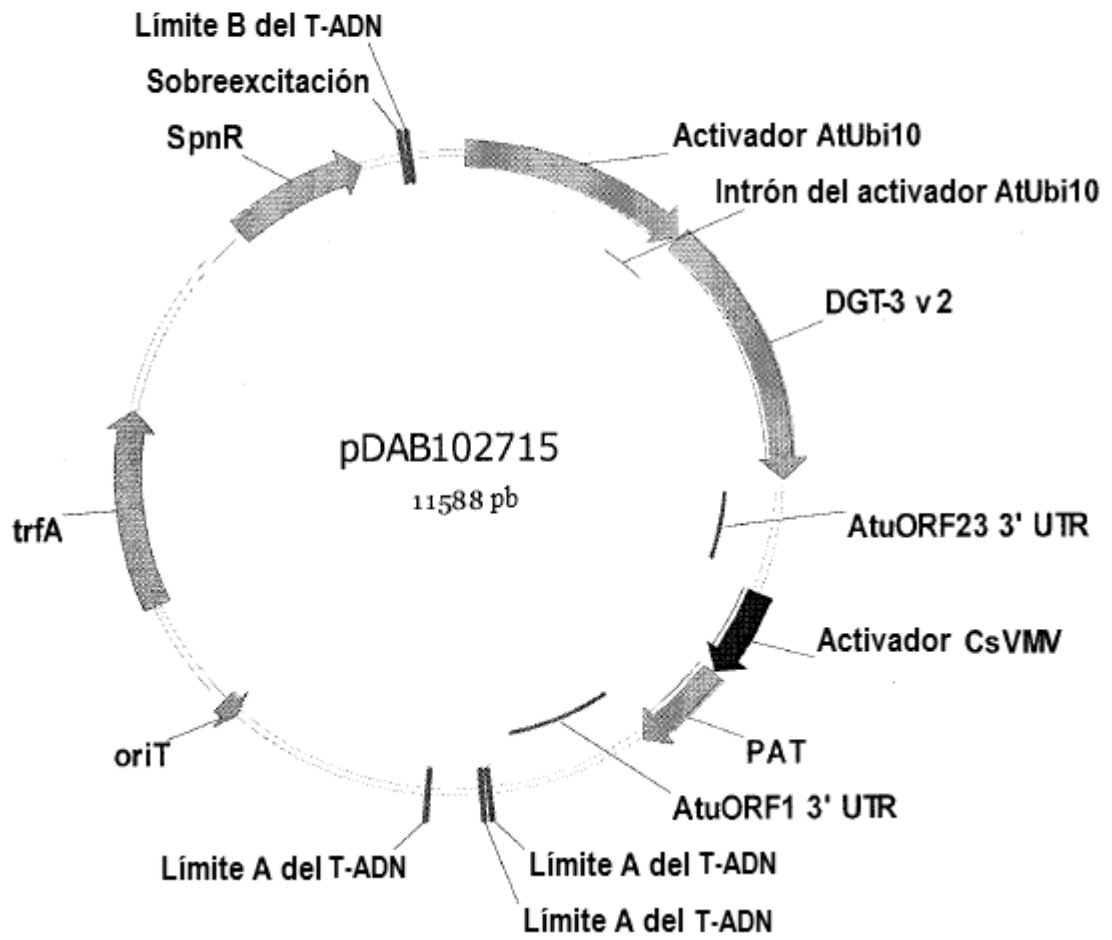


FIG. 29

Cartografía plasmídica de pDAB102716

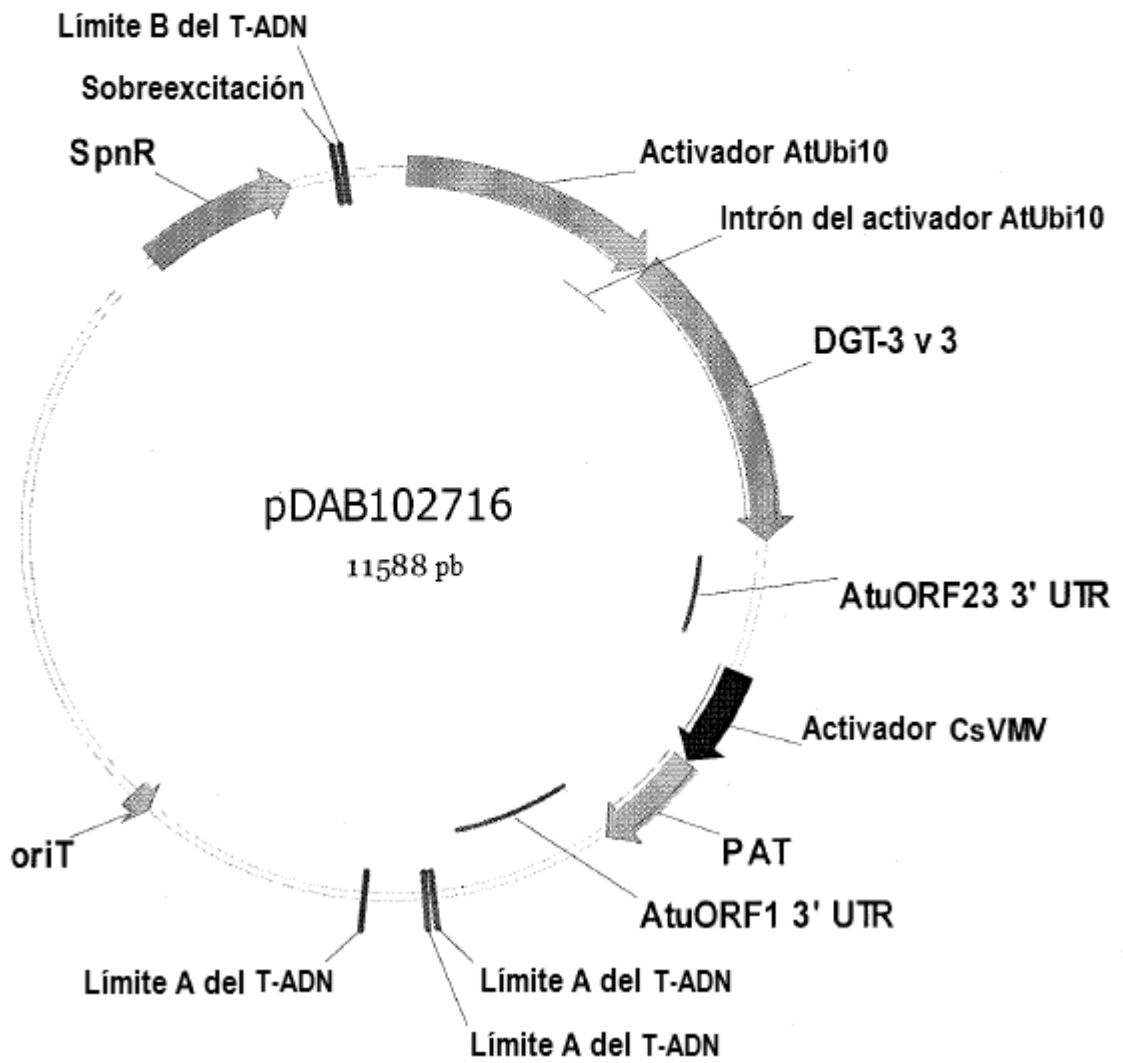


FIG. 30

Cartografía plasmídica de pDAB102717

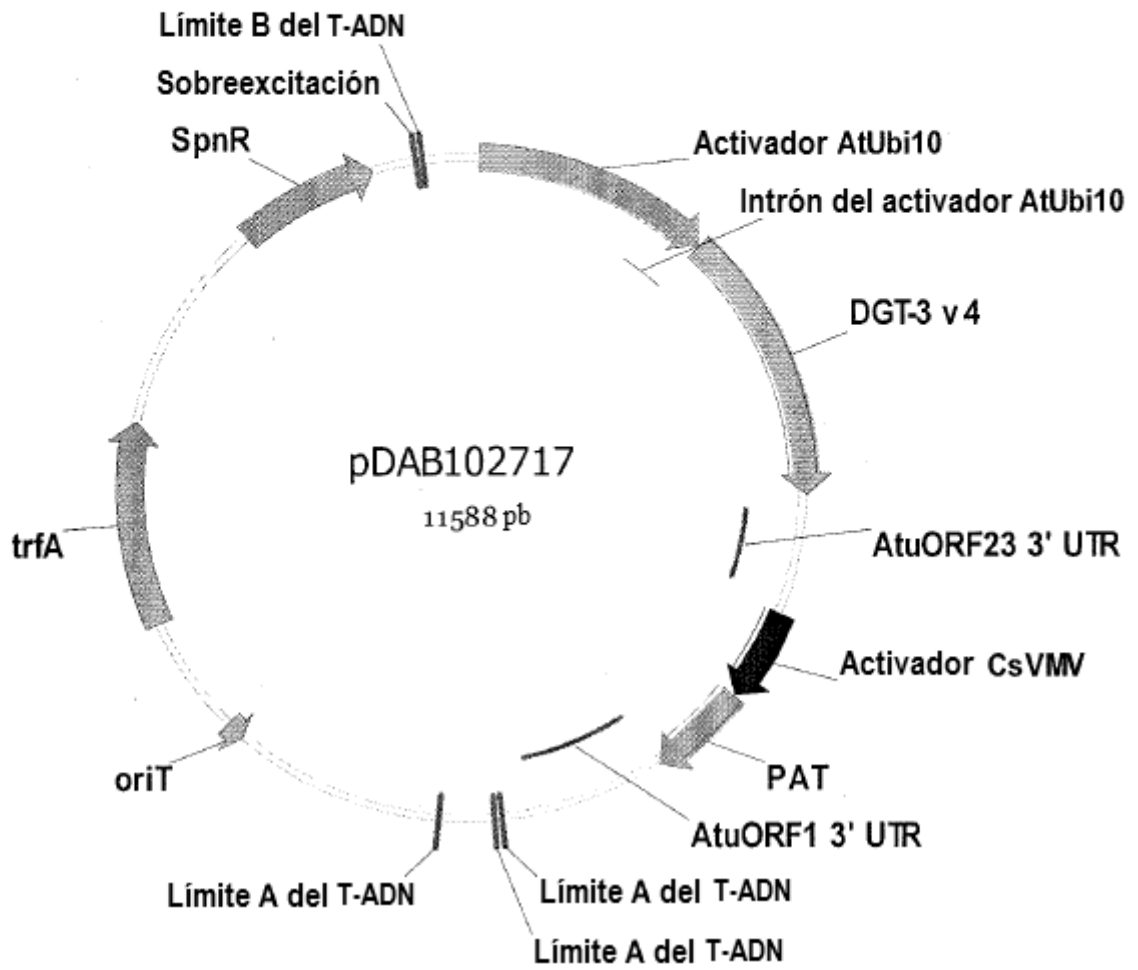


FIG. 31

Cartografía plasmídica de pDAB102785

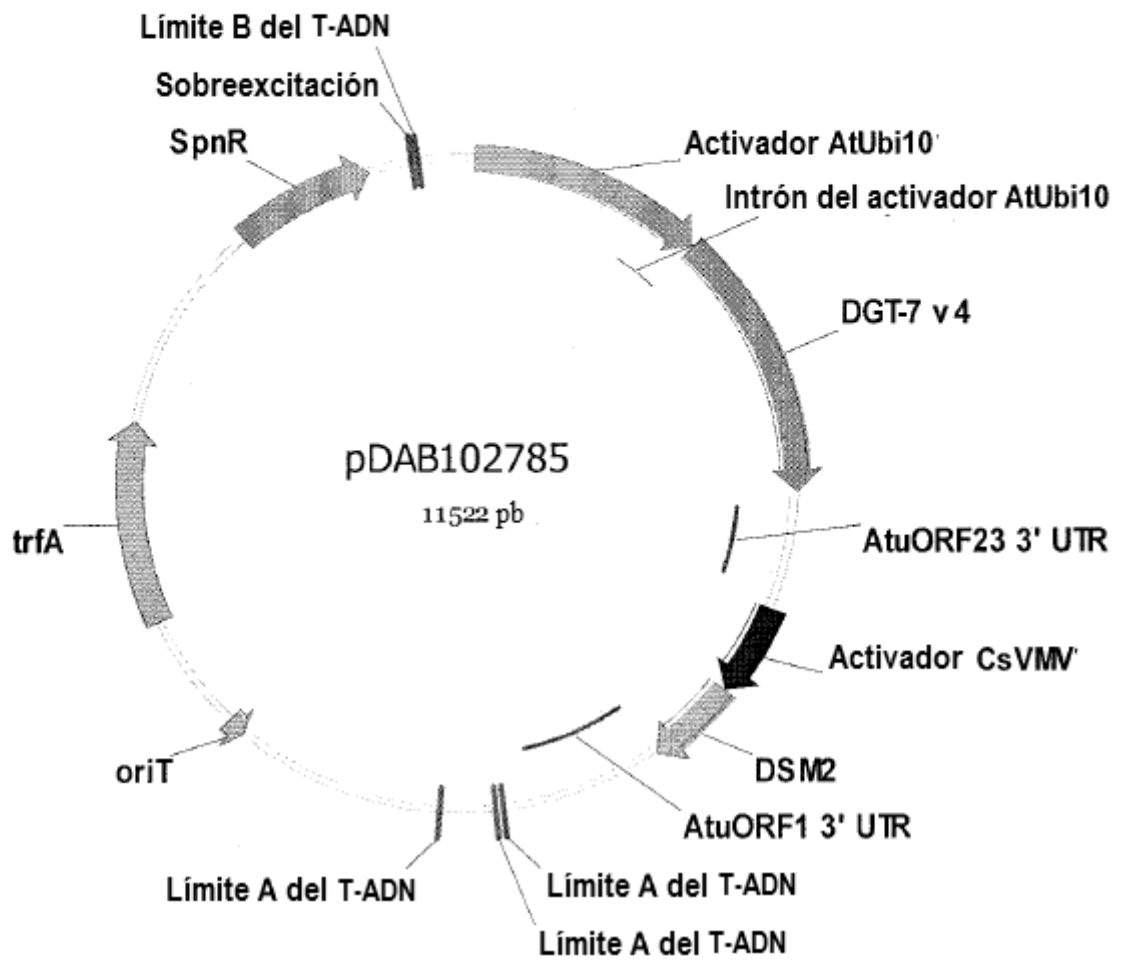


FIG. 32

Cartografía plasmídica de pDAB102719

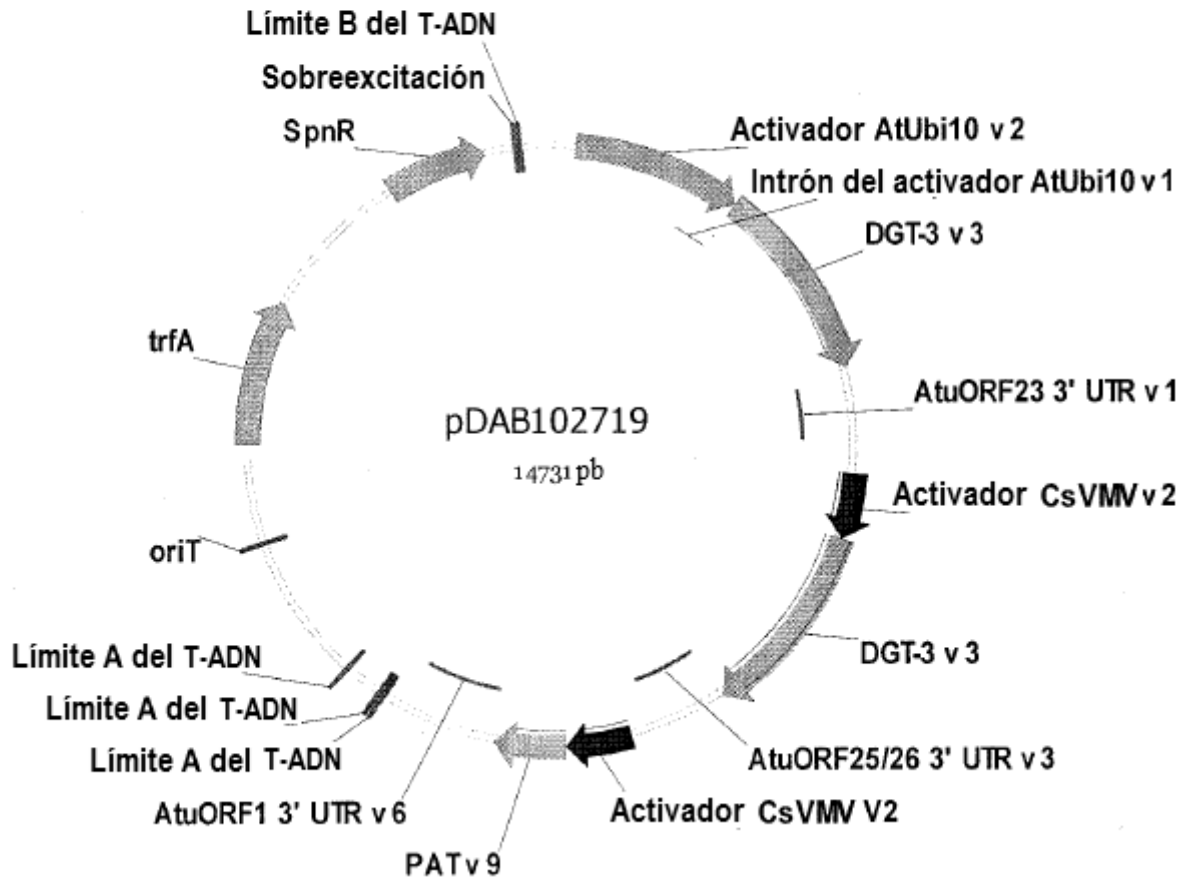


FIG. 33

Cartografía plasmídica de pDAB102718

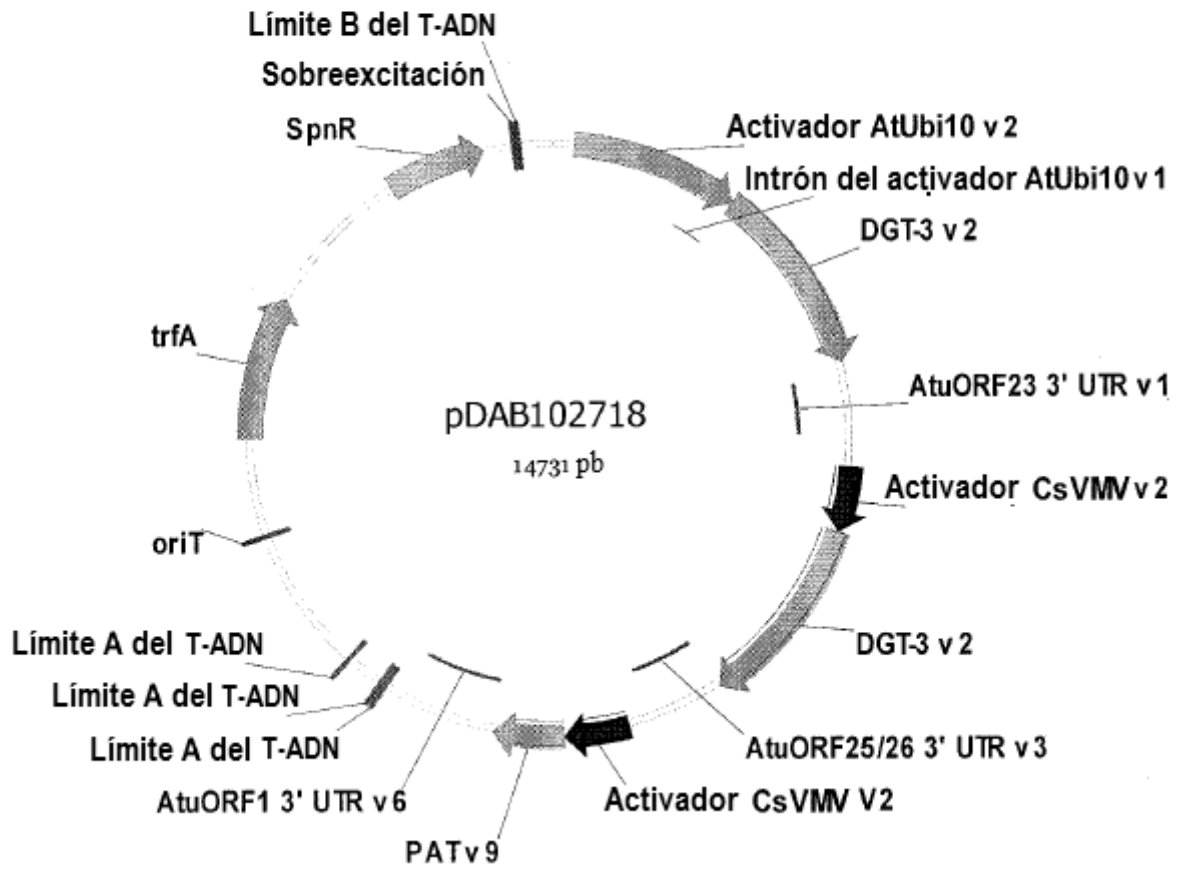


FIG. 34

Cartografía plasmídica de pDAB107663

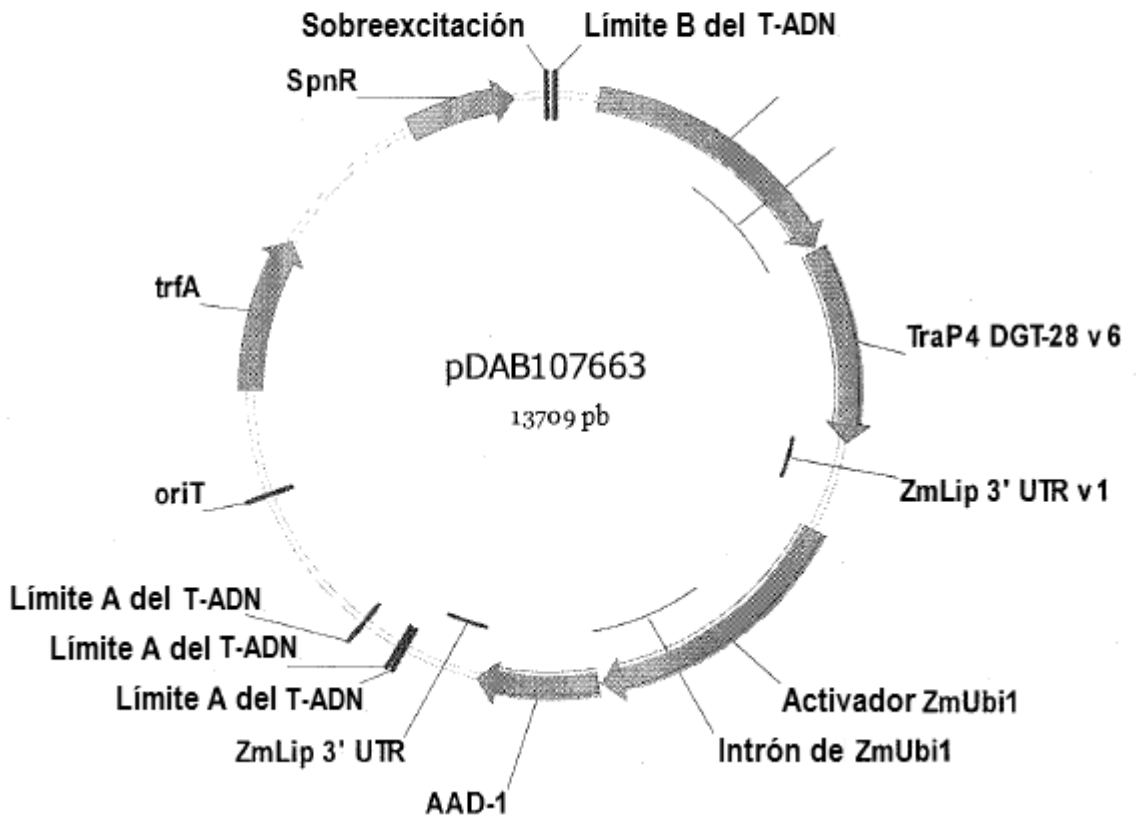


FIG. 35

Cartografía plasmídica de pDAB107664

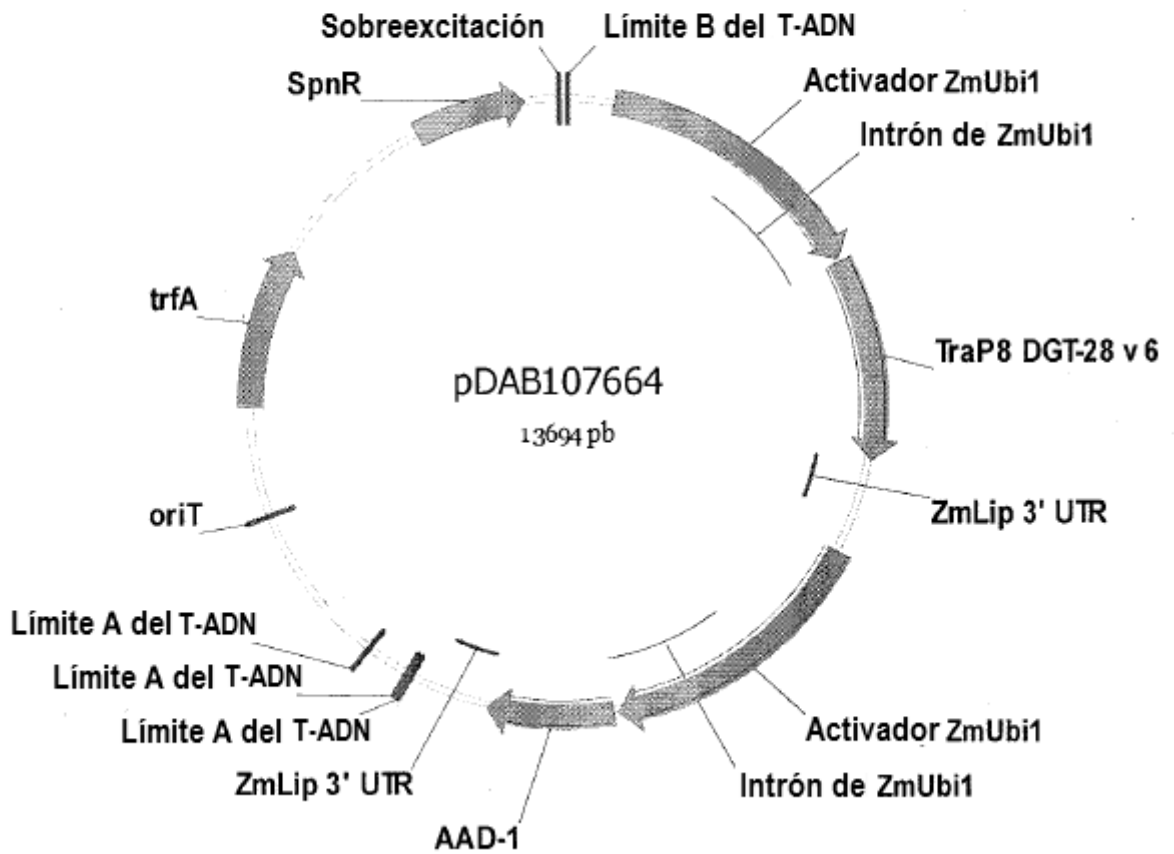


FIG. 36

Cartografía plasmídica de pDAB107665

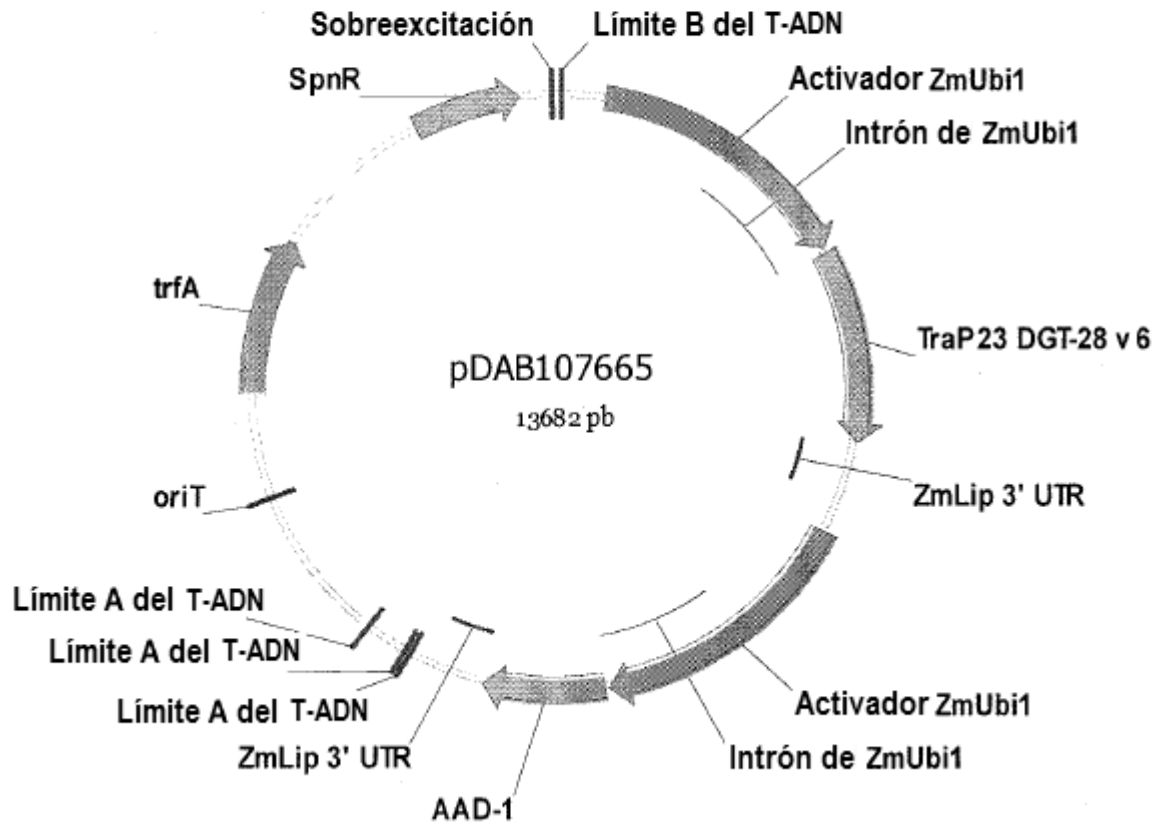


FIG. 37

Cartografía plasmídica de pDAB107666

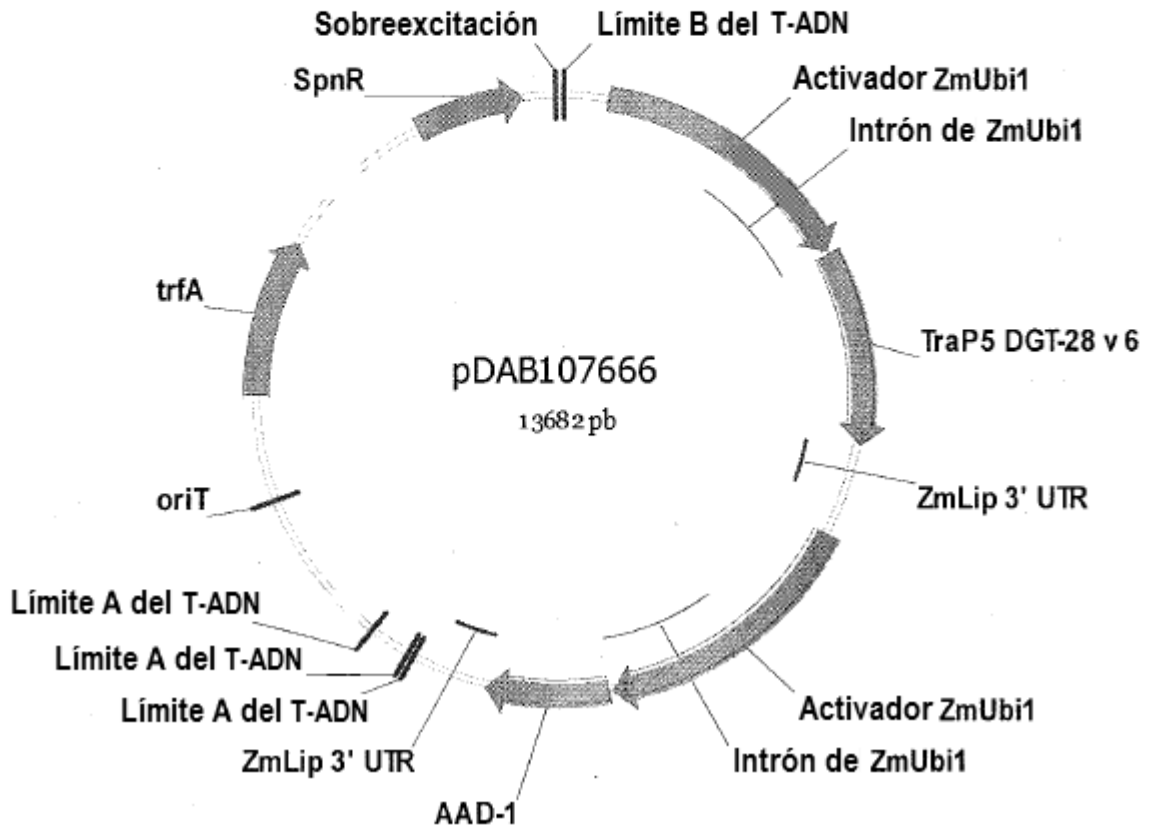


FIG. 38

Cartografía plasmídica de pDAB109812

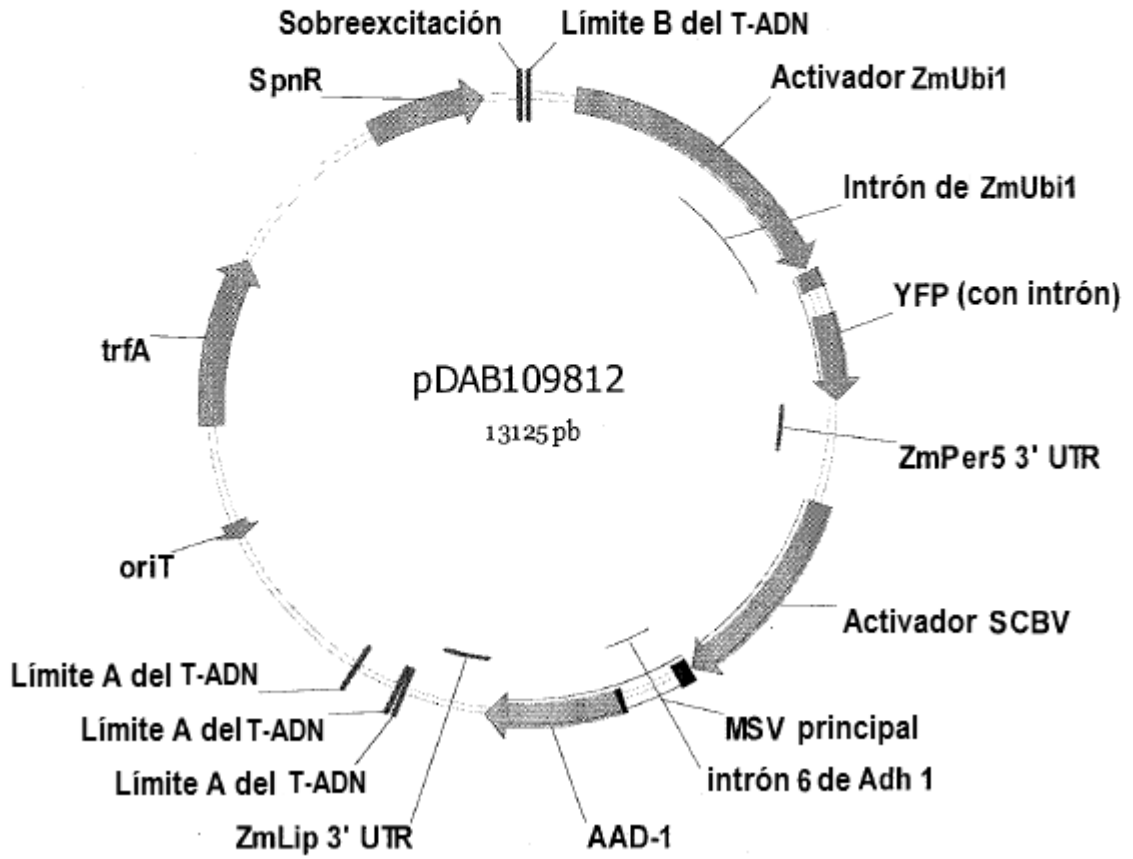


FIG. 39

Cartografía plasmídica de pDAB101556

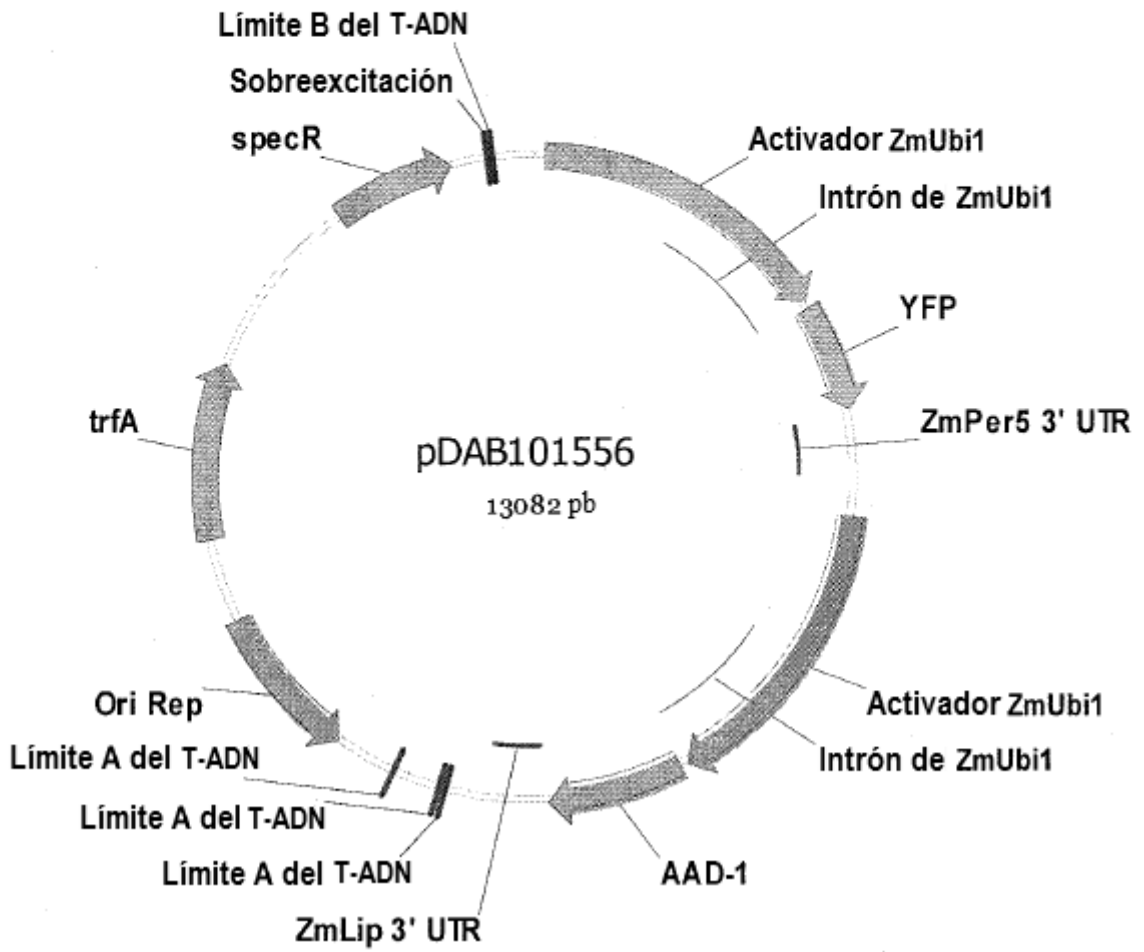


FIG. 40

Cartografía plasmídica de pDAB107698

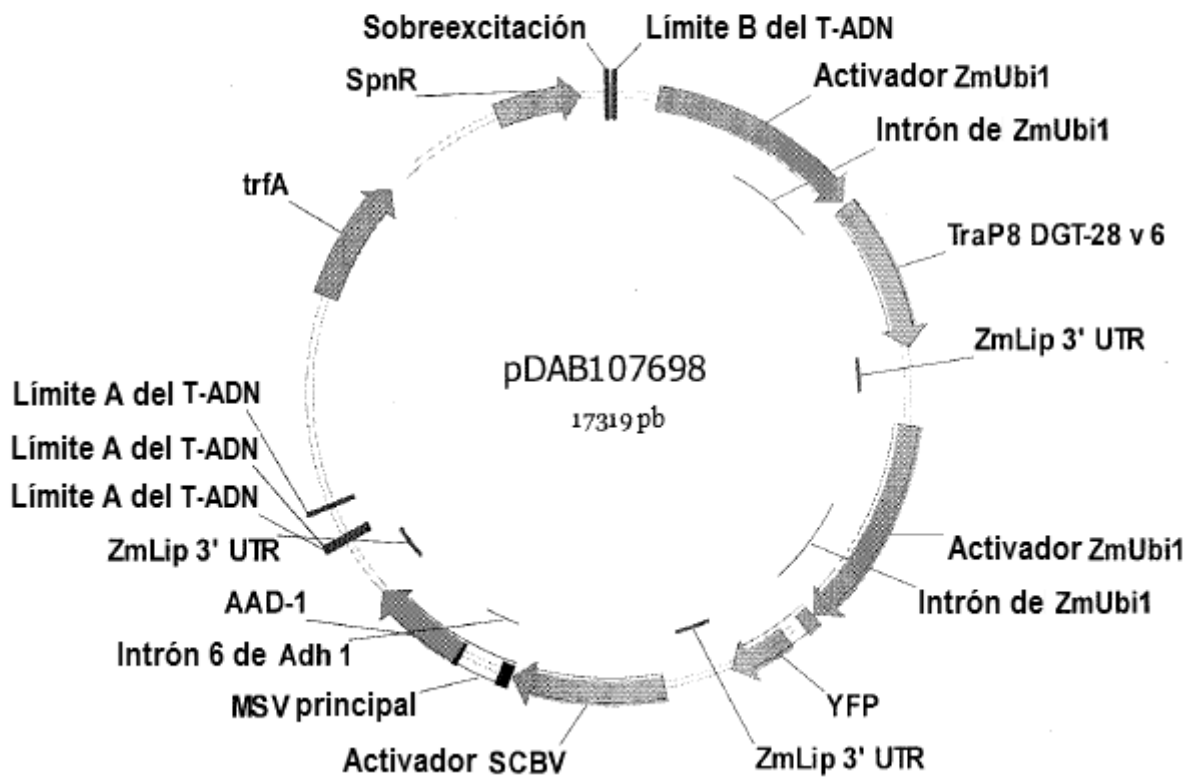


FIG. 41

Cartografía plasmídica de pDAB108384

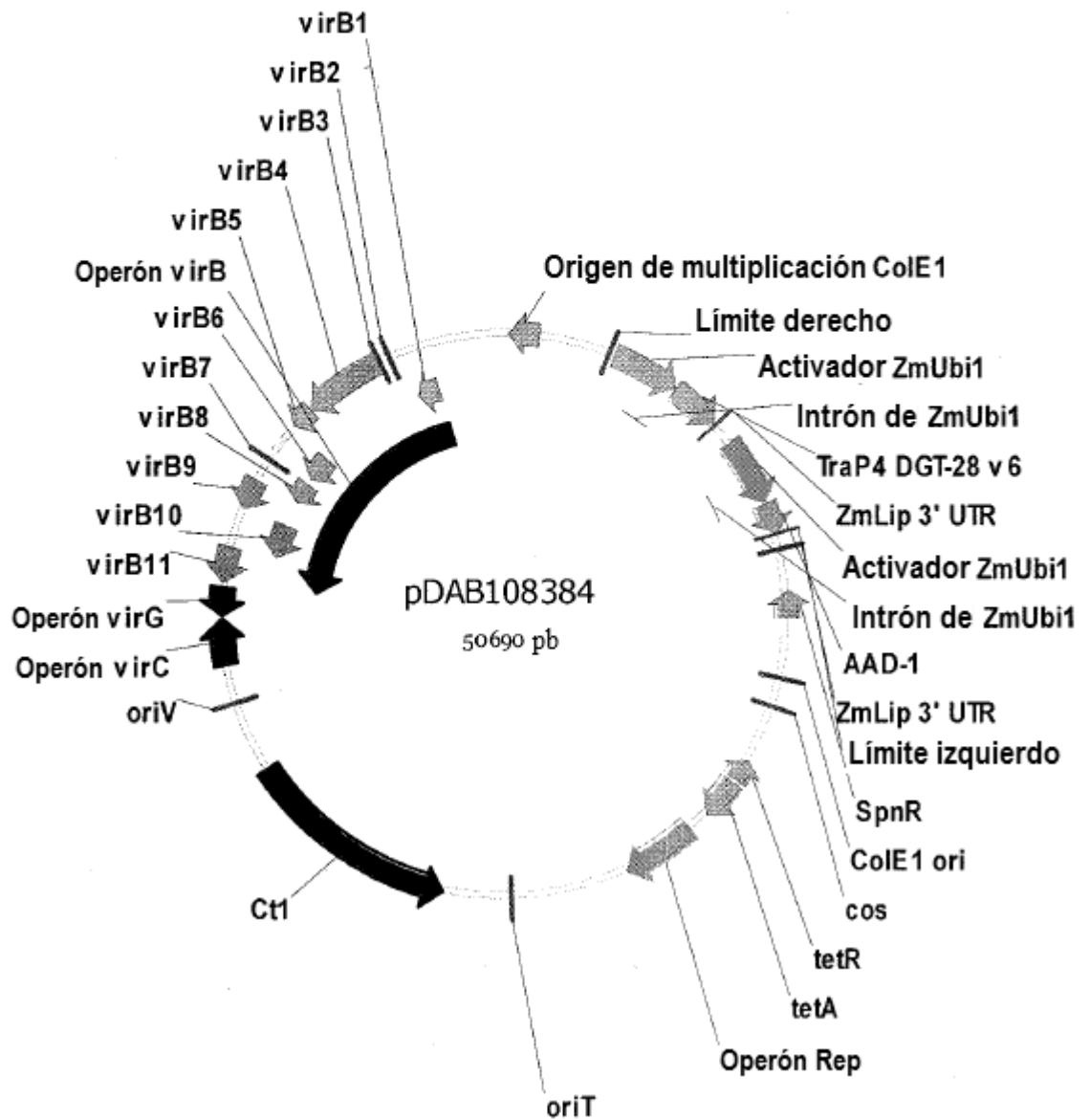


FIG. 42

Cartografía plasmídica de pDAB108385

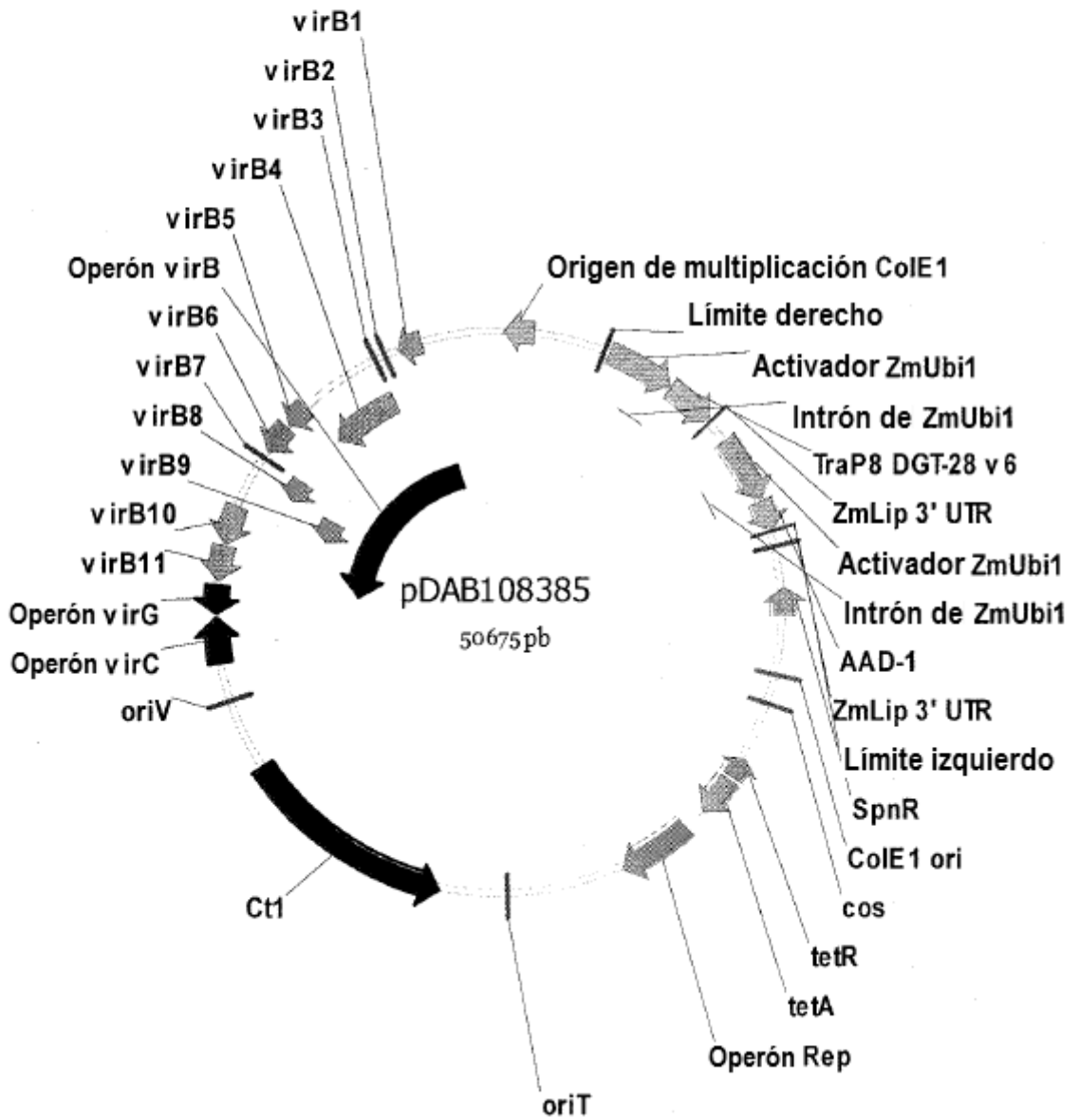


FIG. 43

Cartografía plasmídica de pDAB108386

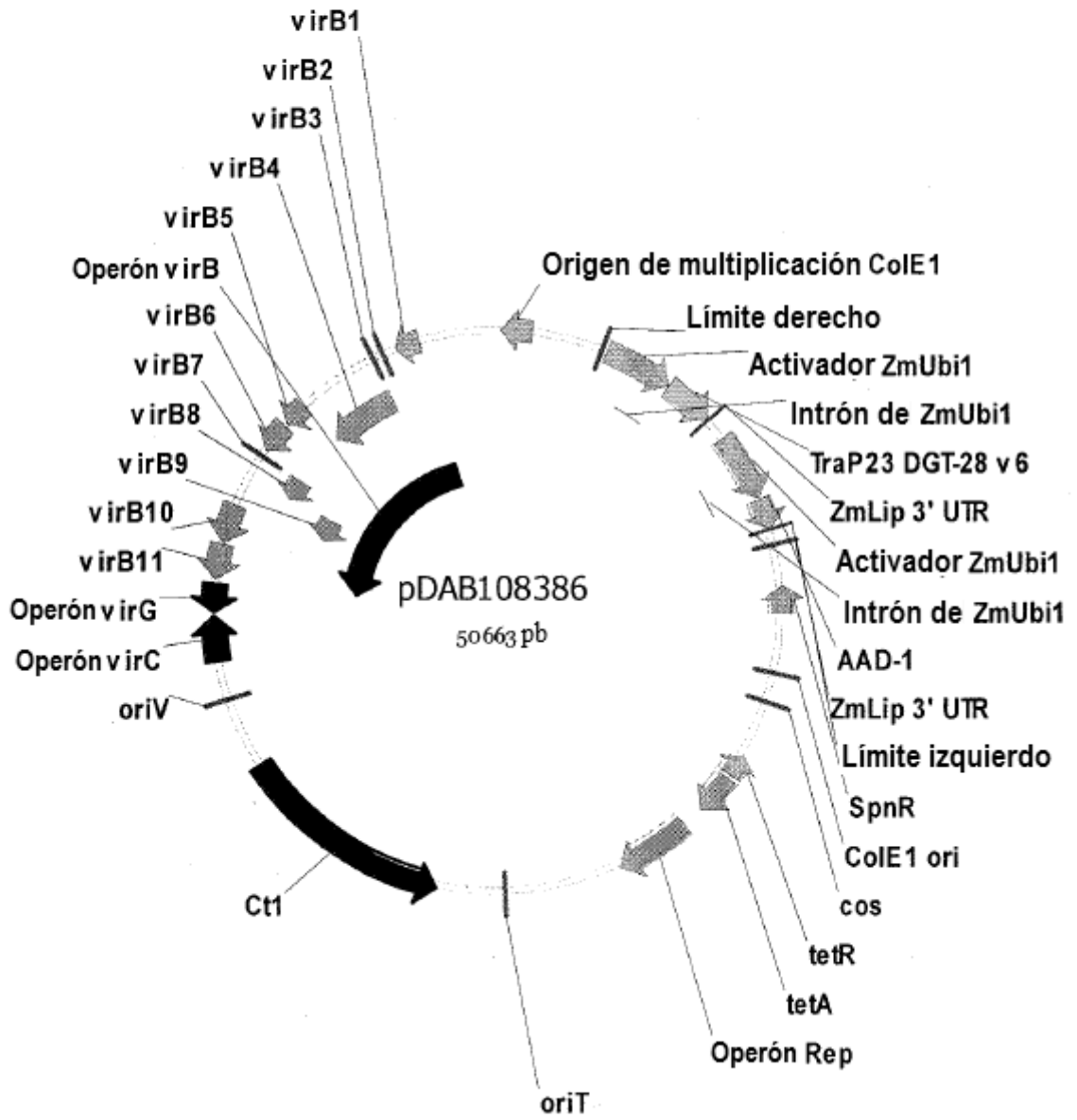


FIG. 44

Cartografía plasmídica de pDAB108387

