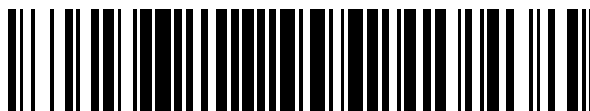


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 843**

51 Int. Cl.:
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05771746 .4**
96 Fecha de presentación: **02.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1740039**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2007**

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

30 Prioridad:
30.04.2004 US 567052 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2012

73 Titular/es:
DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 ZIONSVILLE ROAD
INDIANAPOLIS, INDIANA 45268-1054, US

72 Inventor/es:
WRIGHT, TERRY, R.;
LIRA, JUSTIN, M.;
MERLO, DONALD, J. y
ARNOLD, NICOLE L.

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

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).

ES 2 389 843 T3

DESCRIPCIÓN

Nuevos genes de resistencia a herbicidas.

Antecedentes de la invención

Las malas hierbas pueden privar al suelo con rapidez de los nutrientes que los cultivos y otras plantas útiles necesitan. Existen muchos tipos diferentes de herbicidas que son utilizados en la actualidad para el control de las malas hierbas. Un herbicida muy popular es el glifosato.

Diversos cultivos como el maíz, soja, canola, algodón, remolacha azucarera, trigo, arroz y césped, han sido desarrollados para convertirlos en resistentes al glifosato. Así, por ejemplo, es posible sembrar los campos con maíz resistente al glifosato para mantener a raya las malas hierbas sin causar daños importantes a las plantas de maíz.

A mediados de los años 90, debido a las técnicas de ingeniería genética surgieron los cultivos tolerantes al glifosato (GTC): con ellos los cultivadores tuvieron a su disposición una herramienta sencilla, cómoda, flexible y asequible para controlar una amplia gama de malas hierbas latifolias y gramíneas, nunca vista en agricultura. Los productores adoptaron rápidamente los GTC y, en muchos casos, abandonaron muchas de las mejores prácticas agronómicas como la rotación de cultivos, la rotación en el mecanismo de acción del herbicida, el uso de mezclas en tanque y la incorporación del control mecánico al control de las malas hierbas por medios químicos y culturales. En la actualidad, en Estados Unidos y en otros países del hemisferio occidental se pueden adquirir variedades comerciales tolerantes al glifosato de soja, algodón, maíz y canola, y otros cultivos GTC (trigo, arroz, remolacha azucarera, césped, etc.) permanecen sin comercializar a la espera de ganar aceptación en el mercado mundial. Muchas otras especies resistentes al glifosato se encuentran en fase de experimentación o desarrollo (entre otras, alfalfa, caña de azúcar, girasol, remolachas, guisantes, zanahoria, pepino, lechuga, cebolla, fresa, tomate y tabaco; especies forestales como el chopo y el árbol del ámbar; y especies de horticultura ornamental como tagetes, petunias y begonias. Véase el sitio web isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005). Por si todo esto no bastara, el coste del glifosato ha disminuido drásticamente en los últimos años, hasta el punto de que son muy pocos los programas convencionales para el control de las malas hierbas que pueden competir en precio y rendimiento con los sistemas de GTC basados en el glifosato.

El glifosato ha sido utilizado con éxito desde hace más de 15 años en el desherbado químico de los campos y en otras aplicaciones no agrícolas como medio de control total de la vegetación. En muchos casos, como sucede con los GTC, ha sido utilizado 1-3 veces al año durante 3, 5, 10 y hasta 15 años seguidos. Tal proceder ha propiciado una excesiva dependencia del glifosato y de la tecnología de GTC que ha generado una gran presión selectiva en la flora arvense autóctona en favor de las plantas que de forma natural son más tolerantes a él o que han logrado desarrollar un mecanismo de resistencia a su acción herbicida.

El uso generalizado de los programas de control de malas hierbas basados exclusivamente en el glifosato está provocando la selección de variedades resistentes al mismo y facilitando la propagación de las malezas que son más tolerantes que la mayoría de las especies diana; en otras palabras, está generando cambios en la flora arvense. (Ng *et al.*, 2003; Simarmata *et al.*, 2003; Lorraine-Colwill *et al.*, 2003; Sfiligoj, 2004; Miller *et al.*, 2003; Heap, 2005; Murphy *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2002). Con todo, a pesar del amplio uso del glifosato en todo el mundo durante más de 15 años, hasta el momento son contadas las malas hierbas en las que se ha detectado resistencia (Heap, 2005); la mayoría de casos se han descubierto durante los últimos 3-5 años. Entre las malas hierbas resistentes se encuentran tanto gramíneas como latifolias: *Lolium rigidum*, *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Conyza canadensis*, *Conyza bonariensis* y *Plantago lanceolata*. Asimismo, malezas que no habían supuesto problema alguno hasta el uso generalizado de los GTC están adquiriendo cada vez más prevalencia y resultan más difíciles de controlar en el contexto de los GTC, que comprende más del 80% de la superficie cultivada de algodón y soja en Estados Unidos y más del 20% de la superficie dedicada al maíz en ese mismo país (Gianessi, 2005). Tales cambios en la flora arvense atañen predominantemente, aunque no en exclusiva, a especies latifolias de difícil control como por ejemplo *Ipomoea*, *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Taraxacum* y *Commelina*.

En aquellas zonas donde los cultivadores se enfrentan a malas hierbas resistentes al glifosato o a un cambio en la flora arvense favorable a las especies de más difícil control, es posible compensar la pérdida de eficacia del glifosato mezclándolo en el tanque o alternándolo con otros herbicidas capaces de controlar las malas hierbas "descarriadas". Un compatible en tanque eficaz y muy utilizado para el control de las latifolias recalcitrantes es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). El 2,4-D se emplea desde hace más de 60 años en agricultura y en otras disciplinas como herbicida de amplio espectro contra las malas hierbas latifolias y, a pesar de que se han descrito casos esporádicos de tolerancia, sigue siendo uno de los herbicidas más utilizados en el mundo. No obstante, una desventaja que limita su uso es su escasa selectividad en cultivos de dicotiledóneas como la soja o el algodón, motivo por el cual no suele aplicarse a cultivos de dicotiledóneas sensibles, ni siquiera en las proximidades de los mismos. Por otra parte, su empleo en los cultivos de cereales resulta limitado por la naturaleza de los daños que puede ocasionar. La combinación de 2,4-D y glifosato ha sido utilizada como un potente tratamiento de desherbado químico antes de la siembra sin laboreo de la soja y el algodón, aunque debido a la sensibilidad de ambas dicotiledóneas al 2,4-D, este tipo de tratamientos debe ser aplicado por lo menos entre 14 y 30 días antes de la plantación (Agrilience, 2003).

El 2,4-D pertenece a los herbicidas derivados del ácido fenoxi, como MCPA, mecoprop y diclorprop. Ha sido utilizado en muchos cultivos de monocotiledóneas (maíz, trigo y arroz, entre otros) para el control selectivo de las malas hierbas de hoja ancha sin dañar gravemente a las plantas del cultivo. El 2,4-D es un derivado auxínico sintético que actúa desregulando la homeostasis normal entre la célula y las hormonas e impide un crecimiento equilibrado y controlado; su mecanismo de acción no se conoce con exactitud.

El 2,4-D presenta diferentes grados de selectividad en ciertas plantas, de tal modo que las dicotiledóneas son más sensibles a él que las gramíneas. Las diferencias en el metabolismo del 2,4-D entre plantas distintas explican en parte los grados de selectividad. En general, las plantas lo metabolizan lentamente, de modo que las diferencias observadas en la respuesta de las plantas al mismo probablemente puedan explicarse por la actividad sobre el o los sitios diana (WSSA, 2002). La metabolización del 2,4-D en la planta suele acaecer en dos fases: hidroxilación seguida de la conjugación con aminoácidos o glucosa (WSSA, 2002).

Con el paso del tiempo, los microbios del suelo han desarrollado una vía alternativa y eficaz para degradar el 2,4-D, lo que desemboca en la completa mineralización de este xenobiótico. Las reiteradas aplicaciones del herbicida seleccionan a los microbios que son capaces de emplearlo como fuente de carbono para crecer, atributo que les confiere una ventaja competitiva en el suelo. Por esta razón, actualmente el 2,4-D se formula para tener una vida media relativamente breve en el suelo, sin que se hayan detectado efectos residuales destacables en los cultivos ulteriores. Ello supone una ventaja añadida a su acción herbicida.

Un organismo ampliamente estudiado por su capacidad para degradar el 2,4-D es *Ralstonia eutropha* (Streber *et al.*, 1987). El gen que codifica a la responsable de la primera reacción enzimática en la vía de mineralización del 2,4-D es el *tfdA*. Véase la patente US nº 6.153.401 y el Nº de entrada M16730 del Genbank. El *tfdA* cataliza la transformación del ácido 2,4-D en diclorofenol (DCP) a través de una reacción mediada por una dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (Smejkal *et al.*, 2001). El DCP posee una escasa actividad herbicida en comparación con el 2,4-D. El gen *tfdA* se ha insertado en dicotiledóneas sensibles (por ejemplo, algodón y tabaco) para crear plantas transgénicas resistentes al 2,4-D (Streber *et al.* (1989), Lyon *et al.* (1989), Lyon (1993) y patente US nº 5.608.147).

En el medio ambiente se ha identificado un gran número de genes de tipo *tfdA* que codifican proteínas capaces de degradar el 2,4-D y que figuran depositados en la base de datos Genbank. Muchos homólogos son similares al *tfdA* (identidad de aminoácidos >85%) y poseen propiedades enzimáticas semejantes a las de dicho gen. Con todo, existen ciertos homólogos que guardan una identidad notablemente menor con el *tfdA* (del 25-50%), pero que a pesar de ello poseen los residuos característicos vinculados a las α -cetoglutarato dioxigenasas y las Fe^{+2} dioxigenasas. Por tanto, no es evidente cuáles son las especificidades de sustrato de estas dioxigenasas divergentes.

Un ejemplo único de escasa homología con el *tfdA* (identidad de aminoácidos del 28%) es el gen *rdpA* de *Sphingobium herbicidovorans* (Kohler *et al.*, 1999, Westendorf *et al.*, 2002). Esta enzima cataliza la primera reacción del proceso de mineralización del (R)-diclorprop (y de otros ácidos (R)-fenoxipropiónicos) así como del 2,4-D (un ácido fenoxiacético) (Westendorf *et al.*, 2003). Desde hace tiempo se conocen microorganismos que degradan el ácido fenoxipropiónico, pero hasta hace poco no se había progresado en la caracterización de esta ruta (Horvath *et al.*, 1990). Otra complicación que añadir a la degradación del diclorprop es la estereoespecificidad (R frente a S) que afecta tanto a su captación (Kohler, 1999) como a su oxidación inicial (Westendorf *et al.*, 2003). La expresión heteróloga del *rdpA* en otros microbios o su transformación en plantas permanecen inéditas hasta el momento. La bibliografía se ha centrado sobre todo en los homólogos cercanos al *tfdA* que degradan fundamentalmente los ácidos fenoxiacéticos aquirales como el 2,4-D.

El desarrollo de nuevas técnicas de cultivos tolerantes a herbicidas (HTC) ha cosechado un escaso éxito sobre todo debido a la eficacia, el bajo coste y la comodidad de los GTC, cualidades que les han granjeado una enorme aceptación entre los productores y que ofrecen pocos incentivos para el desarrollo de las nuevas técnicas de HTC.

Las subestructuras químicas de ariloxialcanoato son habituales en muchos herbicidas comerciales, incluidos los auxínicos fenoxi (como el 2,4-D y el diclorprop), los auxínicos piridiloxi (como fluoroxipir y triclopir), ariloxifenoxipropionatos (AOPP), inhibidores de la acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase) (como haloxyfop, quizalofop y diclofop) e inhibidores fenoxiacetato 5-sustituidos de la protoporfirinógeno IX oxidasa (como piraflofen y flumiclorac). No obstante, estos tipos de herbicidas son bastante distintos y la bibliografía actual no aporta indicios de que compartan una vía de degradación común. El descubrimiento de una enzima degradadora de herbicidas multifuncional que comprendiera múltiples modos de acción constituiría un carácter único y valioso para HTC.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona nuevas plantas que no sólo son resistentes al 2,4-D, sino también a los herbicidas AOPP. Hasta el momento no había ninguna expectativa o indicio de que pudiera crearse una planta dotada de estas dos propiedades ventajosas por medio de la introducción de un único gen. La presente invención también incluye plantas que producen una o varias enzimas de la presente invención "apiladas" junto con uno o varios genes de resistencia a herbicidas, incluidos, entre otros, genes de resistencia al glifosato, a las imidazolinonas

y al glufosinato, de tal forma que proporciona plantas tolerantes a herbicidas que son compatibles con un control de las malas hierbas más amplio y más potente y que ofrecen opciones para el manejo de la resistencia a los herbicidas. La presente invención incluye además métodos y composiciones que utilizan homólogos de los genes y de las proteínas ejemplificados en la presente memoria.

- 5 En algunas formas de realización, la invención proporciona plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas tolerantes al 2,4-D, al AOPP y a uno o más herbicidas comerciales (como por ejemplo, glifosato, imidazolinonas, glufosinato, sulfonilureas, dicamba, bromoxinilo y otros). También se revelan vectores que comprenden secuencias de ácidos nucleicos responsables de dicha tolerancia a herbicidas, así como métodos para utilizar tales plantas tolerantes y combinaciones de herbicidas para controlar las malas hierbas y prevenir los cambios en la flora arvense. La presente invención posibilita el uso de nuevas combinaciones de herbicidas de modos igualmente novedosos. Además, proporciona nuevos métodos para evitar el desarrollo y controlar estirpes de malas hierbas resistentes a uno o varios herbicidas, como el glifosato. La presente invención permite nuevos usos de nuevas combinaciones de herbicidas y cultivos, como la aplicación en presiembra, inmediatamente antes de la siembra de las semillas, con plantas que de otro modo serían sensibles al herbicida en cuestión (como el 2,4-D).
- 10 También se describe la identificación de una enzima que no sólo es capaz de degradar el 2,4-D, sino que sorprendentemente también posee propiedades novedosas que distinguen a dicha enzima de la presente invención de otras proteínas *ttfA* conocidas hasta ahora, por ejemplo. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de una enzima que es capaz de degradar tanto el 2,4-D como los herbicidas AOPP, de una manera enantioespecífica. Hasta el momento no se ha descrito ninguna enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato que pueda degradar herbicidas pertenecientes a clases químicas diferentes y que estén dotados de mecanismos de acción distintos. En la presente memoria, la enzima y el gen preferidos para el uso según la presente invención se denominan AAD-1 (ariloxialcanoato dioxigenasa). Este descubrimiento sumamente novedoso ofrece oportunidades para servir de base a un cultivo tolerante a herbicidas (HTC) y como un carácter de marcador seleccionable.
- 15 No existía motivación alguna para producir plantas portadoras de un gen *AAD-1* (preferiblemente un polinucleótido *AAD-1* dotado de una secuencia optimizada para la expresión en uno o más tipos de plantas, como se ejemplifica en la presente memoria) y no había expectativas de que tales plantas pudieran producir de manera efectiva una enzima *AAD-1* que las convirtiera en resistentes tanto a herbicidas derivados del ácido fenoxi (como el 2,4-D) como a herbicidas AOPP (como quizalofop, haloxifop, etc.). Por tanto, la presente invención aporta numerosas ventajas que hasta el momento no se creían posibles en la técnica.
- 20 Asimismo, se describe la identificación y el uso de genes que codifican enzimas ariloxialcanoato dioxigenasa capaces de degradar herbicidas auxínicos fenoxi y herbicidas ariloxifenoxipropionato. Se revelan métodos para buscar sistemáticamente proteínas dotadas de esas actividades, incluida la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, de otros herbicidas auxínicos de fenoxialcanoato y de herbicidas de ariloxifenoxipropionato mediante una enzima *AAD-1* recombinante. La presente invención también incluye métodos para el control de las malas hierbas que comprenden la aplicación de uno o varios herbicidas AOPP, auxínicos fenoxi, u otros herbicidas de ariloxialcanoato a plantas portadoras de un gen *AAD-1*. También proporciona métodos para utilizar un gen *AAD-1* como un marcador seleccionable para identificar células vegetales y plantas enteras transformadas con *AAD-1*, que opcionalmente pueden incluir uno, dos o más genes foráneos insertados simultáneamente en células vegetales diana. Los métodos de la presente invención incluyen la selección de células transformadas que son resistentes a niveles apropiados de un herbicida. Además, se describen métodos para la preparación de un polipéptido dotado de la actividad biológica de la ariloxialcanoato dioxigenasa mediante el cultivo de plantas y/o células de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 muestra un esquema general de la degradación que sufren los herbicidas auxínicos fenoxi y AOPP por la acción de la dioxigenasa.
- La figura 2 muestra la pérdida de actividad herbicida de una solución de 2,4-D tratada con *AAD-1*.
- La figura 3 muestra la pérdida de actividad herbicida de una solución de haloxifop tratada con *AAD-1*.
- La figura 4 muestra los fenoles que presumiblemente generarían algunos herbicidas representativos al ser sometidos a la catálisis por la *AAD-1*.
- La figura 5 muestra la producción de 2,4-diclorofenol por la acción del *AAD-1* recombinante.
- Las figuras 6A y 6B muestran la producción de fenoles por la acción del *AAD-1* recombinante a partir de varios sustratos herbicidas.
- La figura 7 muestra la velocidad de la reacción catalizada por la *AAD-1* en función de la concentración de sustrato con cuatro sustratos herbicidas distintos.
- Las figuras 8A y 8B muestran que el *AAD-1* (*v3*) se expresó por igual en hojas de *Arabidopsis* de distintas edades

pero siguió acumulándose durante los 25 días del experimento. Las plantas que no fueron pulverizadas con el herbicida 2,4-D (panel A) expresaron un poco más de AAD-1 (v3) que las que habían sido pulverizadas (panel B). Las barras representan la media \pm EEM de 5 hojas de 5 plantas distintas, con el porcentaje de expresión de la AAD-1 (v3) normalizado para la proteína total soluble. Las barras claras representan la tercera hoja joven (N-3) recogida de la parte superior de la planta, las barras oscuras representan la quinta hoja más vieja de la parte inferior.

Las figuras 9A, 9B y 9C muestran las lesiones sufridas por plantas de *Arabidopsis* tras el tratamiento con 2,4-D. Cuatro líneas distintas fueron tratadas con cuatro dosis distintas de 2,4-D y los daños causados se evaluaron 4 (panel A) y 14 (panel B) días después del tratamiento. También se determinó la expresión de la AAD-1 (v3) en las hojas con ensayos ELISA (panel C). Los resultados corresponden a la media \pm EEM de cinco hojas extraídas de cinco plantas distintas que recibieron el mismo tratamiento.

La figura 10 ilustra que las plantas de *Arabidopsis* transformadas con pDAB3230 (AAD-1 + EPSPS) muestran un nivel de tolerancia al glifosato >14 veces mayor a los 7 DAT que las líneas naturales y transformadas de *Arabidopsis* utilizadas como control.

La figura 11 muestra la dosis-respuesta al R-haloxifop en suspensiones de callos de maíz.

La figura 12 muestra que con una concentración de fenoles derivados del cihalofop de 1 μ M el crecimiento sigue siendo del 76%, tan alto como el control no expuesto a dichos fenoles.

La figura 13 ofrece los datos de dosis-respuesta de un evento transgénico, el 3404-006, expuesto a haloxifop.

La figura 14 muestra las respuestas de varios clones de eventos transformados y sin transformar con AAD-1 (v3) frente a dosis letales de dos herbicidas AOPP (haloxifop y quizalofop) aplicadas 1 semana antes en postemergencia.

La figura 15 muestra tres linajes T₂ distintos hallados entre 3404 transformaciones que fueron preseleccionadas con Liberty[®] para eliminar los nullos. Los linajes fueron escogidos para comparar su tolerancia al quizalofop teniendo en cuenta su expresión de AAD-1. La expresión se midió a los 14 DAT (datos no representados) y a los 30 DAT.

La figura 16 muestra un maíz transformado con AAD-1 (v3) tolerante a 8X la dosis de campo de quizalofop (Assure II) en condiciones de campo.

La figura 17 ilustra los datos de embriones inmaduros de maíz cultivados en medios que contenían cihalofop.

La figura 18 muestra el análisis por transferencia Western de callos de soja transformados con el gen AAD-1 (V3) que indica que las células del callo están expresando la proteína AAD-1 (v3).

La figura 19 compara las curvas ajustadas correspondientes a las velocidades de degradación del 2,4-D con AAD-2 (v1) y AAD-1 (v1).

La figura 20 muestra la respuesta de plantas de *Arabidopsis* T₁ transformadas con el gen AAD-1 v3 (optimizado para vegetales) o AAD-1 (v2) (natural), AAD-2 (v1) (natural) o AAD-2 (v2) (optimizado para vegetales) frente a una gama de dosis de 2,4-D aplicadas en postemergencia. Cada maceta representa un evento de transformación individual dentro de cada familia de genes T₁.

La figura 21 muestra los resultados de transferencias Western de plantas T₁ de *Arabidopsis* transformadas con el gen AAD-2 (v1) natural. Demuestran que las plantas que expresan la proteína AAD-2 (v1) están sufriendo graves daños a causa de los tratamientos con 2,4-D a 200 g e.a.(equivalente ácido)/ha, que normalmente apenas causan daño alguno a las plantas de *Arabidopsis* transformadas con el AAD-1 (v2) natural o con el AAD-1 (v3) optimizado para vegetales. La proteína AAD-2 aparece identificada en el gel. En las muestras transformadas con AAD-2 y con Pat/Cry1F se detectaron varias bandas de fondo.

La Figura 22 muestra que la actividad relativa de la AAD-2 (v1) sobre los sustratos fue: 2,4-D = diclorprop > (R,S)-haloxifop >> (R)-haloxifop.

Breve descripción de las secuencias

La SEC ID n° 1 es la secuencia de un cebador directo utilizado para amplificar el gen *rdpA/AAD-1 (v1)*.

La SEC ID n° 2 es la secuencia de un cebador inverso utilizado para amplificar el gen *rdpA/AAD-1 (v1)*.

La SEC ID n° 3 es la secuencia de nucleótidos del AAD-1 (v1) de *Sphingobium herbicidovorans*.

La SEC ID n° 4 es la secuencia de ácidos nucleicos del gen AAD-1 natural con la diana de restricción interna para NotI eliminada. Este gen se designa AAD-1 (v2). La secuenciación del ADN confirmó que se había generado el producto de PCR correcto, aunque se había producido un cambio inadvertido en el aminoácido n° 212, que pasó de arginina a cisteína.

La SEC ID n° 5 es una secuencia de ADN del gen AAD-1 (v3) "optimizada para vegetales". Este "gen" codifica la

SEC ID nº 11, que es la misma que la SEC ID nº 9 salvo por la adición de un residuo de alanina en la segunda posición. El codón adicional de alanina (GCT) se incorporó para codificar una diana para Nco I (CCATGG) que abarcaba desde el codón de inicio ATG, con el fin de posibilitar posteriores operaciones de clonaje.

5 La SEC ID nº 6 ("rdpA(ncoI)") y la SEC ID nº 7 ("3' sacI") se usaron para amplificar un fragmento de ADN mediante el sistema Fail Safe PCR System (Epicenter).

La SEC ID nº 8 es otro cebador de PCR ("BstEII/Del NotI") que se usó con el cebador "3' SacI".

La SEC ID nº 9 es la secuencia de aminoácidos natural codificada por el gen *AAD-1 (v1)* de *Sphingobium herbicidovorans*.

10 La SEC ID nº 10 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN del *AAD-1 (v2)* de la SEC ID nº 4.

La SEC ID nº 11 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN *AAD-1 (v3)* optimizada para vegetales de la SEC ID nº 5.

La SEC ID nº 12 es la secuencia de ADN del gen *AAD-2 (v1)* natural.

La SEC ID nº 13 es la secuencia de aminoácidos de la proteína *AAD-2 (v1)*.

15 La SEC ID nº 14 es un cebador directo utilizado para amplificar el ADN de *AAD-2 (v1)* para clonación.

La SEC ID nº 15 es un cebador inverso utilizado para amplificar el ADN de *AAD-2 (v1)* para clonación.

La SEC ID nº 16 es el cebador directo de M13.

La SEC ID nº 17 es el cebador inverso de M13.

La SEC ID nº 18 es un cebador directo utilizado para amplificar el ADN del *AAD-2 (v1)* para clonación.

20 La SEC ID nº 19 es un cebador inverso utilizado para amplificar el ADN del *AAD-2 (v1)* para clonación.

La SEC ID nº 20 es la proteína EPSPS natural de la soja.

La SEC ID nº 21 es una secuencia de la proteína EPSPS de la soja portadora de dos mutaciones: una mutación en el residuo 183 (sustitución de la treonina de la proteína natural por una isoleucina) y otra en el residuo 187 (sustitución de la prolina de la proteína natural por una serina).

25 La SEC ID nº 22 es la secuencia de ADN adaptada a la soja que codifica la proteína EPSPS de la SEC ID nº 21.

La SEC ID nº 23 es el cebador Pat 5-3.

La SEC ID nº 24 es el cebador Pat 3-3.

La SEC ID nº 25 es el cebador directo de la PTU de *AAD-1*.

La SEC ID nº 26 es el cebador inverso de la PTU de *AAD-1*.

30 La SEC ID nº 27 es el cebador directo para la PCR de la región codificante de *AAD-1*.

La SEC ID nº 28 es el cebador inverso para la PCR de la región codificante de *AAD-1*.

La SEC ID nº 29 es el nucleótido del *AAD-2 (v2)* (optimizado para vegetales).

La SEC ID nº 30 es la secuencia de la proteína *AAD-2 (v2)* traducida.

La SEC ID nº 31 es el cebador directo de *AAD-1* para la PCR del fragmento de Southern.

35 La SEC ID nº 32 es el cebador inverso de *AAD-1* para la PCR del fragmento de Southern.

Descripción detallada de la invención

40 El desarrollo de un gen de resistencia al 2,4-D y el subsecuente desarrollo de cultivos resistentes proporcionan excelentes opciones para el control de las malas hierbas latifolias y resistentes al glifosato (o muy tolerantes y modificadas) durante el cultivo. El 2,4-D es un potente herbicida contra latifolias, de amplio espectro y relativamente asequible que sería de gran utilidad para los agricultores si a los cultivos, tanto de dicotiledóneas como de monocotiledóneas, se les pudiera conferir una mayor tolerancia al mismo. Los cultivos de dicotiledóneas transgénicas tolerantes al 2,4-D también ofrecerían una mayor flexibilidad en cuanto al momento y la dosis de aplicación. Otra virtud de un carácter de tolerancia a herbicidas, en este caso al 2,4-D, sería su utilidad para prevenir

daños en cultivos que normalmente son sensibles a la deriva, volatilización o inversión del 2,4-D (o cualquier otro fenómeno de desplazamiento fuera de lugar), aplicación errónea, vandalismo y similares. Otro beneficio del gen *AAD-1* es que, a diferencia de todos los homólogos del *tfdA* caracterizados hasta el momento, la *AAD-1* es capaz de degradar los R-enantiómeros (isómeros con actividad herbicida) de los herbicidas auxínicos fenoxi quirales (por ejemplo, diclorprop y mecoprop) además de los auxínicos fenoxi aquirales (como por ejemplo el 2,4-D, MCPA y ácido 4-clorofenoxiacético). Véase la Tabla 1. En todo el mundo se utilizan numerosas mezclas de diferentes combinaciones de herbicidas auxínicos fenoxi para combatir espectros específicos de malas hierbas en las diferentes condiciones ambientales imperantes. El uso del gen *AAD-1* en vegetales conferiría protección frente a una gama mucho más amplia de herbicidas auxínicos fenoxi, lo cual mejora la flexibilidad y el espectro de malas hierbas que pueden ser controladas y protege a los cultivos de la deriva y de otros daños causados por el desplazamiento fuera de lugar de los herbicidas fenoxi en toda la gama de auxinas fenoxi comercializados.

Tabla 1. Herbicidas auxínicos fenoxi comerciales. Los herbicidas auxínicos fenoxi suelen nombrarse con el ácido activo, pero algunos se comercializan como formulaciones del éster correspondiente y estas también se consideran sustratos de la enzima *AAD-1* en la planta puesto que las esterasas vegetales en general convierten dichos ésteres en los ácidos activos en la planta. También se puede hacer alusión a la sal orgánica o inorgánica del ácido correspondiente. Cuando se aluda a herbicidas quirales, ya sea en forma de éster, sal o ácido propiónico, los enantiómeros racémicos (R,S) u ópticamente puros (R o S) se considerarán el mismo herbicida a efectos de nombrar estos herbicidas, aunque los compuestos ópticamente puros reciban números CAS distintos. Los intervalos de dosificación utilizables pueden corresponder a tratamientos individuales o en combinación con otros herbicidas, tanto en aplicaciones agrícolas como de otro tipo.

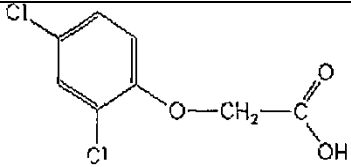
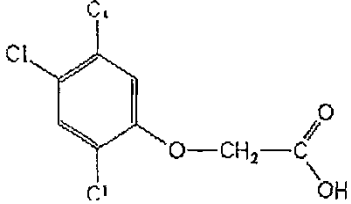
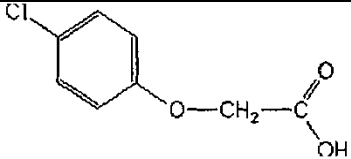
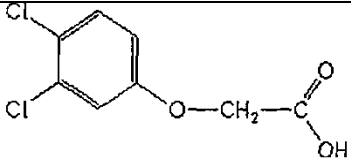
Tabla 1. Herbicidas auxínicos fenoxi comerciales.				
Nombre químico	Nº CAS	Intervalos de dosificación utilizables (g e.a./ha)	Intervalos de dosificación preferidos (g e.a./ha)	Estructura
2,4-D	94-75-7	25 - 4000	280 - 1120	
2,4,5-T	93-76-5	25 - 4000	25 - 4000	
4-CPA	122-88-3	25 - 4000	25 - 4000	
3,4-DA	588-22-7	25 - 4000	25 - 4000	

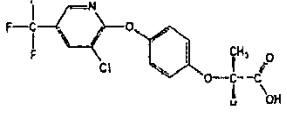
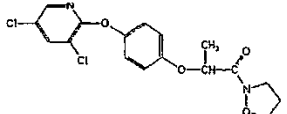
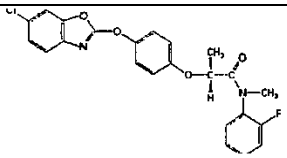
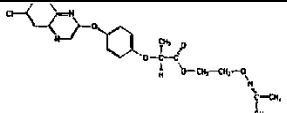
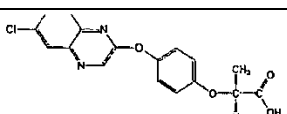
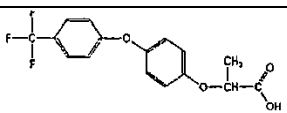
Tabla 1. Herbicidas auxínicos fenoxi comerciales.				
Nombre químico	N° CAS	Intervalos de dosificación utilizables (g e.a./ha)	Intervalos de dosificación preferidos (g e.a./ha)	Estructura
MCPA	94-74-6	2S - 4000	125 - 1550	
Dichlorprop	120-36-5	25 - 12000	100 - 2240	
Mecoprop	7085-19-0	25 - 4000	250 - 3360	
Cloprop	101-10-0	25 - 4000	25 - 4000	
4-CPP	3307-39-9	25 - 4000	25 - 4000	
Fenoprop	93-72-1	25 - 4000	25 - 4000	
3,4-DP	3307-41-3	25 - 4000	25 - 4000	

Otro beneficio más del gen *AAD-1* es su capacidad sin precedentes para degradar simultáneamente una multitud de graminicidas comerciales y no comerciales pertenecientes a la clase general de los ariloxifenoxipropionatos (AOPP). Véase la Tabla 2. Esta característica hace posible la utilización de una serie de compuestos AOPP en cultivos transgénicos portadores del *AAD-1*, cultivos cuya tolerancia no era posible garantizar hasta ahora. Entre estos se hallan sobre todo cereales como el maíz, arroz, trigo, cebada, centeno, avena, sorgo, especies de césped para clima templado y frío, hierbas de pasto y muchas otras, pero también podría incluir cultivos de dicotiledóneas en que la

tolerancia al AOPP (presente de forma natural en la mayoría de las dicotiledóneas) no alcanza niveles comercialmente aceptables para permitir su uso.

Tabla 2. Graminicidas AOPP ordenados por su nombre común aceptado. Los herbicidas AOPP se denominan en general por su ácido activo, pero la mayoría están formulados comercialmente en diversas formulaciones de éster y estos también se consideran sustratos de la enzima AAD-1 en la planta, puesto que las esterasas vegetales en general convierten estos ésteres en los ácidos activos en la planta. También se puede hacer alusión a la sal orgánica o inorgánica del ácido correspondiente. Cuando se alude a herbicidas quirales, ya sea en forma de éster, sal o ácido propiónico, los enantiómeros racémicos (R,S) u ópticamente puros (R o S) se considerarán el mismo herbicida a efectos de nombrar estos herbicidas, aunque los compuestos ópticamente puros reciban números CAS distintos. Los intervalos de dosificación utilizables pueden corresponder a tratamientos individuales o en combinación, tanto en aplicaciones agrícolas como de otro tipo.

Tabla 2. Graminicidas AOPP ordenados por su nombre común aceptado.				
Nombre químico	N° CAS	Intervalos de dosificación utilizables (g e.a./ha)	Intervalos de dosificación preferidos (g e.a./ha)	Estructura
Clorazifop	72492-94-7	10-2000	10-2000	
Clodinafop	105512-06-9	10-2000	20-200	
Clofop	59621-49-7	10-2000	10-2000	
Cyhalofop	122008-85-9	10-2000	105-560	
Diclofop	71283-65-3	10-2000	280-2000	
Fenoxaprop	66441-23-4	10-2000	20-200	
Fenthiaprop	95721-12-3	10-2000	10-2000	
Fluazifop	69335-91-7	10-2000	25-420	

Tabla 2. Graminícidias AOPP ordenados por su nombre común aceptado.				
Nombre químico	N° CAS	Intervalos de dosificación utilizables (g e.a./ha)	Intervalos de dosificación preferidos (g e.a./ha)	Estructura
Haloxifop	69806-40-2	10-2000	20-600	
Isoxapyrifop	87757-18-4	10-2000	30-240	
Metamifop	256412-89-2	10-2000	35-280	
Propaquizafop	111479-05-1	10-2000	30-240	
Quizalofop	76578-14-8	10-2000	20-240	
Trifop	58597-74-4	10-2000	10-2000	

Se ha logrado identificar un gen único (*AAD-1*) que, introducido mediante técnicas de ingeniería genética para expresión en vegetales, permite utilizar herbicidas auxínicos fenoxi en plantas que o bien no poseen una tolerancia intrínseca o bien resulta insuficiente para permitir su uso. Asimismo, el *AAD-1* puede proteger a la planta contra los herbicidas AOPP en aquellos casos en que la tolerancia natural tampoco es suficiente para garantizar la selectividad. Las plantas que sean portadoras únicamente del *AAD-1* podrán ser tratadas de manera secuencial o simultánea con uno, dos o una combinación de varios herbicidas auxínicos fenoxi. La dosis de cada herbicida auxínico fenoxi puede oscilar entre 25 y 4.000 g e.a./ha, y más habitualmente entre 100 y 2.000 g e.a./ha para el control de un amplio espectro de malas hierbas dicotiledóneas. De modo similar, se pueden aplicar uno, dos o una mezcla de varios graminícidias AOPP a plantas que expresan el *AAD-1* con un menor riesgo de daños provocados por tales herbicidas. La dosis de cada AOPP puede oscilar entre 10 y 2.000 g e.a./ha, y más habitualmente entre 20-500 g e.a./ha para el control de un amplio espectro de malas hierbas monocotiledóneas. Las combinaciones de tales clases químicas y herbicidas con distintos mecanismos de acción y espectros en el mismo campo (secuencial o simultáneamente en la mezcla de tanque) permitiría controlar la mayoría de malas hierbas que se pretenden controlar con herbicidas.

El glifosato es un herbicida muy utilizado porque controla un espectro amplísimo de malas hierbas latifolias y gramíneas. No obstante, su uso reiterado en cultivos GTC y en otras aplicaciones no agrícolas ha provocado, y continuará provocando, la selección de malas hierbas que son tolerantes naturales o biotipos resistentes al mismo. La mayoría de las estrategias para la prevención de la resistencia a herbicidas propugnan como método para retrasar la aparición de malezas resistentes la adición a la mezcla de tanque de otros herbicidas dotados de mecanismos de acción distintos, en dosis que permitan controlar la especie en cuestión. El apilamiento del *AAD-1* con un carácter de tolerancia al glifosato (y/o con otros caracteres de tolerancia a herbicidas) podría proporcionar un mecanismo para controlar las malas hierbas resistentes al glifosato (ya sean gramíneas por medio de uno o varios herbicidas AOPP, o dicotiledóneas con uno o varios auxínicos fenoxi) en GTC al permitir el uso del glifosato y de uno

o varios herbicidas auxínicos fenoxi (por ejemplo, el 2,4-D) y AOPP (por ejemplo, quizalofop) de manera selectiva en el mismo cultivo. Las aplicaciones de estos herbicidas podrían ser simultáneas, con una mezcla de tanque que contenga dos o más herbicidas con diferentes mecanismos de acción; aplicaciones individuales de una sola composición herbicida en aplicaciones secuenciales en presembrado, preemergencia o postemergencia y fraccionamiento de las aplicaciones entre 2 horas y 3 meses; o, alternativamente, se puede aplicar cualquier combinación de cualquier número de herbicidas representativos de cada clase química en cualquier momento en el plazo de 7 meses desde la siembra del cultivo hasta la cosecha (o el intervalo de seguridad antes de la cosecha del herbicida, el que sea más corto).

El control de un amplio espectro de malas hierbas gramíneas y latifolias requiere disponer de flexibilidad en términos del calendario de aplicación, dosis de herbicidas y capacidad para controlar malezas difíciles o resistentes. Las aplicaciones de glifosato en un cultivo portador de un apilamiento de gen de resistencia al glifosato/AAD-1 podrían oscilar entre 250-2.500 g e.a./ha; la del o los herbicidas auxínicos fenoxi entre 25-4.000 g e.a./ha; y la del o los herbicidas AOPP entre 10-2.000 g e.a./ha. Las combinaciones y el calendario de aplicación más adecuados dependen de cada situación, de las especies implicadas y del entorno, decisiones que corresponden a un experto en control de malas hierbas que conozca los pormenores de esta invención.

Las formulaciones herbicidas (por ejemplo, formulación de éster, ácido o sal; o concentrado soluble o emulsificable, o líquido soluble) y los aditivos para la mezcla en tanque (por ejemplo, adyuvantes o agentes de compatibilidad) pueden modificar sustancialmente la capacidad del herbicida o de una combinación de ellos para controlar las malas hierbas. Cualquier combinación de los anteriores con cualquiera de las clases químicas de herbicida mencionadas está comprendida en el alcance de la presente invención.

Un experto en la materia también sabrá apreciar que el beneficio ofrecido por la combinación de dos o más mecanismos de acción para aumentar el espectro de malas hierbas controladas y/o controlar especies que de forma natural son más tolerantes o resistentes también puede hacerse extensible a aquellas clases químicas de herbicidas a las que los cultivos son tolerantes debido a la acción humana (por métodos transgénicos y de otro tipo) y que trascienden los GTC. Así pues, los caracteres que codifican la resistencia al glifosato (por ejemplo los genes de resistencia vegetales o bacterianos *EPSPS*, *GOX* y *GAT*), resistencia al glufosinato (por ejemplo *Pat*, *bar*), resistencia a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) (por ejemplo imidazolinona, sulfonilurea, triazopirimidina sulfonanilida, pirimidiniltiobenzoatos y otras clases químicas = *AHAS*, *Csr1*, *SurA*, etc.), resistencia a bromoxinilo (por ejemplo *Bxn*), resistencia a inhibidores de la enzima HPPD (4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa), resistencia a inhibidores de la fitoeno desaturasa (PDS), resistencia a herbicidas inhibidores del fotosistema II (por ejemplo *psbA*), resistencia a herbicidas inhibidores del fotosistema I, resistencia a herbicidas inhibidores de la protoporfirinógeno IX oxidasa (PPO) (por ejemplo *PPO-1*), resistencia a herbicidas fenilureicos (por ejemplo *CYP76B1*), enzimas degradadores de dicamba (véase, p. ej. US 20030135879) y otros se podrían apilar solos o en múltiples combinaciones a fin de conferir la capacidad para controlar o evitar los cambios en la flora arvense y/o la resistencia a cualquier herbicida de las clases citadas.

Por lo que respecta a otros herbicidas, algunos inhibidores de ALS preferidos son las triazopirimidina sulfonanilidas (como cloransulam-metil, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam y penoxsulam), pirimidiniltiobenzoatos (como bispiribac y pirithiobac) y flucarbazona. Algunos inhibidores de HPPD preferidos son mesotriona, isoxaflutola y sulcotriona. Algunos inhibidores de PPO preferidos son flumiclorac, flumioxazin, flufenpir, piraflufen, fluthiacet, butafenacilo, carfentrazona, sulfentrazona y los difeniléteres (como acifluorfen, fomesafen, lactofen y oxifluorfen).

Además, el AAD-1 solo o apilado con uno o varios caracteres de HTC, se puede combinar con otros caracteres agronómicos (resistencia a insectos o a hongos, tolerancia al estrés, etc.) o de calidad (mayor rendimiento, mejor perfil de aceites, mejor calidad de la fibra, etc.). Por tanto, la presente invención puede formar parte de un paquete agronómico completo destinado a mejorar la calidad del cultivo, con la ventaja de aportar un control flexible y rentable de cualquier número de plagas agronómicas.

Se describe la identificación de una enzima que no sólo es capaz de degradar el 2,4-D, sino que sorprendentemente también posee propiedades novedosas que la diferencian de las proteínas *tfdA* conocidas hasta el momento, por ejemplo. Aunque esta enzima presenta una homología muy baja con el *tfdA*, los genes utilizados se pueden clasificar en general en la misma familia general de las dioxigenasas dependientes de α -cetoglutarato. Esta familia de proteínas se caracteriza por tres residuos de histidina conservados en un motivo "HX(D/E)X₂₃₋₂₆(T/S)X₁₁₄₋₁₈₃HX₁₀₋₁₃R" que comprende el centro activo. Las histidinas coordinan el ión Fe⁺² en el centro activo que resulta esencial para la actividad catalítica (Hogan *et al.*, 2000). En la presente memoria se exponen experimentos preliminares de expresión *in vitro* que fueron modificados a propósito para ayudar a seleccionar los atributos novedosos.

Más específicamente, la presente invención se refiere en parte al uso de una enzima que no sólo es capaz de degradar el 2,4-D, sino también herbicidas AOPP. Hasta el momento no se había descrito ninguna enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato capaz de degradar herbicidas de diferentes clases químicas y con distintos mecanismos de acción. Las enzimas y genes preferidos para el uso según la presente invención se denominan en la presente memoria genes y proteínas AAD-1 (ariloxialcanoato dioxigenasa).

Asimismo, se describe la identificación y el uso de genes que codifican enzimas ariloxialcanoato dioxigenasa

capaces de degradar herbicidas auxínicos fenoxi y ariloxifenoxipropionato, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros herbicidas auxínicos fenoxialcanoicos y herbicidas ariloxifenoxialcanoato por la acción de una enzima AAD-1 expresada con técnicas de ADN recombinante.

5 Las proteínas fueron sometidas a ensayos analíticos y biológicos para comprobar que, efectivamente, catalizaban la conversión del 2,4-D en 2,4-diclorofenol ("DCP"; sin actividad herbicida). Las proteínas parcialmente purificadas de la presente invención pueden convertir rápidamente el 2,4-D en DCP (la conversión oscila entre el 50-100%) en condiciones *in vitro*. Otra ventaja de las plantas transformadas con AAD-1 es que los compuestos herbicidas originales son metabolizados y transformados en formas inactivas, reduciendo las posibilidades de hallar residuos en el grano o el forraje.

10 La presente invención también incluye métodos para el control de malas hierbas que comprenden la aplicación de un herbicida AOPP y/o un herbicida auxínico fenoxi a plantas que comprenden un gen AAD-1.

A partir de estos descubrimientos, se facilitan nuevas plantas que comprenden un polinucleótido que codifica este tipo de enzima. Hasta el momento no había motivación alguna para producir tales plantas y no había expectativas de que tales plantas pudieran producir efectivamente esta enzima para convertirlas en resistentes no sólo a herbicidas fenoxi (como el 2,4-D) sino también a herbicidas AOPP. Por tanto, la presente invención proporciona muchas ventajas que hasta el momento no se habían creído posibles en la técnica.

Es posible adquirir y analizar cepas accesibles públicamente (depositadas en colecciones de cultivos como ATCC o DSMZ) por medio de las técnicas reveladas en la presente memoria para buscar nuevos genes. Las secuencias mostradas en la presente memoria pueden ser utilizadas para amplificar y clonar los genes homólogos en un sistema de expresión recombinante con objeto de realizar más búsquedas sistemáticas y ensayos de acuerdo con la presente invención.

Tal y como se ha expuesto en el apartado de antecedentes, un microorganismo muy estudiado por su capacidad para degradar el 2,4-D es *Ralstonia eutropha* (Streber *et al.*, 1987). El gen que codifica la primera enzima de la vía de degradación es el *tfdA*. Véase la Patente US nº 6.153.401 y la entrada Nº M16730 del Genbank. El *tfdA* cataliza la conversión del ácido 2,4-D en el DCP, carente de acción herbicida, a través de una dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (Smejkal *et al.*, 2001). Este gen ha sido utilizado en plantas transgénicas para conferir resistencia frente al 2,4-D en plantas dicotiledóneas (por ejemplo algodón y tabaco) que normalmente son sensibles al mismo (Streber *et al.*, 1989; Lyon *et al.*, 1989; Lyon *et al.*, 1993). En el medio ambiente se ha identificado un gran número de genes de tipo *tfdA* que codifican proteínas capaces de degradar el 2,4-D y que figuran depositados en la base de datos Genbank. Muchos homólogos son bastante similares al *tfdA* (identidad de aminoácidos >85%) y poseen propiedades enzimáticas semejantes a las de dicho gen. Con todo, se conoce un pequeño conjunto de homólogos de la α -cetoglutarato dioxigenasa que guardan un bajo nivel de homología con el *tfdA*.

El gen *RdpA*, procedente de *Sphingobium herbicidovorans* (Westendorf *et al.*, 2002), es un ejemplo singular de baja homología (identidad de aminoácidos 28%). Se ha demostrado que esta enzima cataliza la primera etapa del proceso de mineralización del (R)-diclorprop (y de otros ácidos (R)-fenoxipropiónicos) así como del 2,4-D (un ácido fenoxiacético) (Westendorf *et al.*, 2003). Desde hace tiempo se conocen microorganismos que degradan el ácido fenoxipropiónico, pero hasta hace poco no se había progresado en la caracterización de esta ruta (Horvath *et al.*, 1990). Otra complicación que añadir a la degradación del diclorprop es la estereoespecificidad (R frente a S) que afecta tanto a su captación (Kohler, 1999) como a su oxidación inicial (Westendorf *et al.*, 2003). La expresión heteróloga del *rdpA* en otros microbios, o la transformación de este gen en plantas, permanecen inéditas hasta el momento. La bibliografía se ha centrado sobre todo en los homólogos cercanos al *tfdA* que degradan fundamentalmente los ácidos fenoxiacéticos aquirales. No existían expectativas previas de que los genes *rdpA* o AAD-1 fueran expresados de manera satisfactoria en las plantas para convertir a las plantas en resistentes al 2,4-D (sin mencionar la resistencia a AOPP completamente sorprendente).

45 Como se describe con mayor detalle en los ejemplos de las páginas siguientes, el *rdpA* de *Sphingobium herbicidovorans* se clonó y se analizó con varias clases químicas de herbicidas para determinar su promiscuidad de sustrato. Ya se había demostrado que esta enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato purificada en su forma natural degrada el 2,4-D y el diclorprop (Westendorf *et al.*, 2002 y 2003), pero no se había descrito que una enzima de su tipo tuviera la capacidad de degradar herbicidas de diferentes clases químicas y distintos mecanismos de acción. El *rdpA* nunca se había expresado en plantas, ni existía motivación para hacerlo porque el desarrollo de nuevas técnicas de cultivos HTC se ha visto limitado en gran medida por la eficacia, el bajo coste y demás ventajas ofrecidas por los cultivos GTC (Devine, 2005).

A partir de esta actividad novedosa, las proteínas y los genes de la presente invención se denominan en la presente memoria proteínas y genes AAD-1. En poco tiempo se confirmó que la AAD-1 degradaba *in vitro* diversos herbicidas auxínicos fenoxiacéticos y fenoxipropiónicos. Pero, tal y como se describe por primera vez en la presente memoria, sorprendentemente también se descubrió que era capaz de degradar otros sustratos pertenecientes a la clase de las moléculas de ariloxialcanoato. Los graminicidas de ariloxifenoxipropionato (AOPP) son sustratos de notable importancia agronómica. Este descubrimiento sumamente novedoso ofrece oportunidades para servir de base a un cultivo tolerante a herbicidas (HTC) y como un carácter marcador seleccionable.

En la presente memoria se describe que los graminicidas AOPP de amplio espectro son excelentes sustratos de la AAD-1, al igual que el 2,4-D, el diclorprop y otros herbicidas auxínicos fenoxi. Esta enzima es única por su capacidad para degradar una amplia gama tanto de latifolicidas de amplio espectro (herbicidas auxínicos fenoxi) como de graminicidas de amplio espectro muy activos (AOPP).

5 Por tanto, la presente invención se refiere en parte a la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros herbicidas auxínicos fenoxialcanoicos y herbicidas de ariloxifenoxialcanoato mediante la expresión por técnicas recombinantes de una enzima ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-1). También se da a conocer la identificación y los usos de genes que codifican una enzima ariloxialcanoato dioxigenasa degradadora (AAD-1), capaz de degradar herbicidas auxínicos fenoxi y ariloxifenoxipropionato.

10 La expresión transgénica de la enzima confiere tolerancia a combinaciones de herbicidas que podrían controlar la práctica totalidad de malas hierbas latifolias y gramíneas. El AAD-1 puede actuar como un excelente carácter para cultivos tolerantes a herbicidas (HTC) que es posible apilar con otros caracteres de HTC (resistencia a glifosato, resistencia a glufosinato, a imidazolinona, a bromoxinilo, etc.) y caracteres de resistencia a insectos (*Cry1F*, *Cry1Ab*, *Cry 34/45*, etc.) por ejemplo. Asimismo, el AAD-1 puede servir como un marcador seleccionable útil para la selección de transformantes primarios de plantas genéticamente modificadas con un segundo gen o grupo de genes.

Además, el gen microbiano ha sido rediseñado de modo que la proteína está codificada por codones que son utilizados preferentemente por plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (hemicot). Plantas de *Arabidopsis*, maíz, tabaco, algodón, soja, colza y arroz han sido transformadas con constructos que contenían el AAD-1 y han demostrado altos niveles de resistencia tanto a herbicidas auxínicos fenoxi como AOPP. Como se muestra a continuación en el Ejemplo 6, el gen reconstruido a título de ejemplo resultó más eficaz que el gen bacteriano al conferir a la planta la resistencia contra herbicidas.

Los grupos oxialcanoato son útiles para introducir en los herbicidas una funcionalidad de ácido estable. El grupo ácido puede facilitar el desplazamiento por el floema gracias al "atrapamiento ácido", un atributo deseable para la acción herbicida y que podría incorporarse a nuevos herbicidas para mejorar su movilidad. Ciertos aspectos de la presente invención también proporcionan un mecanismo para crear HTC. Existen muchos herbicidas comerciales y experimentales que podrían servir como sustratos de la AAD-1. Por ello, el uso de los genes de interés también podría conferir tolerancia a esos otros herbicidas.

Las características de HTC de la presente invención pueden ser utilizadas en combinaciones novedosas con otras características de HTC (como, por ejemplo, la tolerancia al glifosato). Tales combinaciones de caracteres dan lugar a métodos novedosos para controlar las malas hierbas (y especies similares), gracias a la nueva resistencia adquirida o a la tolerancia intrínseca a los herbicidas (por ejemplo al glifosato). Por consiguiente, además de los características de HTC, comprendidas en el alcance de la invención se encuentran incluidos nuevos métodos para el control de las malas hierbas con herbicidas, en que la tolerancia a estos se crea mediante dicha enzima en cultivos transgénicos.

Adicionalmente, los cultivos tolerantes al glifosato predominan en todo el mundo. Cultivados muchas veces en rotación con otros cultivos tolerantes al glifosato, el control de los ricios resistentes al glifosato puede resultar difícil en los cultivos rotativos. Por ello, el uso de los caracteres transgénicos de la presente invención, apilados o insertados individualmente en los cultivos, proporciona una herramienta para controlar otros cultivos HTC que aparecen como ricios.

Esta invención se puede aplicar en el contexto de la comercialización de un carácter de resistencia al 2,4-D apilado con caracteres ya disponibles de resistencia al glifosato en plantas de soja, por ejemplo. Por ello, la presente invención proporciona una herramienta para combatir los cambios en las arvenses latifolias y/o la selección de latifolias resistentes a herbicidas, consecuencias del intensísimo uso del glifosato contra las malas hierbas en diversos cultivos.

La expresión transgénica de los genes AAD-1 de interés se ha logrado, entre otros ejemplos, en *Arabidopsis*, maíz, tabaco, algodón, arroz, soja y canola, lo que no obsta para que la presente invención pueda aplicarse en cualquier otro tipo de plantas deseado. La soja es un cultivo preferido para la transformación según la presente invención. No obstante, esta invención puede ser aplicada a otros muchos cultivos de gramíneas y latifolias. De igual forma, el 2,4-D puede ser utilizado mejor en cultivos de gramíneas cuya tolerancia al mismo es moderada y en los que la mejora de dicha tolerancia por medio de este carácter proporcionaría a los cultivadores la oportunidad de utilizar el 2,4-D en dosis más eficaces y durante más tiempo sin riesgo de dañar el cultivo.

Es más, la presente invención utiliza un único gen que puede proporcionar resistencia a herbicidas que controlan malas hierbas de hoja ancha (auxínicos) y gramíneas (AOPP). Este gen podría ser utilizado en múltiples cultivos, lo que permitiría el uso de una combinación de herbicidas de amplio espectro. La presente invención también puede controlar las malas hierbas resistentes a los herbicidas disponibles y ayudar a controlar los cambios en la flora arvense causados por las prácticas agronómicas actuales. La AAD-1 de interés también puede ser utilizada para neutralizar con eficacia otros sustratos herbicidas transformándolos en compuestos sin actividad herbicida. Por todo ello, la presente invención facilita el desarrollo de otros caracteres para HTC y/o de técnicas de marcadores seleccionables.

Con independencia del uso de los genes de interés para producir HTC, o como un añadido al mismo, los genes de interés también se pueden utilizar como marcadores seleccionables para seleccionar los transformantes en cultivos celulares, en invernadero o en el campo. Los genes de interés poseen un gran valor intrínseco simplemente como marcadores seleccionables para proyectos de biotecnología. La promiscuidad de la AAD-1 frente a otros herbicidas auxínicos fenoxialcanoicos brinda muchas oportunidades para utilizar este gen en aplicaciones de HTC y/o como marcador seleccionable.

Un gen, denominado en la presente memoria AAD-1 (ariloxialcanoato dioxigenasa), se clonó de *Sphingobium herbicidovorans* (ATCC 700291) mediante una PCR en pET 280-S/S (designado pDAB 3203) y se expresó en *E.coli* BL-21 Star. Cuando este gen se sobreexpresa (inducción con IPTG 1 mM y lisado de cultivo combinado con la siguiente mezcla de reacción: 2,4-D 112,5 µg/ml, ácido ascórbico 1 mM, α-cetoglutarato 1 mM, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 50 µM), la enzima recombinante resultante degrada el 2,4-D transformándolo en DCP, compuesto que carece de actividad herbicida (determinado por HPLC, espectrometría de masas, colorimetría y bioanálisis en placa con *Arabidopsis*). Además, se ha demostrado que la AAD-1 convierte los siguientes herbicidas en su correspondiente fenol inactivo: diclorprop, mecoprop, haloxifop, diclofop y otros (véanse las Tablas 3 y 4).

Tabla 3: Efecto de la AAD-1 (v1) purificada sobre varias auxinas y análogos auxínicos dotados de acción herbicida. Los sustratos se analizaron a una concentración de 1 mM en MOPS 25 mM y pH 6,8, Fe²⁺ 200 µM, ascorbato sódico 200 µM, α-cetoglutarato 1 mM utilizando 1 µg o 10 µg (10X) de AAD-1 (v1) purificada por ensayo de 0,16 ml.

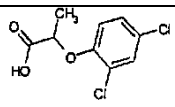
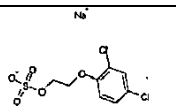
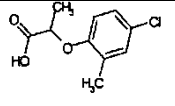
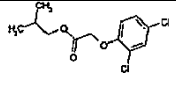
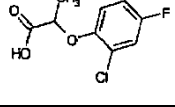
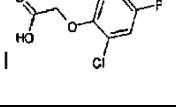
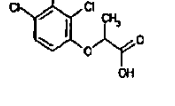
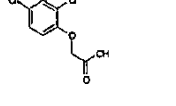
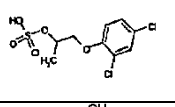
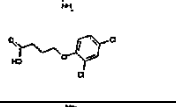
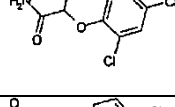
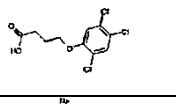
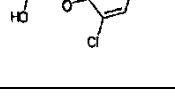
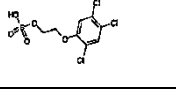
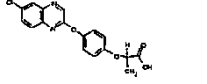
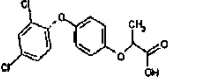
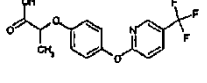
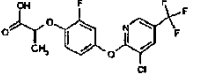
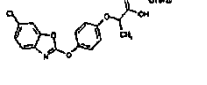
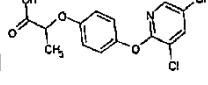
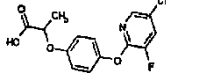
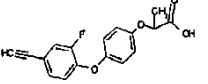
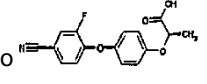
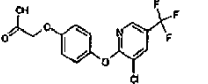
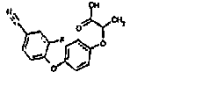
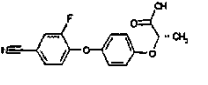
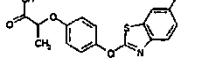

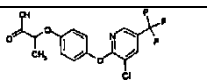
Tabla 3. Efecto de la AAD-1 (v1) purificada sobre varios compuestos auxínicos y análogos auxínicos dotados de acción herbicida									
ESTRUCTURA	ID de registro	Compuesto	AAD1	AAD1 (10x)	ESTRUCTURA	ID de registro	Compuesto	AAD1	AAD1 (10x)
	117613	(R,S)-diclorprop	0,566	2,594		398166	sesona	0,02	0,177
	188874	(R,S)-mecoprop	0,341	2,085		190252		0,008	0,211
	83293	(R,S)-2-cloro, 4-fluorofenoxi-propionato	0,304	2,358		124988		0,007	0,058
	11113675	(R,S)-3-aminodiclorpop	0,228	2,676		11263526		0,004	0,069
	188476		0,077	0,687		178577		0,003	0,021
	192132		0,064	0,204		178587		0,003	0,02
	195517	2,4-D	0,034	0,383		188527		0,003	0,036

Tabla 4: Efecto de la AAD-1 (v1) purificada sobre varios graminicidas AOPP y análogos y sobre cloquintocet. Los sustratos se analizaron a una concentración de 1 mM en MOPS 25 mM y pH 6,8, Fe²⁺ 200 µM, ascorbato sódico 200 µM, α-cetoglutarato 1 mM utilizando 1 µg o 10 µg (10X) de AAD-1 (v1) purificada por ensayo de 0,16 ml.

Tabla 4. Efecto de la AAD-1 (v1) purificada sobre varios graminicidas AOPP y análogos y sobre cloquintocet.									
ESTRUCTURA	ID de registro	Compuesto	AAD1	AAD1 (10x)	ESTRUCTURA	ID de registro	Compuesto	AAD1	AAD1 (10x)
	18706	(R)-quizalofop	0,43	2,1		460511	(R,S)-diclofop	0,155	1,663
	67131	(R,S)-fluazifop	0,427	2,17		25646		0,144	1,69
	11044492	(R)-fenoxaprop	0,408	0,597		70222	(R,S)-clorazifop	0,128	1,584
	34697	(R,S)-clodinofof	0,295	1,98		199608	cihalofop	0,114	1,26
	14603	(R)-cihalofop	0,222	1,989		43865	haloxifop-oxiacetato	0,004	0,053
	14623	(R,S)-cyhalofop	0,215	1,815		7466	(S)-cihalofop	0,003	0,017
	62942	(R,S)-fenthiafop	0,199	1,055		204558	Cloquintocet	0	0,001
	66905	haloxifop	0,172	1,63					

Proteínas (y aislamientos fuente). La presente invención utiliza proteínas funcionales. Por “actividad funcional” (o “activo/a”) se hace referencia en la presente memoria a que las proteínas/enzimas destinadas al uso según la presente invención poseen la capacidad para degradar o disminuir la actividad de un herbicida (solas o en combinación con otras proteínas). Las plantas que producen proteínas de la presente invención preferiblemente producirán “una cantidad efectiva” de la proteína, de modo que cuando la planta sea tratada con un herbicida, el nivel de expresión de la proteína será suficiente para convertir a la planta en parcial o totalmente resistente o tolerante al herbicida (a una dosis habitual, si no se indica otra cosa; las dosis de aplicación habituales se pueden encontrar en el conocido *Herbicide Handbook* (*Weed Science Society of America*, 8ª edición, 2002), por ejemplo). El herbicida se puede aplicar en dosis que normalmente matarían a la planta diana, en concentraciones y dosis normales en el campo. (Debido a la invención de interés, el nivel y/o la concentración podrían ser mayores que las utilizadas hasta ahora). Preferiblemente, las células vegetales y las plantas de la presente invención resultan protegidas contra la inhibición del crecimiento o los daños causados por el tratamiento herbicida. Las plantas y las células vegetales transformadas de la presente invención preferiblemente se convierten en resistentes o tolerantes a un herbicida, como se expone en la presente memoria, lo cual significa que la planta y las células vegetales transformadas pueden crecer en presencia de cantidades eficaces de uno o varios herbicidas como se expone en la presente memoria. Las proteínas preferidas poseen actividad catalítica para metabolizar uno o más compuestos de ariloxialcanoato.

La transferencia de la actividad funcional a los sistemas vegetales o bacterianos puede implicar una secuencia de ácidos nucleicos, la codificación de la secuencia de aminoácidos de una proteína integrada en un vector de expresión proteica adecuado para el hospedador en el que reside el vector. Una forma de obtener una secuencia de ácidos nucleicos que codifique una proteína con actividad funcional consiste en aislar el material genético natural de la especie bacteriana que sintetiza la proteína de interés, utilizando información deducida de la secuencia de aminoácidos de la proteína, como se revela en la presente memoria. Las secuencias naturales pueden ser optimizadas para la expresión en plantas, por ejemplo, tal y como se expone con mayor detalle a continuación. También se puede diseñar un polinucleótido optimizado a partir de la secuencia de la proteína.

La presente invención utiliza clases de proteínas dotadas de actividades novedosas como las indicadas en la presente memoria. Una forma de caracterizar dichas clases de proteínas y los polinucleótidos que las codifican

consiste en definir un polinucleótido por su capacidad para hibridarse, bajo un intervalo de condiciones concretas, con una secuencia de nucleótidos ejemplificada (la complementaria de la misma y/o una sonda o sondas derivadas de una de las hebras) y/o por su capacidad para ser amplificada mediante PCR con cebadores derivados de las secuencias ejemplificadas.

- 5 Existen varios métodos para obtener las proteínas destinadas al uso según la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos dirigidos contra las proteínas reveladas en la presente memoria con el fin de identificar y aislar otras proteínas en una mezcla. En concreto, se pueden generar anticuerpos contra las porciones de las proteínas que están más conservadas o que son más distintas de otras proteínas relacionadas. Esos anticuerpos se pueden utilizar entonces para identificar específicamente proteínas equivalentes dotadas de la actividad
- 10 característica mediante inmunoprecipitación, enzimoimmunoabsorción (ELISA) o inmunotransferencia. Los anticuerpos contra las proteínas mostradas en la presente memoria, o contra proteínas equivalentes, o fragmentos de dichas proteínas, se pueden preparar fácilmente con procedimientos ordinarios. Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, preferiblemente producidos en respuesta a una proteína ejemplificada o sugerida.
- 15 Resultará evidente para un experto en la materia que las proteínas (y los genes) de la presente invención se pueden obtener de diversas fuentes. Dado que ciertos elementos transponibles como los plásmidos codifican operones de degradación de herbicidas enteros, y que estos también pueden estar integrados en el genoma, es posible obtener proteínas de la presente invención de una amplia variedad de microorganismos, entre ellos bacterias recombinantes y/o naturales. Otros miembros de los órdenes Firmicutes y Proteobacteria, así como géneros portadores del *rdpA*,
- 20 como *Sphingobium*, *Delftia*, *Rodofex* y *Comamonas*, entre otros, pueden ser utilizados como fuentes.

También es posible fabricar mutantes de aislamientos bacterianos mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la disciplina. Por ejemplo, se pueden obtener mutantes asporógenos de un aislamiento mediante mutagénesis con etilmetanosulfonato (EMS). También se pueden conseguir mutantes con luz ultravioleta y nitrosoguanidina por medio de procedimientos bien conocidos en la técnica.

- 25 Una proteína "procedente de" u "obtenible de" cualquiera de los aislamientos de interés referidos o sugeridos en la presente memoria significa que la proteína (o una proteína similar) se puede obtener del aislamiento o de alguna otra fuente, como otra cepa bacteriana o una planta. "Derivado de" también tiene esta connotación e incluye proteínas obtenibles de un tipo determinado de bacteria que ha sido modificada para la expresión en una planta, por ejemplo. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que, dado que se trata de un gen y de una proteína de
- 30 origen bacteriano, es posible modificar una planta con técnicas de ingeniería genética para que produzca la proteína. Se pueden disponer preparaciones de anticuerpos, sondas de ácidos nucleicos (ADN, ARN o APN, por ejemplo) y similares utilizando el polinucleótido y/o las secuencias de aminoácidos revelados en la presente memoria, con el fin de detectar y recuperar otros genes relacionados en otras fuentes (naturales).

- 35 Es posible utilizar técnicas ordinarias de biología molecular para clonar y secuenciar las proteínas y los genes descritos en la presente memoria. Se puede encontrar más información en Sambrook *et al.*, 1989.

Polinucleótidos y sondas. Además se proporcionan secuencias de nucleótidos que codifican proteínas para ser utilizadas según la presente invención. La presente invención proporciona asimismo métodos para identificar y caracterizar genes que codifican proteínas dotadas de la actividad herbicida deseada. En una forma de realización, la presente invención proporciona secuencias de nucleótidos únicas que son útiles como sondas de hibridación y/o

40 cebadores para técnicas PCR. Los cebadores producen fragmentos génicos característicos que pueden ser utilizados para la identificación, caracterización y/o aislamiento de genes de interés concretos. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención codifican proteínas que son distintas de las proteínas descritas anteriormente.

- Los polinucleótidos pueden ser utilizados para formar "genes" enteros que codifiquen proteínas o péptidos en una célula hospedadora deseada. Por ejemplo, como un experto en la materia puede reconocer fácilmente, los polinucleótidos de interés se pueden colocar adecuadamente bajo el control de un promotor en un hospedador de
- 45 interés, como es conocido en la técnica. El nivel de expresión del gen y su expresión específica en un tejido concreto o en un momento dado pueden tener una gran repercusión en la utilidad de la invención. En general, cuanto mayor sea el nivel de expresión proteica de un gen degradador más rápida y más completa será la degradación del sustrato (en este caso un herbicida). En general, se pretende que los promotores expresen el gen diana en niveles
- 50 elevados a menos que la expresión elevada cause un impacto negativo en la salud de la planta. Normalmente, se pretende que el gen *AAD-1* se exprese de manera constitutiva en todos los tejidos para conferir una protección completa a la planta en todas las etapas de crecimiento. No obstante, como alternativa se puede utilizar un gen de resistencia que se exprese vegetativamente; de este modo se podría utilizar el herbicida de interés en los cultivos para controlar las malezas y, posteriormente, para controlar la reproducción sexual del cultivo de interés mediante su
- 55 aplicación durante la etapa de floración.

Como resulta evidente para un experto en la materia, el ADN forma normalmente una doble cadena. En esta disposición, una hebra es complementaria de la otra y viceversa. A medida que el ADN se replica en una planta (por ejemplo), se producen hebras complementarias del mismo. El término "hebra codificante" es utilizado a menudo en la técnica para referirse a la hebra que se une con la hebra antisentido. El ARNm se transcribe a partir de esta hebra

antisentido del ADN. La hebra codificante contiene una serie de codones (un codón son tres nucleótidos que pueden ser leídos como una unidad de tres residuos que designan un aminoácido concreto) que pueden ser leídos como un marco abierto de lectura (ORF) para formar una proteína o un péptido de interés. Para producir una proteína *in vivo*, normalmente una hebra de ADN se transcribe en una hebra complementaria de ARNm que servirá como molde de la proteína. Por tanto, la presente invención incluye el uso de los polinucleótidos ejemplificados mostrados en la lista de secuencias adjunta y/o de equivalentes que incluyen las hebras complementarias. La presente invención incluye los ARN y los APN (ácidos péptidos nucleicos) que son equivalentes funcionales de las moléculas de ADN ejemplificadas.

Los aislamientos bacterianos se pueden cultivar en condiciones favorables para conseguir una elevada multiplicación del microbio. Después de tratar el microbio para obtener su ácido nucleico genómico monocatenario, el ADN se puede poner en contacto con los cebadores de la invención y ser sometido a una amplificación por PCR. Con dicho procedimiento, los fragmentos característicos de los genes de interés resultan amplificados, revelando así la presencia del gen o genes de interés.

Otros aspectos incluyen genes y aislamientos identificados con los métodos y las secuencias de nucleótidos descritos en la presente memoria. Los genes identificados de esta manera pueden codificar proteínas de resistencia a herbicidas de la presente invención.

Las proteínas y los genes para uso de acuerdo con la presente invención pueden ser identificados y obtenidos mediante sondas de oligonucleótidos, por ejemplo. Dichas sondas son secuencias de nucleótidos que pueden ser detectadas en virtud de un marcador adecuado o que pueden ser de por sí fluorescentes, tal y como se describe en la Solicitud internacional N° WO 93/16094. Las sondas (y los polinucleótidos de la presente invención) pueden ser de ADN, ARN o APN. Además de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y uracilo (U; en las moléculas de ARN), las sondas (y polinucleótidos) sintéticas de la presente invención también pueden contener inosina (una base neutra capaz de aparearse con las cuatro bases que a veces se utiliza como sustituto de la mezcla de cuatro bases en las sondas sintéticas) y/u otras bases sintéticas (no naturales). Por tanto, siempre que en la presente memoria se aluda a un oligonucleótido sintético y degenerado "N" o "n" se utilizarán genéricamente, pudiendo ser G, A, T, C o inosina. Los códigos de ambigüedad se utilizan en la presente memoria de acuerdo con las normas de nomenclatura de la IUPAC vigentes en el momento de la presentación de esta solicitud (por ejemplo, R significa A o G, Y significa C o T, etc.).

Como es conocido por los expertos en la materia, si una sonda molecular se hibrida con una muestra de ácido nucleico, es razonable suponer que la sonda y la muestra guardan entre sí una homología/similitud/identidad sustancial. Preferiblemente, primero se realiza la hibridación del polinucleótido y después se efectúan lavados en condiciones de baja, moderada o alta restrictividad mediante técnicas bien conocidas, como se describe por ejemplo en Keller, G. H., M. M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, N.Y., págs. 169-170. Por ejemplo, como se indica en dicha obra, se pueden conseguir condiciones de baja restrictividad con un primer lavado con (solución salina con citrato) SSC 2x/SDS 0,1% (dodecilsulfato sódico) durante 15 minutos a temperatura ambiente; normalmente se hacen dos lavados. Se puede conseguir más restrictividad disminuyendo la concentración de sal y/o elevando la temperatura. Por ejemplo, después del lavado descrito se pueden hacer dos lavados con SSC 0,1x/SDS 0,1% a temperatura ambiente durante 15 minutos cada uno, seguidos por lavados con SSC 0,1x/SDS 0,1% a 55°C durante 30 minutos cada uno. Estas temperaturas se pueden utilizar con otros protocolos de hibridación y de lavado citados en la presente memoria y como debería conocer un experto en la materia (por ejemplo, como sal se puede usar SSPE en lugar de SSC). La solución de SSC 2x/SDS 0,1% se puede elaborar añadiendo 50 ml de SSC 20x y 5 ml de SDS 10% a 445 ml de agua. El SSC 20x se puede preparar combinando NaCl (175,3 g/0,150 M), citrato sódico (88,2 g/0,015 M) y agua, ajustando el pH a 7,0 con NaOH 10 N, y después enrasando el volumen hasta 1 litro. El SDS 10% se puede preparar disolviendo 10 g de SDS en 50 ml de agua autoclavada, diluyendo después hasta un volumen final de 100 ml.

La detección de la sonda proporciona unos medios para determinar de una manera conocida si la hibridación se ha mantenido. Este análisis con sonda proporciona un método rápido para identificar genes de la presente invención. Los segmentos de nucleótidos que se utilizan como sondas según la invención se pueden sintetizar con un sintetizador de ADN y procedimientos ordinarios. Estas secuencias de nucleótidos también se pueden utilizar como cebadores de PCR para amplificar genes de la presente invención.

Las características de hibridación de una molécula pueden ser utilizadas para definir los polinucleótidos (y/o sus complementarios, preferiblemente sus complementarios completos) que hibridan con un polinucleótido ejemplificado en la presente memoria. Es decir, una forma de definir un gen (y la proteína que este codifica) consiste, por ejemplo, en determinar su capacidad para hibridar con un gen conocido o ejemplificado específicamente (bajo cualquiera de las condiciones reveladas específicamente en la presente memoria).

En la presente memoria, condiciones "restrictivas" de hibridación se refiere a las condiciones que consiguen el mismo, o aproximadamente el mismo, grado de especificidad de la hibridación que las condiciones empleadas por los solicitantes actuales. En concreto, se puede llevar a cabo una hibridación de ADN inmovilizado sobre filtros de transferencia Southern con sondas génicas marcadas con ³²P mediante métodos ordinarios (véase p. ej., Maniatis *et al.* 1982). En general, la hibridación y los lavados posteriores se pueden llevar a cabo en condiciones que permiten

la detección de las secuencias diana. En el caso de las sondas génicas de ADN bicatenario, la hibridación se puede prolongar hasta el día siguiente a 20-25° C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido de ADN en SSPE 6x, solución de Denhardt 5x, SDS 0,1% y ADN desnaturizado 0,1 mg/ml. La temperatura de fusión se describe mediante la fórmula siguiente (Beltz *et al.* 1983):

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

Los lavados se llevan a cabo normalmente del modo siguiente:

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

(2) Una vez a $T_m - 20^\circ\text{C}$ durante 15 minutos en SSPE 0,2x, SDS 0,1% (lavado de restrictividad moderada).

Con las sondas de oligonucleótidos, la hibridación se puede prolongar hasta el día siguiente a 10-20°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido en SSPE 6x, solución de Denhardt 5x, SDS 0,1% y ADN desnaturizado 0,1 mg/ml. La T_m de las sondas de oligonucleótidos se describe mediante la fórmula siguiente:

$$T_m (^\circ\text{C}) = 2 (\text{número de pares de bases T/A}) + 4 (\text{número de pares de bases G/C}) \text{ (Suggs } et al., 1981).$$

Los lavados se llevan a cabo normalmente del modo siguiente:

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

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

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

Baja: SSPE 1x ó 2x, temperatura ambiente

Baja: SSPE 1x ó 2x, 42° C

Moderada: SSPE 0,2x ó 1x, 65° C

Alta: SSPE 0,1x, 65° C

La formación de la molécula bicatenaria y su estabilidad dependen de la existencia de una complementariedad sustancial entre las dos hebras del híbrido y, como se ha indicado antes, resulta tolerable un cierto grado de desapareamiento. Por tanto, las secuencias de las sondas incluyen mutaciones (únicas y múltiples), deleciones, inserciones de las secuencias descritas y de combinaciones de las mismas, en las que dichas mutaciones, inserciones y deleciones permiten la formación de híbridos estables con el polinucleótido diana de interés. Las mutaciones, inserciones y deleciones se pueden producir en un polinucleótido dado de muchas maneras, y tales métodos son conocidos por una persona versada en la materia. En el futuro, podrían aparecer nuevos métodos.

Técnica de PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una síntesis enzimática, repetitiva y conservadora de una secuencia de ácidos nucleicos. Este procedimiento es bien conocido y utilizado habitualmente por los expertos en la materia (véase Mullis, Patentes US nº 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159; Saiki *et al.*, 1985). La PCR se basa en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN de interés que está flanqueado por dos cebadores oligonucleótidos que hibridan con las hebras opuestas de la secuencia diana. Los cebadores se orientan preferiblemente con sus extremos 3' encarados. Los repetidos ciclos de desnaturización térmica del molde, la reasociación de los cebadores con sus secuencias complementarias y la extensión de los cebadores reasociados por medio de una ADN polimerasa dan como resultado la amplificación del segmento definido por los extremos 5' de los cebadores de PCR. El producto de la extensión de cada cebador puede servir como molde para el otro cebador, de modo que con cada ciclo se duplica la cantidad del fragmento de ADN producida en el ciclo anterior. Esto provoca la acumulación exponencial del fragmento diana específico, hasta alcanzar varios millones de copias en pocas horas. Por medio de una ADN polimerasa termoestable como la polimerasa *Taq*, aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, el proceso de amplificación puede automatizarse completamente. Los expertos en la materia conocen otras enzimas adecuadas.

Las secuencias de ADN ejemplificadas, o segmentos de las mismas, pueden ser utilizadas como cebadores para la amplificación por PCR. Durante este proceso de amplificación, resulta tolerable un cierto grado de desapareamiento entre las bases del cebador y del molde, como mutaciones, deleciones e inserciones (especialmente adiciones de nucleótidos en el extremo 5') en los cebadores ejemplificados. Cualquier persona versada en la técnica conoce métodos para producir mutaciones, inserciones y deleciones en un cebador.

Modificación de genes y proteínas. Los genes y las proteínas de interés pueden fusionarse con otros genes y proteínas para producir proteínas quiméricas o de fusión. Los genes y proteínas útiles según la presente invención no sólo incluyen las secuencias enteras ejemplificadas específicamente, sino también porciones, segmentos y/o fragmentos (incluidos fragmentos contiguos y deleciones internas y/o terminales respecto a las moléculas enteras) de tales secuencias, variantes, mutantes, quimeras y fusiones de los mismos. Las proteínas pueden tener aminoácidos sustituidos siempre que conserven la actividad funcional deseada. Los genes “variantes” tienen secuencias de nucleótidos que codifican las mismas proteínas o proteínas equivalentes dotadas de una actividad equivalente o similar a una proteína ejemplificada. Los términos “proteínas variantes” y “proteínas equivalentes” se refieren a proteínas dotadas de la misma o básicamente la misma actividad biológica/funcional contra las plagas diana y las secuencias equivalentes como las proteínas expuestas a modo de ejemplo. En la presente memoria, la alusión a una secuencia “equivalente” concierne a secuencias portadoras de sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones de aminoácidos que mejoran o que no afectan negativamente a la actividad en un grado significativo. Los fragmentos que conservan la actividad también quedan incluidos en esta definición. Los fragmentos y otros equivalentes que conserven una función o actividad igual o similar a la de un fragmento correspondiente de una proteína ejemplificada quedan incluidos dentro del ámbito de la presente invención. Se pueden hacer cambios, como sustituciones o adiciones de aminoácidos, con diversos fines, tales como aumentar (o disminuir) la estabilidad frente a proteasas de la proteína (sin disminuir material o sustancialmente la actividad funcional de la misma), eliminar o añadir una diana de restricción, y similares. Se pueden construir fácilmente variaciones de genes utilizando, por ejemplo, técnicas ordinarias que provocan mutaciones puntuales.

Además, la patente US nº 5.605.793, por ejemplo, describe métodos para generar una diversidad molecular adicional utilizando el reensamblaje de ADN tras una fragmentación al azar o dirigida. Ésta se puede denominar transposición de genes (shuffling), proceso que normalmente implica la mezcla de fragmentos (de un tamaño idóneo) de dos o más moléculas de ADN distintas, seguida por repetidas rondas de renaturalización. Esto puede mejorar la actividad de una proteína codificada por un gen inicial. El resultado es una proteína quimérica dotada de una actividad mejor, de una especificidad por el sustrato alterada, mayor estabilidad enzimática, estereoespecificidad alterada, u otras características.

La transposición se puede diseñar y dirigir después de obtener y examinar las coordenadas atómicas 3D (tridimensionales) y la estructura cristalina de la proteína de interés. Por tanto, la “transposición dirigida” se puede dirigir a ciertos segmentos de una proteína idóneos para ser modificados, como los segmentos expuestos en la superficie, y preferiblemente no a segmentos internos implicados en el plegamiento de la proteína y que resulten esenciales para mantener la integridad de su estructura 3D.

Se pueden utilizar genes variantes para producir proteínas variantes; de modo similar se pueden utilizar hospedadores recombinantes para producir las proteínas variantes. Utilizando las citadas técnicas de “transposición de genes” se pueden construir genes y proteínas equivalentes que comprenden 5, 10 ó 20 residuos contiguos (aminoácidos o nucleótidos) de cualquier secuencia ejemplificada en la presente memoria. Como un experto en la materia sabe, las técnicas de transposición de genes, por ejemplo, se pueden ajustar para obtener equivalentes portadores de, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296 ó 297 residuos contiguos (aminoácidos o nucleótidos), correspondientes a un segmento (del mismo tamaño) de cualquiera de las secuencias ejemplificadas o sugeridas (o las complementarias (completas) de las mismas). Segmentos de tamaño similar, especialmente los pertenecientes a regiones conservadas, también pueden ser utilizados como sondas y/o cebadores.

También se pueden obtener fragmentos de genes enteros por medio de exonucleasas o endonucleasas comerciales siguiendo procedimientos ordinarios. Por ejemplo, se pueden utilizar enzimas tales como la *BaI*31 o técnicas de mutagénesis dirigida para cortar sistemáticamente nucleótidos de los extremos de tales genes. Asimismo, se pueden obtener genes que codifiquen fragmentos activos mediante diversas enzimas de restricción. También se pueden usar proteasas para obtener directamente fragmentos activos de tales proteínas.

En la presente memoria se describen proteínas que pueden ser truncadas sin perder por ello la actividad funcional. Por “proteína truncada” se entiende una porción de proteína que puede ser escindida sin que la proteína truncada restante pierda la actividad deseada después de la escisión. La escisión se puede efectuar con diversas proteasas. Asimismo, se pueden producir proteínas escindidas con técnicas de biología molecular eliminando bases de ADN que codifiquen dicha proteína, bien mediante la digestión con endonucleasas de restricción bien con otras técnicas

disponibles para los expertos en la materia. Después del truncamiento, dichas proteínas se pueden expresar en sistemas heterólogos como *E. coli*, baculovirus, sistemas de virus vegetales, levaduras y similares y a continuación someterse a bioanálisis en insectos del modo descrito en la presente memoria para determinar su actividad. Los expertos en la materia saben bien que es posible producir con éxito proteínas truncadas que conserven su actividad funcional pese a haber perdido parte de su secuencia completa. Por ejemplo, se pueden utilizar proteínas de *Bacillus thuringiensis* en una forma truncada (proteína central) (véanse p. ej., Höfte *et al.* (1989) y Adang *et al.* (1985)). Señalar que en la presente memoria, el término “proteína” puede incluir truncamientos funcionalmente activos.

En ciertos casos, sobre todo para la expresión en vegetales, puede ser ventajoso utilizar genes truncados que expresen proteínas truncadas. Los genes truncados preferidos codificarán normalmente un 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o un 99% de la proteína entera.

Ciertas proteínas se ejemplifican específicamente en la presente memoria. Dado que tales proteínas se muestran meramente a título de ejemplo, debe quedar claro de inmediato que proteínas variantes o equivalentes (y secuencias de nucleótidos que codifican las equivalentes de las mismas) están dotadas de una actividad igual o similar a la de las proteínas ejemplificadas. Las proteínas equivalentes deben guardar una similitud en sus aminoácidos (y/u homología) con una proteína ejemplificada. La identidad de aminoácidos será normalmente de por lo menos el 60%, preferiblemente por lo menos del 75%, más preferiblemente de por lo menos el 80%, incluso más preferiblemente de por lo menos el 90% y puede ser de por lo menos del 95%. Las proteínas preferidas también se pueden definir en términos de intervalos de identidad y/o similitud más concretos. Por ejemplo, la identidad y/o similitud puede ser del 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% en comparación con una secuencia ejemplificada o sugerida en la presente memoria. Se puede utilizar cualquiera de los números indicados arriba para definir los límites superior e inferior.

A menos que se indique otra cosa, en la presente memoria la identidad y/o similitud porcentuales entre las secuencias de dos ácidos nucleicos se han calculado utilizando el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, modificado según Karlin y Altschul, 1993. Este algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST se llevan a cabo con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12. Se puede utilizar el Gapped BLAST del modo descrito en Altschul *et al.*, 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se emplean los parámetros por defecto de cada programa (NBLAST y XBLAST). Véase el sitio web de NCBI/NIH. Para obtener alineaciones con huecos a efectos comparativos, se utilizó la función AlignX de Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., North Bethesda, Md., EE.UU.) empleando los parámetros por defecto. Estos fueron: una penalización por apertura de hueco de 15, una penalización por extensión de hueco de 6,66, y un intervalo de penalización por separación de hueco de 8.

También se pueden modificar diversas propiedades y características tridimensionales de la proteína sin afectar negativamente a la actividad/funcionalidad de la misma. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se pueden tolerar o hacer sin afectar negativamente a la actividad y/o la configuración tridimensional de la molécula. Los aminoácidos se pueden clasificar en las siguientes clases: no polares, polares sin carga, básicos y ácidos. Las sustituciones conservadoras en las que un aminoácido de una clase es sustituido por otro aminoácido del mismo tipo quedan dentro del ámbito de la presente invención siempre que la sustitución no afecte negativamente a la actividad biológica del compuesto. La Tabla 5 contiene un listado de ejemplos de aminoácidos pertenecientes a cada clase.

Tabla 5

Clase de aminoácido	Ejemplos de aminoácidos
No polar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polar sin carga	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácido	Asp, Glu
Básico	Lys, Arg, His

En ciertos casos también se pueden hacer sustituciones no conservadoras, pero se prefieren las sustituciones que no deterioren significativamente la actividad funcional/biológica de la proteína.

En la presente memoria, la alusión a polinucleótidos “aislados” y/o proteínas “purificadas” se refiere a dichas moléculas cuando no están asociadas con otras moléculas de su tipo con las que se encuentran en la naturaleza. Por tanto, la referencia a “aislado/a” y/o “purificado/a” implica la intervención humana tal y como se describe en la

presente memoria. Por ejemplo, un “gen” bacteriano de la presente invención introducido en una planta para ser expresado es un “polinucleótido aislado”. De forma similar, una proteína derivada de una proteína bacteriana y producida por una planta es una “proteína aislada”.

- 5 Debido a la degeneración/redundancia del código genético, varias secuencias de ADN pueden codificar las secuencias de aminoácidos reveladas en la presente memoria. Una persona experta en la materia sabrá crear secuencias de ADN alternativas que codifican las mismas o básicamente las mismas proteínas. Se exponen con mayor detalle a continuación en la sección titulada “Optimización de la secuencia para la expresión en vegetales”.

- 10 Optimización de la secuencia para la expresión en vegetales. Para obtener una elevada expresión de genes heterólogos en plantas se prefiere en general rediseñar con técnicas de ingeniería genética los genes, de modo que se expresen con más eficiencia en el citoplasma de las células vegetales. El maíz es una de tales plantas en las que puede ser preferible rediseñar el gen o genes heterólogos antes de la transformación para aumentar su nivel de expresión en dicha planta. Por consiguiente, una etapa adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana consiste en la modificación de un gen heterólogo para lograr una expresión óptima, utilizando una preferencia codónica más estrechamente alineada con la secuencia de la planta diana, ya sea dicotiledónea o monocotiledónea. Las secuencias también se pueden optimizar para la expresión en cualquiera de los tipos concretos de plantas expuestos a lo largo de la presente memoria.

- 15 Hospedadores transgénicos. Los genes que codifican las proteínas de la presente invención se pueden introducir en una amplia variedad de hospedadores microbianos o vegetales. La presente invención incluye células vegetales transgénicas y plantas transgénicas. Las plantas (y células vegetales) preferidas son maíz, *Arabidopsis*, tabaco, soja, algodón, canola, arroz, trigo, césped y hierbas de pasto, y similares. También se pueden crear otros tipos de plantas transgénicas según la presente invención, tales como frutas, hortalizas y árboles. Más en general, en varios aspectos de la presente invención se pueden utilizar dicotiledóneas y/o monocotiledóneas.

- 20 En las formas de realización preferidas, la expresión del gen propicia, directa- o indirectamente, la producción intracelular (y el mantenimiento) de la proteína o proteínas de interés. De esta manera, las plantas se pueden convertir en resistentes a herbicidas. Tales hospedadoras se pueden calificar como hospedadoras y/o células transgénicas, recombinantes, transformadas y/o transfectadas. En ciertos aspectos de la presente invención (por ejemplo, en lo que concierne a la clonación y la preparación del gen de interés), se pueden producir y utilizar células microbianas (preferiblemente bacterianas) siguiendo técnicas estándar, con el beneficio de la presente descripción.

- 25 Las células vegetales transfectadas con un polinucleótido se pueden regenerar en plantas enteras. La presente invención incluye cultivos celulares, que incluyen cultivos de tejidos celulares, cultivos líquidos y cultivos en placa. Las semillas producidas y/o utilizadas para engendrar plantas de la presente invención también quedan incluidas dentro del ámbito de la misma; otros tejidos y partes de las plantas también quedan incluidos en ella. También se proporciona una parte, progenie o propágulo asexual de la planta de la invención, en la que dicha parte, progenie o propágulo asexual comprende una pluralidad de células acordes a la invención, y en cuyo seno la expresión de dicho polinucleótido las convierte en tolerantes a un herbicida ariloxialcanoato. La presente invención también incluye métodos para producir plantas o células que comprenden un polinucleótido de la presente invención. Un método preferido para producir tales plantas consiste en sembrar una semilla de la presente invención.

- 30 Inserción de los genes para crear los hospedadores transgénicos. Un aspecto de la presente invención consiste en la transformación/transfección de plantas, células vegetales y otras células hospedadoras con polinucleótidos de la presente invención que expresan proteínas de la presente invención. Las plantas transformadas de esta manera se pueden convertir en resistentes a diversos herbicidas dotados de diferentes mecanismos de acción.

Existe una gran diversidad de métodos para introducir un gen que codifica una proteína deseada en el hospedador diana, en condiciones que permiten su mantenimiento y expresión estables. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la materia y aparecen descritos, por ejemplo, en la patente US nº 5.135.867.

- 35 Existe un gran número de vectores de clonación que comprenden un sistema de replicación en *E. coli* y un marcador para seleccionar las células transformadas que permiten hacer los preparativos para la inserción de genes foráneos en plantas superiores. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, series pUC, series M13mp, pACYC184, etc. Así pues, la secuencia que codifica la proteína puede ser insertada en el vector a través de una diana de restricción adecuada. El plásmido resultante se utiliza para la transformación de *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutritivo adecuado y después se recogen y se lisan. El plásmido se recupera con un proceso de purificación que lo separa del ADN genómico. Como métodos de análisis se emplean en general análisis de la secuencia, análisis de restricción, electroforesis y otros métodos de biología molecular y bioquímicos. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN utilizada se puede digerir con enzimas de restricción y unirse a la secuencia de ADN contigua. Cada secuencia plasmídica se puede clonar en el mismo o en otros plásmidos.

- 40 Dependiendo del método escogido para insertar los genes deseados en la planta, pueden ser necesarias otras secuencias de ADN. Si, por ejemplo, se escoge el plásmido Ti o Ri para la transformación de la célula vegetal, entonces como mínimo el borde derecho del T-ADN del plásmido, y a menudo tanto este como el borde izquierdo, debe estar unido como región flanqueadora a los genes que se desean insertar. El uso del T-ADN para la

transformación de células vegetales ha sido ampliamente investigado y descrito en EP 120 516; Hoekema (1985); Fraley *et al.* (1986); y An *et al.* (1985).

Son numerosas las técnicas disponibles para insertar ADN en una célula hospedadora vegetal. Entre ellas se cuentan la transformación con T-ADN por medio de *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformación, fusión, inyección, biobalística (bombardeo con micropartículas), triquitas de carburo de silicio, chorro de aerosol, PEG o electroporación, aparte de otros métodos factibles. Si para la transformación se opta por las agrobacterias, el ADN a insertar debe estar clonado en plásmidos especiales, ya sea en un vector intermediario o en un vector binario. Los vectores intermediarios se pueden integrar en el plásmido Ti o Ri mediante recombinación homóloga gracias a secuencias que son homólogas con las secuencias del T-ADN. El plásmido Ti o Ri también comprende una región *vir* necesaria para la transferencia del T-ADN. Los vectores intermediarios no se pueden autorreplicar en las agrobacterias y para su transferencia a *Agrobacterium tumefaciens* se precisa un plásmido auxiliar (conjugación). En cambio, los vectores binarios se pueden autorreplicar tanto en *E. coli* como en las agrobacterias. Éstos comprenden un gen marcador de selección y un conector o policonector que están enmarcados por los bordes derecho e izquierdo del T-ADN. Este tipo de vectores se pueden transformar directamente en las agrobacterias (Holsters, 1978). El *Agrobacterium* utilizado como célula hospedadora debe contener un plásmido dotado de una región *vir*. La región *vir* es necesaria para la transferencia del T-ADN a la célula vegetal. Puede contener T-ADN adicional. La bacteria transformada de ese modo se utiliza para la transformación de las células vegetales. Se pueden cultivar ventajosamente explantes vegetales con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para transferir el ADN a la célula vegetal y, a continuación, regenerar plantas enteras a partir del material vegetal infectado (por ejemplo pedazos de hojas, segmentos de pedúnculo, raíces y protoplastos o células cultivadas en suspensión) en un medio adecuado, que puede contener antibióticos o biocidas como agentes de selección. Las plantas obtenidas se pueden analizar para detectar la presencia del ADN insertado. En el caso de la inyección y la electroporación no es necesario recurrir a plásmidos especiales y se pueden emplear tipos convencionales como los derivados de pUC, entre otros.

Las células transformadas crecen en el interior de las plantas de la manera habitual. Pueden formar células germinales y transmitir el carácter o caracteres transformados a la progenie. Estas plantas a su vez se pueden cultivar de manera normal y cruzarse con plantas portadoras de los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los híbridos resultantes poseen las propiedades fenotípicas correspondientes.

En algunas formas de realización preferidas de la invención, los genes que codifican la proteína bacteriana se expresan a través de unidades transcripcionales insertadas en el genoma de la planta. Preferiblemente, dichas unidades transcripcionales son vectores recombinantes capaces de lograr una integración estable en el genoma vegetal y permitir la selección de las líneas vegetales transformadas que expresan el ARNm que codifica las proteínas.

Una vez el ADN insertado ha quedado integrado en el genoma, permanece relativamente estable en él (y no vuelve a salir). Suele contener un marcador de selección que confiere a las células de la planta transformada resistencia frente a un biocida o un antibiótico como kanamicina, G418, bleomicina, higromicina o cloramfenicol, entre otros. Algunos marcadores vegetales seleccionables también suelen proporcionar resistencia a varios herbicidas como glufosinato (PAT), glifosato (EPSPS), imazetapir (AHAS) y muchos otros. El marcador utilizado debe permitir la selección de las células transformadas en lugar de las células que no contienen el ADN insertado. El gen o genes de interés se expresan preferiblemente por medio de promotores constitutivos o inducibles en la célula vegetal. Una vez expresado, el ARNm se traduce en proteínas, incorporando aminoácidos de interés en ellas. Los genes que codifican una proteína expresada en las células vegetales pueden estar sometidos al control de un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido o un promotor inducible.

Existen varias técnicas para introducir vectores recombinantes foráneos en células vegetales y para obtener plantas que mantengan y expresen de manera estable el gen introducido. Entre dichas técnicas se incluyen la introducción directa en las células de micropartículas recubiertas con material genético (patentes US nº 4.945.050 concedida a Cornell y 5.141.131 concedida a DowElanco, ahora Dow AgroSciences, LLC). Asimismo, se pueden transformar plantas utilizando técnicas con *Agrobacterium*, véanse las Patentes US nº 5.177.010 concedida a la University of Toledo y 5.104.310 a Texas A&M, la solicitud de patente europea 0131624B1; las solicitudes de patente europea 120516, 159418B1 y 176.112 concedidas a Schilperoot; las patentes US nº 5.149.645, 5.469.976, 5.464.763 y 4.940.838 y 4.693.976 concedidas a Schilperoot; las solicitudes de patente europea 116718, 290799, 320500, todas concedidas a Max Planck; las solicitudes de patente europea 604662 y 627752 y la patente US nº 5.591.616, concedidas a Japan Tobacco; las solicitudes de patente europea 0267159 y 0292435 y la patente US nº 5.231.019, todas concedidas a Ciba Geigy, ahora Syngenta; las patentes US nº 5.463.174 y 4.762.785, ambas concedidas a Calgene; y las patentes US nº 5.004.863 y 5.159.135, ambas concedidas a Agracetus. Otros métodos de transformación incluyen las técnicas con triquitas. Véanse las patentes US nº 5.302.523 y 5.464.765, ambas concedidas a Zeneca, ahora Syngenta. Las técnicas de electroporación también han sido utilizadas para transformar plantas. Véase la WO 87/06614 concedida a Boyce Thompson Institute; las patentes US nº 5.472.869 y 5.384.253, ambas concedidas a Dekalb; y WO 92/09696 y WO 93/21335, ambas otorgadas a Plant Genetic Systems. Asimismo, también se pueden usar vectores virales para producir plantas transgénicas que expresen la proteína de interés. Por ejemplo, se pueden transformar plantas monocotiledóneas con un vector viral utilizando los métodos descritos en la patente US nº 5.569.597 concedida a Mycogen Plant Science y Ciba-Geigy (ahora Syngenta), así

como en las patentes US nº 5.589.367 y 5.316.931, ambas concedidas a Biosource, ahora Large Scale Biology.

Como se ha mencionado con anterioridad, la manera de introducir el constructo de ADN en la planta hospedadora no es crítica para esta invención. Se puede emplear cualquier método que proporcione una transformación eficiente. Por ejemplo, en la presente memoria se describen varios métodos para la transformación de células vegetales que incluyen el uso de plásmidos Ti o Ri y similares para llevar a cabo la transformación mediada por *Agrobacterium*. En muchos casos, será deseable que el constructo utilizado para la transformación disponga en uno o ambos lados de los bordes del T-ADN, más concretamente el borde derecho. Estos resulta particularmente útil cuando el constructo utiliza *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como vehículo de la transformación, aunque los bordes del T-ADN también pueden ser útiles con otros vehículos de transformación. Cuando se utiliza *Agrobacterium* para la transformación de células vegetales, se puede utilizar un vector que puede ser introducido en el hospedador para la recombinación homóloga con el T-ADN o con el plásmido Ti o Ri presente en el anfitrión. El vector se puede introducir a través de electroporación, cruzamiento triparental y otras técnicas de transformación de bacterias gramnegativas conocidas por los expertos en la disciplina. El modo en que se lleva a cabo la transformación con el vector en el *Agrobacterium* hospedador no es crítico para esta invención. El plásmido Ti o Ri que contiene el T-ADN para la recombinación no tiene por qué ser capaz de provocar la formación de agallas y no resulta crítico para dicha invención siempre que dicho hospedador disponga de genes vir.

En ciertos casos de transformación con *Agrobacterium*, el constructo de expresión situado entre los bordes del T-ADN se insertará en un vector de amplio espectro como pRK2 o derivados del mismo, tal y como se describe en Ditta *et al.* (1980) y EPO 0 120 515. El constructo de expresión y el T-ADN deben contener uno o más marcadores como los descritos en la presente memoria que permitan la selección del *Agrobacterium* transformado y de las células vegetales transformadas. El marcador concreto no es esencial para esta invención y dependerá del hospedador y de la construcción utilizada.

Para la transformación de las células vegetales con *Agrobacterium* se pueden combinar e incubar explantes con el *Agrobacterium* transformado durante el tiempo suficiente para posibilitar la transformación de los mismos. Después de la transformación, las agrobacterias son eliminadas por selección con el antibiótico adecuado y las células vegetales se cultivan en el medio selectivo apropiado. Una vez formados los callos, se puede estimular la formación de brotes empleando las hormonas vegetales adecuadas de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica de cultivo de tejidos vegetales y regeneración de plantas. No obstante, no siempre es necesario un estadio intermedio de callo. Después de la formación del brote, dichas células vegetales pueden ser transferidas a un medio que estimula la formación de raíces y completar así la regeneración de la planta. Las plantas pueden entonces cultivarse para obtener semillas, y estas se pueden utilizar para engendrar las generaciones futuras. Con independencia de la técnica de transformación utilizada, es preferible que el gen codificador de una proteína bacteriana se incorpore a un vector de transferencia génica adaptado para expresar dicho gen en una célula vegetal, incluyendo en el vector un elemento regulador promotor vegetal, así como regiones de terminación de la transcripción no traducidas 3' como Nos y similares.

Además de las numerosas técnicas disponibles para transformar plantas, también puede variar el tipo de tejido que entra en contacto con los genes foráneos. Dicho tejido incluiría, entre otros tipos: tejido embriogénico, tejido de callo de los tipos I, II y III, hipocótilo, meristemo, tejido radicular, tejidos para la expresión en floema, y similares. Casi todos los tejidos vegetales pueden ser transformados durante la desdiferenciación mediante técnicas adecuadas descritas en la presente memoria.

Como se ha mencionado anteriormente, si se desea es posible utilizar diferentes marcadores seleccionables. La preferencia por un marcador concreto queda a discreción del experto, pero se puede utilizar cualquiera de los siguientes marcadores seleccionables con cualquier otro gen no enumerado en la presente memoria que pueda funcionar con un marcado seleccionable. Tales marcadores seleccionables incluyen, entre otros, el gen de la aminoglucósido fosfotransferasa del transposón Tn5 (Aph II) que codifica la resistencia a los antibióticos kanamicina, neomicina y G418, así como aquellos genes que codifican resistencia o tolerancia al glifosato, higromicina, metotrexato, fosfotricina (bialafos o glufosinato), imidazolinonas, sulfonilureas y herbicidas triazolopirimidínicos, como clorsulfuron, bromoxinilo, dalapon y similares.

Además de un marcador seleccionable, puede ser deseable utilizar un gen marcador (*reporter*). En ciertos casos se puede utilizar un gen marcador con o sin un marcador seleccionable. Los genes marcadores son genes que normalmente no están presentes en el organismo o tejido receptor y que codifican proteínas que ocasionan un cambio fenotípico o tienen una propiedad enzimática. Ejemplos de tales genes se pueden consultar en Weising *et al.*, 1988. Los genes marcadores preferidos incluyen la beta-glucuronidasa (GUS) del locus *uidA* de *E. coli*, el gen de la cloramfenicol acetiltransferasa del Tn9 de *E. coli*, la proteína fluorescente verde de la medusa bioluminescente *Aequorea victoria* y los genes de luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*. A continuación se puede efectuar un ensayo para detectar la expresión del gen marcador en el momento adecuado una vez introducido en las células receptoras. Un ensayo tal preferido consiste en el uso del gen que codifica la beta-glucuronidasa (GUS) del locus *uidA* de *E. coli* del modo descrito por Jefferson *et al.*, (1987) para identificar células transformadas.

Además de los elementos reguladores promotores de origen vegetal, en células vegetales se pueden utilizar elementos de esa naturaleza procedentes de otras fuentes para expresar genes foráneos. Por ejemplo, se pueden

utilizar promotores reguladores de origen bacteriano, como el promotor de la octopina sintasa, el promotor de la nopalina sintasa, el promotor de la mannopina sintasa; promotores de origen viral, como el virus del mosaico de la coliflor (35S y 19S), 35T (un promotor 35S modificado genéticamente, véase la Patente US nº 6.166.302, sobre todo el Ejemplo 7E) y similares. Los promotores reguladores vegetales incluyen, entre otros, la subunidad pequeña (ssu) de la ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP) carboxilasa, el promotor de la beta-conglicina, el promotor de la beta-faseolina, promotor de ADH, promotores de shock térmico y promotores específicos de tejido. Otros elementos como regiones de anclaje a matriz, regiones de anclaje a andamio, intrones, intensificadores, secuencias de poliadenilación y similares pueden estar presentes y mejorar la eficiencia de la transcripción o de la integración del ADN. Tales elementos pueden ser necesarios, pero no necesariamente, para la función del ADN, aunque pueden facilitar una mejor expresión o funcionamiento del ADN modificando la transcripción, la estabilidad del ARNm, y similares. Tales elementos pueden incluirse en el ADN a voluntad para obtener un rendimiento óptimo del ADN transformado en la planta. Los elementos habituales incluyen, entre otros, Adh-intrón 1, Adh-intrón 6, la secuencia líder de la proteína de la cápside del virus del mosaico de la alfalfa, secuencias UTR de la osmotina, la secuencia líder de la proteína de la cápside del virus del rayado del maíz, así como otras disponibles para el experto. También se pueden utilizar elementos reguladores consistentes en promotores constitutivos que provocan la expresión continua del gen en todos los tipos celulares y en todo momento (por ejemplo actina, ubiquitina, CaMV 35S, y similares). Por otra parte, algunos elementos reguladores consistentes en promotores específicos de tejido son los responsables de la expresión génica en ciertos tipos de células y tejidos, como las hojas o las semillas (por ejemplo zeína, oleosina, napina, ACP, globulina y similares) y estos también pueden ser utilizados.

Los elementos reguladores promotores también pueden permanecer activos (o inactivos) durante una cierta etapa del desarrollo de la planta, así como activos en ciertos tejidos y órganos vegetales. Ejemplos de tales promotores incluyen, entre otros, elementos reguladores promotores específicos del polen, específicos del embrión, específicos de los estigmas del maíz, específicos de la fibra del algodón, específicos de las raíces, específicos del endospermo de las semillas o específicos de la fase vegetativa, y similares. En ciertas circunstancias podría ser deseable utilizar un elemento regulador consistente en un promotor inducible, que sea responsable de la expresión de genes como respuesta a una señal específica, por ejemplo: un estímulo físico (genes de shock térmico), luz (RUBP carboxilasa), hormona (Em), metabolitos, sustancias químicas (respuesta a tetraciclina) y estrés. También se pueden utilizar otros elementos de transcripción y traducción que funcionen en plantas. En la técnica se conocen numerosos vectores de transformación génica específicos para vegetales.

Los sistemas basados en virus de ARN vegetales también se pueden usar para expresar proteínas bacterianas. De ese modo, el gen codificante de una proteína se puede insertar en una región promotora de la cápside de un virus vegetal adecuado para infectar a la planta hospedadora de interés. La proteína puede entonces expresarse y conferir protección a la planta frente al daño causado por el herbicida. Sistemas basados en virus de ARN vegetales aparecen descritos en la patente US nº 5.500.360 concedida a Mycogen Plant Sciences, Inc. y en las patentes US nº 5.316.931 y 5.589.367 concedidas a Biosource, ahora Large Scale Biology.

A continuación se describen ejemplos de procedimientos para poner en práctica la invención. Tales ejemplos no se deben considerar como excluyentes. Todos los porcentajes se indican en peso y todas las proporciones de mezcla de solventes se expresan en volumen a menos que se indique otra cosa.

Ejemplo 1 - Método para la identificación de genes que confieren resistencia al 2,4-D en la planta

Para identificar genes capaces de degradar herbicidas en la planta se puede comenzar consultando las bases de datos públicas como NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Como punto de partida, es preciso disponer de una secuencia génica funcional identificada que codifique una proteína con las características deseadas (en este caso la actividad α -cetoglutarato dioxigenasa). Esta secuencia proteínica se utiliza como dato de entrada para el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997) que la comparará con las secuencias proteínicas disponibles en la NCBI. Utilizando los ajustes por defecto, la búsqueda da como resultado más de 100 secuencias proteínicas con diversos grados de homología. Este abanico ofrece desde una identidad de aminoácidos elevada (85-98%) hasta una identidad baja (23-32%). Normalmente, se supone que sólo las secuencias con una homología elevada ostentan propiedades similares a la secuencia introducida. En este caso sólo se escogieron las secuencias con una homología $\leq 50\%$. A continuación vamos a mostrar a título de ejemplo que la clonación y la expresión recombinante de homólogos con apenas un 27% de aminoácidos conservados es factible como medio para conferir niveles comerciales de resistencia no sólo frente al herbicida previsto, sino también frente a sustratos que nunca se habían puesto a prueba con tales enzimas.

PCR y clonación del gen en pET. En la base de datos de NCBI se identificó un gen (*rdpA*) (véase el sitio web ncbi.nlm.nih.gov; entrada nº AF516752) homólogo del *tfdA* de *Ralstonia eutropha* que sólo guardaba con este una identidad de aminoácidos del 28%. La identidad porcentual se determinó traduciendo primero a proteína las secuencias de ADN de *rdpA* y *tfdA* que figuraban en la base de datos, y realizando después el alineamiento múltiple de las secuencias con el programa ClustalW, del paquete de software Vector NTI.

La cepa de *Sphingobium herbicidovorans* portadora del gen *rdpA* se obtuvo de la ATCC (*American Type Culture Collection*, cepa nº 700291). La cepa liofilizada se revivió siguiendo el protocolo de la ATCC y se conservó a -80°C en glicerol al 20% para uso interno como cepa Dow Bacterial DB 536. A partir de esta solución madre congelada,

para aislar las células se sembró una placa de agar de triptona y soja con el contenido de un asa de Henle y se incubó a 28° C durante 3 días.

Se seleccionó una sola colonia para sembrar en 100 ml de caldo de triptona y soja en un matraz de 500 ml con tres placas deflectoras, que se dejó incubar hasta el día siguiente a 28° C en un agitador de plataforma a 150 rpm. De este cultivo se aisló todo el ADN con el protocolo para gramnegativos del kit DNeasy de Qiagen (nº catálogo de Qiagen 69504). Para amplificar el gen diana a partir del ADN genómico se diseñaron los siguientes cebadores: Directo, 5' TCT AGA AGG AGA TAT ACC ATG CAT GCT GCA CTG TCC CCC CTC TCC CAG CG 3' [(SEC ID nº 1) (se añadió una diana de restricción para Xba I y un sitio de unión a ribosoma (RBS))], e Inverso, 5' CTC GAG TTA CTA GCG CGC CGG GCG CAC GCC ACC GAC CG 3' [(SEC ID nº 2) (se le añadió un codón extra de parada y una diana para Xho I)].

Se prepararon reacciones de veinte microlitros del modo siguiente: MasterMix 8 µl, cada cebador 1 µl (50 pmol/µl), ADNg 2,5 µl, H₂O 7,5 µl. A continuación se efectuó la PCR en las condiciones siguientes: 94° C durante 45 s, 52° C durante 1,5 minutos, 72° C durante 1,5 minutos, durante 30 ciclos, seguidos por un ciclo final a 72° C durante 5 minutos, utilizando un kit Master Taq de Eppendorf (Eppendorf, nº catálogo 0032 002.250). El producto resultante de la PCR ~1 kb se clonó en pCR 2.1 (Invitrogen, nº catálogo K4550-40) siguiendo el protocolo incluido y utilizando como cepa hospedadora *E. coli* TOP10F' químicamente competente para verificar la secuencia de nucleótidos.

Diez de las colonias blancas resultantes se introdujeron en 4 ml de caldo Luria + 50 µg/ml de kanamicina (abreviado, LB K) y se dejaron crecer hasta el día siguiente a 37° C con agitación. Los plásmidos de cada cultivo se purificaron con el kit Wizard Plus SV de Promega (Promega, nº catálogo A1460) siguiendo el protocolo incluido. La secuenciación se llevó a cabo con el kit CEQ Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, nº catálogo 608120) utilizando un cebador directo de M13 (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') (SEC ID nº 16) y un cebador inverso de M13 (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') (SEC ID nº 17), según las instrucciones del fabricante. Esta secuencia génica (SEC ID nº 3) y su proteína correspondiente (SEC ID nº 9) recibieron la nueva designación general de AAD-1 (v1) (ariloxialcanoato dioxigenasa) para mantener la coherencia interna.

Con las enzimas de restricción correspondientes a las dianas añadidas con los conectores del cebador (Xba 1, Xho 1) se escindió el gen AAD-1 (v1) del vector pCR2.1 y se ligó a un vector pET 280 con resistencia a estreptomycin/espectinomycin. Los productos ligados se transformaron a continuación en *E. coli* TOP10F' y se cultivaron en placas de agar con caldo Luria + 50 µg/ml de estreptomycin y espectinomycin (abreviado, LB S/S). Para distinguir entre las ligaciones AAD-1 (v1):pET 280 y pCR2.1:pET 280, se resembraron unas 20 colonias aisladas en 6 ml de LB S/S y se cultivaron a 37° C durante 4 horas con agitación.

A continuación cada cultivo se sembró en placas con LB K, que se incubaron a 37° C hasta el día siguiente. Las colonias que crecieron en el medio LB K se supusieron portadoras del vector pCR2.1 ligado y fueron descartadas. Los plásmidos de los cultivos restantes se aislaron del modo antes indicado. Este constructo de expresión recibió la designación de pDAB 3203.

Ejemplo 2 - Expresión y análisis

2.1-Análisis por HPLC

El plásmido pDAB 3203 se mantuvo congelado a -80° C en células TOP10F' (Invitrogen) como cepa Dow Recombinant DR 1878. Para la expresión, el ADN plasmídico del cultivo de TOP10F' se purificó con el kit Wizard de Promega (Fisher, nº catálogo PR-A1460) se transformó en células BL-21 Star (DE3) (Invitrogen, nº catálogo C6010-03) siguiendo el protocolo del fabricante. Después de la transformación, 50 µl de las células se sembraron en placas de agar LB S/S y se incubaron hasta el día siguiente a 37° C.

La mañana siguiente, todas las colonias de la placa se recogieron y se introdujeron en 100 ml de LB en un matraz de 500 ml con tres placas deflectoras y se incubaron a 37° C/200 rpm durante 1 h. A continuación, se indujo la expresión del gen con IPTG 1 mM y se dejaron incubar otras 4 h a 30° C/200 rpm. Los 100 ml del cultivo se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min, se descartaron los sobrenadantes y los sedimentos se resuspendieron en 10 ml de MOPS 50 mM. Después se sometieron a tres rondas de sonicación de 45 s para lisar las células. Los lisados se centrifugaron a 15.000 rpm para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se pipeteó y almacenó a 4° C. Para comprobar la expresión recombinante se hizo correr una alícuota de 20 µl en gel Tris Glicina al 4-20% (Invitrogen, nº catálogo EC60255).

Una vez confirmada la expresión, la actividad enzimática se analizó del modo siguiente. En primer lugar, se desalinizó una alícuota del extracto celular con un cartucho PD-10 (Amersham, nº catálogo 17-0435-01), que seguidamente se utilizó para las reacciones enzimáticas con herbicida.

En cada reacción se emplearon los siguientes elementos: 2,4-D (125 µg/ml), [ascorbato (1 mM), ión ferroso (50 µM), α-cetoglutarato (1 mM), en MOPS 100 mM], extracto celular (100 µl). La reacción se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min., tras lo cual se detuvo con la adición de HCl 0,1 N hasta que el pH se situó entre 2 y 3. La mitad del volumen de reacción (~500 µl) se reservó para el bioanálisis, y el volumen restante se sometió a una extracción en fase orgánica con tubos de extracción de fase sólida (Fisher, nº catálogo 11-131-6) y 400 µl de

acetonitrilo + TFA 0,05% como eluyente.

Los extractos se analizaron con HPLC para detectar la pérdida del pico de 2,4-D o la presencia de cualquier otro pico producto de la degradación o modificación del 2,4-D. Las condiciones de la HPLC fueron: Luna 10 μ C18(2) 250 \times 4,6 mm (Phenomenex, n° catálogo 00G-4253-E0), elución con ACN 50% + TFA 0,05%: H₂O 50% + TFA 0,05% a ACN 100% + TFA 0,05% durante 5 min.

2.2-Bioanálisis en placa para determinar la degradación del herbicida.

Los bioanálisis con plantas permitieron averiguar si la transformación enzimática *in vitro* del herbicida comportaba la pérdida de su actividad herbicida. Dada la naturaleza selectiva de los herbicidas estudiados (monocotiledóneas controladas con herbicidas AOPP y dicotiledóneas controladas con herbicidas auxínicos), en el ensayo se emplearon *Agrostis palustris* natural var. Pencross como planta monocotiledónea y *Arabidopsis thaliana* var. Columbia como dicotiledónea. Ambas especies pueden hacerse germinar y crecer en placas de Petri pequeñas.

Las semillas de *Arabidopsis* se sometieron a esterilización superficial durante 10 min. en una solución al 50% de lejía comercial/agua desionizada (v/v) con 1 μ l de Tween-20 añadido como humectante con agitación vigorosa (agitador a 250 rpm). La solución de lejía se decantó en el interior de una campana estéril y se lavó tres veces con agua estéril. La superficie de las semillas de agróstide se esterilizó durante 20 minutos de forma similar.

Entre veinte y treinta semillas esterilizadas de cada especie se depositaron en medio de ensayo en placa de agar solidificado estéril (PTM, *Plate Test Medium*) [KNO₃ 2,5 mM, KH₂PO₄ 2,5 mM, FeSO₄ 50 mM, NaEDTA 10 mM (pH 8,0), MgSO₄ 2 mM, Ca(NO₃)₂ 2 mM, H₃BO₃ 70 μ M, MnCl₂ 14 μ M, CuSO₄ 0,5 μ M, ZnSO₄ 1 μ M, NaMoO₄·2H₂O 0,2 μ M, NaCl 10 μ M, CoCl₂·H₂O 10 nM, sacarosa 0,8% (p/v), agarosa 0,4% (p/v)] en placas de Petri de 60 \times 15 mm (Falcon 1007). El PTM se modificó añadiendo hasta seis dosis de patrones de los herbicidas a analizar o diluciones de solución de herbicida-enzima a analizar, de modo tal que los incrementos de concentración de 4x abarcaran un intervalo de dosificación de tres órdenes de magnitud, con el GR₅₀ (reducción del crecimiento del 50%) situado aproximadamente en el centro del intervalo.

En las soluciones problema de herbicida-enzima, la concentración máxima se determinó a partir de la concentración nominal antes de que se produjera la degradación enzimática. Las semillas se esparcieron uniformemente añadiendo 3 ml de PTM fundido de la misma composición, agitándolo con movimientos circulares y dejándolo solidificar. Las placas se cerraron y se mantuvieron en condiciones estériles en una cámara de crecimiento con poca luz (24 h día⁻¹, 100 μ E/m²s⁻¹, 23° C) durante 7 días. La longitud de las raíces y de las raíces+brote se midieron en cinco plantas escogidas al azar de *Arabidopsis* y de agróstide, respectivamente, y se calculó la longitud media promedio (porcentaje del control no tratado) respecto a la concentración nominal del herbicida y el GR₅₀.

Este bioanálisis permitió confirmar la pérdida de la actividad herbicida fruto de la degradación por la AAD-1 (v1) de la cadena lateral de oxialcanoato en varios herbicidas de uso habitual en agronomía. En varios casos, el producto fenólico previsto se había eluido junto con el ácido original en la HPLC y el bioanálisis sirvió como principal prueba de la degradación del herbicida. Las Tablas 6 y 7 ofrecen los sustratos herbicidas analizados.

Tabla 6. Bioanálisis en placa con *Arabidopsis* de sustratos auxínicos comerciales de tipo fenoxi y piridiniloxialcanoato.

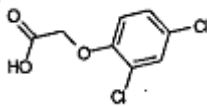
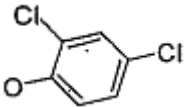
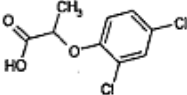
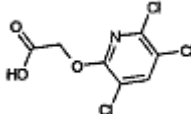
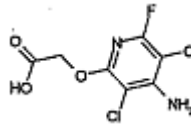
Producto químico analizado	GR ₅₀ (nM)			Cociente GR ₅₀ **	Estructura
	Prod. químico solo	Prod. químico + Vector blanco*	Prod. químico + AAD-1 v1		
2,4-D	22	17	267	16	
DCP	>1000	nd	nd	nd	
Diclorprop	nd	30	1000	33	

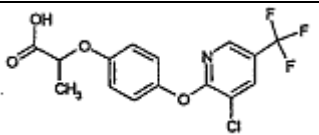
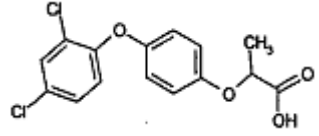
Tabla 6. Bioanálisis en placa con *Arabidopsis* de sustratos auxínicos comerciales de tipo fenoxi y piridiniloxialcanoato.

Producto químico analizado	GR ₅₀ (nM)			Cociente GR ₅₀ **	Estructura
	Prod. químico solo	Prod. químico + Vector blanco*	Prod. químico + AAD-1 v1		
Triclopir	255	1000	1000	1	
Fluroxipir	2200	2250	1825	<1	

*El vector blanco representa el tratamiento con lisado celular en que el vector pET de *E. coli* no tenía insertado ningún gen.

5 **El cociente GR₅₀ es una medida de la pérdida de la actividad herbicida en el tratamiento con lisado que expresa la enzima respecto a los tratamientos con el vector blanco. El umbral para detectar la pérdida de actividad herbicida con este ensayo se sitúa en ≥ 2 .

Tabla 7. Bioanálisis en placa con agróstide de sustratos ariloxifenoxialcanoato inhibidores de la ACCasa.

Producto químico analizado	GR ₅₀ (nM)			Cociente GR ₅₀ **	Estructura
	Prod. químico solo	Prod. químico + Vector blanco*	Prod. químico + AAD-1 v1		
Haloxifop-RS	28	21	520	25	
Diclofop-RS	nd	20	130	7	

10 *El vector blanco representa el tratamiento con lisado celular en que el vector pET de *E. coli* no tenía insertado ningún gen.

**El cociente GR₅₀ es una medida de la pérdida de la actividad herbicida en el tratamiento con lisado que expresa la enzima respecto a los tratamientos con el vector blanco. El umbral para detectar la pérdida de actividad herbicida con este ensayo se sitúa en ≥ 2 .

2.3-Resultados de la HPLC

15 La bibliografía revela que las enzimas dioxigenasa de esta clase requieren α -cetoglutarato como cosustrato (véase un esquema general en la figura 1) y el ión ferroso para unirse al centro activo. Otros experimentos presentes en la bibliografía han demostrado que la adición de ascorbato aumenta la actividad enzimática al mantener el hierro en estado reducido, lo que evita la degradación de la enzima. A tenor de este trabajo previo, se prepararon ensayos iniciales suponiendo que la enzima de interés actuaría del mismo modo que otros miembros de esta clase general de enzimas.

20

Sorprendentemente, los resultados iniciales de la HPLC revelaron la presencia de un nuevo pico en el minuto 6,1, además de un pico reducido de 2,4-D a los 5,5 min. Este nuevo pico no estaba presente en el análisis control. Para identificar inicialmente el pico de los 6,1 minutos, se analizó un control de DCP en las mismas condiciones y, como cabía esperar, éste también eluyó a los 6,1 minutos. La formación de este producto quedó confirmada por un análisis colorimétrico que detectó fenoles (véase el ejemplo 3.1), así como por una espectrometría de masas. Como se esperaba, la AAD-1 (v1) cataliza una reacción similar a la de otros miembros de esta clase de enzimas. En los bioanálisis estas mismas muestras también evidenciaron una pérdida casi completa de la actividad herbicida del 2,4-D en el ensayo en placa con *Arabidopsis* (Figura 2). Independientemente de las condiciones específicas del ensayo (tiempo de incubación más largo, más enzima), la HPLC reveló que sólo el 50-75% del 2,4-D pudo ser degradado a DCP. De hecho, la prolongación de la inducción de las células de *E. coli* BL-21 con IPTG sólo se tradujo en una reducción de la actividad de la enzima, a pesar de que se expresó una mayor cantidad de proteína recombinante.

Una vez demostrada la degradación del 2,4-D, se analizaron otros sustratos con grupos cíclicos similares (oxiacetatos y oxipropionatos). Los primeros compuestos analizados fueron los análogos piridínicos fluoroxipir y triclopir, que son piridiniloxiacetatos: no se detectó actividad enzimática en ninguno de ellos. Otros ensayos con varios análogos de estos dos piridiniloxiacetatos desprovistos de flúor o de los grupos amino tampoco revelaron degradación alguna. Resulta destacable, empero, que la adición de flúor en la posición 5 del 2,4-D provocara una pérdida casi total de la degradación enzimática (véanse más resultados en el apartado siguiente).

A continuación se analizaron los inhibidores de ACCasa haloxifop y diclofop en las mismas condiciones que el 2,4-D. (Los metabolitos fenólicos correspondientes coeluyeron con el compuesto original en las condiciones de HPLC empleadas). Los resultados de los bioanálisis de estas muestras revelaron una pérdida de la actividad herbicida tanto en el caso del haloxifop (Figura 3) como del diclofop. Tales resultados quedaron confirmados por el análisis colorimétrico, que también se utilizó para analizar una muestra más amplia de estos compuestos.

2.4-Bioanálisis en placa para la degradación del herbicida.

Los resultados de los bioanálisis corroboraron los resultados iniciales de la HPLC que indicaban una pérdida del 2,4-D original tras la incubación de soluciones del mismo con extractos sin purificar de AAD-1 recombinante (v1) (Figura 2). Asimismo, la actividad herbicida del ácido fenoxipropiónico dicloroprop, también se vio degradada de manera efectiva. El cociente GR₅₀ nominal correspondiente a la solución de herbicida+enzima y a la solución de herbicida sola sirvió como medida de la pérdida de actividad del herbicida original causada por la actividad enzimática. Un valor de 2-3 estuvo correlacionado normalmente con una pérdida del 50-75% de la actividad del herbicida original (Tabla 6). Con frecuencia no se pudo determinar el GR₅₀ tras el tratamiento enzimático porque, de hecho, no quedaba actividad herbicida detectable.

Por su parte, los herbicidas AOPP también resultaron ser un sustrato excelente para la AAD-1 (v1), como demuestra la casi completa degradación de la actividad graminicida en el bioanálisis en placa con agróstide (Figura 3 y Tabla 7). Este hecho resulta significativo porque supone la primera descripción de un miembro de esta clase de enzimas que es activo contra herbicidas que no son auxínicos fenoxi. De ello se deduce que esta enzima es lo bastante promiscua para catabolizar sustancias químicas dotadas de subestructuras fenoxialcanoato similares, aunque posean mecanismos de acción herbicida completamente dispares.

Ejemplo 3 - Valoración *in vitro* de la actividad de la AAD-1 (v1) mediante la detección colorimétrica de compuestos fenólicos

3.1- Valoración de la AAD-1 (v1).

La actividad de la enzima AAD-1 (v1) se valoró con la detección colorimétrica de los productos fenólicos mediante un versión modificada del protocolo de Fukumori y Hausinger (1993) (*J. Biol. Chem.* 268: 24311-24317) que permitía el análisis de microplacas de 96 pocillos. El análisis colorimétrico para valorar la actividad de las dioxigenasas que hidrolizan el 2,4-D y el dicloroprop hasta convertirlo en 2,4-diclorofenol ya ha sido descrito. No obstante, se podrían producir otros fenoles distintos a partir de otros herbicidas ariloxialcanoato como haloxifop y cihalofop (véase la figura 4). El color desarrollado por varios fenoles se comparó con el del 2,4-diclorofenol con el método de detección descrito para averiguar qué productos fenólicos podrían detectarse fácilmente. Los fenoles y los análogos fenólicos se analizaron a una concentración final de 100 µM en 0,15 ml de MOPS 20 mM y pH 6,75 que contenía NH₄(FeSO₄)₂ 200 µM y ascorbato sódico 200 µM. Los fenoles derivados del haloxifop y del cihalofop presentaron colores equivalentes a los del 2,4-diclorofenol y, por tanto, se detectaron fácilmente. Los piridinoles derivados del fluoroxipir y el triclopir no generaron ningún color significativo. El color desarrollado por el 2,4-diclorofenol y el fenol de haloxifop resultó lineal y proporcional a la concentración de fenol en la valoración hasta ~500 µM. Una curva de calibración realizada en las condiciones de valoración estándar (160 µl de volumen final analizado) indicó que con 172 µM de fenol se obtenía una absorbancia a 510 nm de 0,1.

Los análisis de la enzima se efectuaron con un volumen total de 0,15 ml de MOPS 20 mM y pH 6,75 que contenían NH₄FeSO₄ 200 µM, ascorbato sódico 200 µM, α-cetoglutarato 1 mM, el sustrato adecuado (obtenido de una solución madre 100 mM y disuelto en DMSO) y enzima. Las valoraciones se iniciaron añadiendo el sustrato de ariloxialcanoato, enzima o α-cetoglutarato en el momento cero. Al cabo de 15 minutos de incubación a 25° C, la

reacción se detuvo añadiendo 10 µl de EDTA sódico 100 mM. El color se desarrolló añadiendo 15 µl de tampón a pH 10 (3,09 g de ácido bórico + 3,73 g de KCl + 44 ml de KOH 1 N), 1,5 µl de 4-aminoantipirina al 2% y 1,5 µl de ferricianuro potásico al 8%. Transcurridos de 10 a 20 min, se midió la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro de microplacas. Los blancos contenían todos los reactivos excepto la enzima para tener en cuenta la pequeña contaminación que a veces afecta a algunos sustratos por pequeñas cantidades de fenoles. Las valoraciones posteriores se refinaron modificando los reactivos añadidos, tal y como se indica a continuación: la reacción se detuvo añadiendo 30 µl de una mezcla 1:1:1 de EDTA sódico 50 mM, tampón a pH 10 y 4-aminoantipirina al 0,2%, y después 10 µl de ferricianuro potásico al 0,8%.

3.2-Extracción

Actividad de la AAD-1 recombinante (v1) expresada en *Escherichia coli*. Se resuspendieron sedimentos celulares de *E. coli* con Tris 0,1 M, pH 7,4 + lisozima 1 mg/ml (5 ml/células para un cultivo de 250 ml; 20 ml/células para 1 litro) a temperatura ambiente. Transcurridos unos 15 minutos con agitación ocasional, la suspensión se congeló en nitrógeno líquido y después se descongeló. Se añadió ADNasa a una concentración final de 0,02 mg/ml y MgCl₂ a 1 mM. Una vez el extracto perdió la viscosidad, se centrifugó durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a una columna BioRad 10DG preequilibrada con MOPS 20 mM pH 6,75 y el eluato se fraccionó en alícuotas y congeló a -70° C. Los análisis se realizaron con estos extractos desalados sin purificar o con las enzimas purificadas.

Con los protocolos descritos anteriormente se extrajo y se valoró el sedimento celular de un cultivo de 250 ml de células *E. coli* inducidas que expresaban el pDAB3203 portador del gen *AAD-1* (v1). La actividad degradadora del 2,4-D en el extracto de *AAD-1* (v1) se comparó con la de células *E. coli* que expresaban un vector sin *AAD-1* (v1) utilizando 2,4-D 1 mM; los resultados se muestran en la figura 5. La cantidad de 2,4-diclorofenol formada es claramente proporcional a la cantidad de extracto añadido para la valoración, mientras que el extracto control no muestra ninguna actividad degradadora del 2,4-D.

La actividad de este extracto se analizó con otros cuatro herbicidas, a saber, (R,S)-diclorprop, (R,S)-mecoprop, (R,S)-haloxifop y (R,S)-diclofop y se comparó con la del 2,4-D (todos a una concentración final de 0,5 mM) con 4 µl de extracto de *E. coli* por análisis con un periodo de análisis de 15 min. La figura 6A muestra que la *AAD-1* (v1) degradó todos los cinco herbicidas transformándolos en fenol. La actividad relativa sobre los sustratos analizados fue la siguiente: diclorprop = mecoprop > diclofop > haloxifop > 2,4-D. Así pues, la *AAD-1* (v1) despliega actividad tanto contra los graminicidas de ariloxifenoxipropionato como contra los herbicidas auxínicos fenoxi.

Seguidamente, el extracto de *AAD-1* (v1) se analizó con el racemato (R,S)-haloxifop, el R-enantiómero del haloxifop y el S-enantiómero del cihalofop (todos a 0,5 mM) como sustratos potenciales para dilucidar la posible especificidad enantiomérica de la *AAD-1* (v1). Los resultados se presentan en la figura 6B. La actividad de la enzima sobre el (R)-haloxifop resultó equivalente a la manifestada con (R,S)-haloxifop, mientras que no se apreció actividad alguna con el S-enantiómero del cihalofop, lo que indica que la *AAD-1* (v1) presenta una especificidad R en los AOPP.

Ejemplo 4 - Especificidad de sustrato de la *AAD-1* (v1)

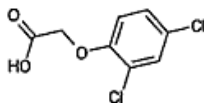
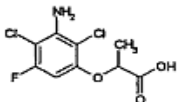
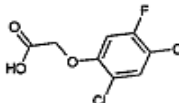
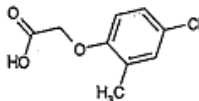
4.1- Otros sustratos de la *AAD-1* (v1).

La especificidad de sustrato de la *AAD-1* (v1) hacia diversos herbicidas comerciales y experimentales se analizó empleando *AAD-1* (v1) purificada en una concentración de 1 ó 10 µg por análisis de 160 µl; cada sustrato se analizó a 1 mM, con un tiempo para la valoración de 15 minutos. La Tabla 3 muestra la A₅₁₀ detectada después de la acción de la *AAD-1* (v1) sobre diversos herbicidas auxínicos y análogos auxínicos de ariloxialcanoato. El mejor sustrato analizado fue el diclorprop, aunque el mecoprop también se degradó notablemente. Otros dos fenoxipropionatos, los análogos 4-fluoro y 3-amino del diclorprop, también fueron degradados con eficacia por la *AAD-1* (v1). La *AAD-1* (v1) produjo pequeñas cantidades de fenol a partir de diversos fenoxiacetatos, incluido el 2,4-D. Las tasas relativas sobre estos sustratos se aprecian mejor en los análisis realizados con la cantidad más grande (10 µg) de *AAD-1* (v1). De estos datos se deduce que el 2,4-D es degradado por la *AAD-1* (v1), al igual que dos fenoxialquilsulfonatos, X188476 y X398166 (sesona).

La Tabla 4 contiene los datos de diversos graminicidas AOPP en calidad de sustratos de la *AAD-1*, así como del fitoprotector cloquintocet. Todos los herbicidas AOPP comerciales analizados fueron degradados de manera efectiva por la *AAD-1* (v1). Se trata de un descubrimiento inesperado que aumenta enormemente la utilidad potencial de esta enzima para conferir resistencia a una amplia gama de herbicidas graminicidas en aplicaciones transgénicas, además de frente a herbicidas auxínicos. La *AAD-1* (v1) presentó su mayor actividad contra el quizalofop (76% de la tasa del diclorprop) y la menor contra el cihalofop (27% de la tasa del quizalofop, 21% de la tasa del diclorprop). El análogo ariloxiacetato del haloxifop (X043865) fue degradado muy lentamente, con sólo un pequeño aumento de la A₅₁₀ tras la exposición a la cantidad más elevada de enzima (10 µg). Este hecho concuerda con la mayor actividad de la *AAD-1* (v1) manifestada contra los fenoxipropionatos respecto a los fenoxiacetatos auxínicos. La actividad mínima se detectó con (S)-cihalofop, lo cual indica que la *AAD-1* (v1) presenta una preferencia significativa por los R-enantiómeros de los sustratos ariloxipropionato. De forma similar, no se apreció actividad contra el cloquintocet, un fitoprotector quinolinoxiacetato, lo que coincide con la observación de que la *AAD-1* (v1) prefiere los sustratos ariloxipropionato a los herbicidas auxínicos fenoxi.

Los sustratos X11115427, X124987 y MCPA se analizaron a 1 mM empleando 27 μg de AAD-1 (*v1*) recombinante sin purificar por valoración. Los tres compuestos fueron degradados por la AAD-1 (*v1*) pero con diferente efectividad relativa (Tabla 8). El X11115427 actuó como un sustrato ligeramente mejor que el 2,4-D (125% de la tasa del 2,4-D) a diferencia del análogo cercano 3-amino-diclorprop, que es ~ 7 veces mejor que el 2,4-D como sustrato (Tabla 3). La sustitución 5-F parece disminuir la efectividad del X11115427 como sustrato de la AAD-1 (*v1*). Las tasas de formación de producto correspondientes al 5-F-fenoxiacetato y al MCPA supusieron el 32% y 55% de las del 2,4-D, respectivamente.

Tabla 8: Efecto de la AAD-1 (*v1*) sobre tres sustratos respecto al 2,4-D. Los sustratos fueron valorados como se indica en la Tabla 6 a 1 mM utilizando un extracto sin purificar de AAD-1 (*v1*) recombinante obtenido en *E. coli*.

Tabla 8. Efecto de la AAD-1 (<i>v1</i>) sobre tres sustratos respecto al 2,4-D.				
ID de registro	Estructura molecular	Compuesto	A510	% 2,4-D
195517		2,4-D	0,177	100
11115427		(R,S)-3-amino, 5-F-diclorprop	0,221	125
124987		5-F, 2,4-D	0,056	32
192711		MCPA	0,097	55

4.2-Análisis cinético.

Los valores K_m y k_{cat} de la AAD-1 (*v1*) purificada (véase el Ejemplo 10) se calcularon con cuatro sustratos herbicidas, a saber: (R)-diclorprop, (R)-haloxifop, (R)-quizalofop y 2,4-D, en condiciones de análisis estándar (MOPS 25 mM a pH 6,8; ascorbato sódico 200 μM ; Fe^{2+} 200 μM ; α -cetoglutarato 1 mM; 25° C). Las curvas dosis-respuesta se ajustaron con Grafit (Erithacus Software, Reino Unido) y las gráficas y las constantes obtenidas se muestran en la figura 7 y la Tabla 9. Los valores K_m de los cuatro sustratos resultaron bastante similares (75-125 μM), pero los valores k_{cat} variaron sustancialmente. El (R)-diclorprop presentó el valor k_{cat} más alto y el 2,4-D el más bajo (10% del valor del (R)-diclorprop). Estos valores k_{cat} concordaron con el intervalo de valores observado en los ensayos de especificidad para el sustrato que aparecen en las Tablas 3 y 4, ya que estos se realizaron con elevadas (saturantes) concentraciones de sustrato (1 mM).

Tabla 9: Constantes cinéticas de los sustratos de la AAD-1 (*v1*). Las constantes cinéticas se calcularon con los datos de la figura 7 aplicando un ajuste con Grafit a la ecuación de Michaelis-Menten.

Tabla 9. Constantes cinéticas de los sustratos de la AAD-1 (<i>v1</i>).				
Sustrato	$K_m(\mu\text{M}) \pm \text{SE}$	$V_{max} (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{AAD1}) \pm \text{SE}$	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)

R-diclorprop	75 ± 10	0,79 ± 0.03	26,1	348
R-quizalofop	125 ± 20	0,57 ± 0.03	18,9	151
R-haloxifop	120 ± 54	0,34 ± 0.04	11,2	94
2,4-D	96 ± 8	0,57 ± 0.00	2,7	28

Los valores relativos de K_m y k_{cat} correspondientes al diclorprop y al 2,4-D difirieron significativamente de los publicados para la dioxigenasa R-específica de *Delftia acidovorans* por Westendorf *et al.* (2003) (*Acta Biotechnol.* 23: 3-17). El valor k_{cat}/K_m publicado del 2,4-D supone el 0,6% del valor del diclorprop, mientras que en nuestros estudios, el valor k_{cat}/K_m del 2,4-D supone el 8% del de diclorprop. Por tanto, en el presente estudio, la *AAD-1 (v1)* resultó inesperadamente eficaz a la hora de catalizar la degradación del 2,4-D. Esto aumenta su utilidad potencial para conferir diversos caracteres de tolerancia a herbicidas en aplicaciones transgénicas.

4.3-Otros sustratos de la AAD-1 (v1).

Tres sustratos más se analizaron a 1 mM utilizando 27 µg de AAD-1 recombinante (v1) bruta por valoración: X11115427, X124987 y MCPA. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los tres compuestos fueron degradados por la AAD-1 (v1), pero con diferente efectividad relativa. El X11115427 sólo fue ligeramente mejor (125%) como sustrato que el 2,4-D. Esto contrasta con el 3-aminodiclorprop, que es >7 veces mejor que el 2,4-D como sustrato (Tabla 3). Por tanto, la sustitución 5-F redujo significativamente la efectividad del X11115427 como sustrato para la AAD-1 (v1). Una tendencia similar se observó en el caso del 5-F-2,4-D, que sólo alcanzó una efectividad del 32% como sustrato respecto al 2,4-D. En este análisis, el MCPA también resultó menos efectivo como sustrato de la AAD-1 (v1) (55% respecto al 2,4-D).

Ejemplo 5 - Optimización de la secuencia para la expresión en vegetales

5.1- Antecedentes.

A fin de obtener una elevada de expresión de genes heterólogos en vegetales, puede ser preferible modificar con técnicas de ingeniería genética dichos genes para que se expresen con más eficiencia en (el citoplasma de) las células vegetales. El maíz es una de las especies vegetales en las que puede ser preferible rediseñar el gen o genes heterólogos antes de la transformación para aumentar su nivel de expresión en la planta. Por consiguiente, un paso adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana consiste en modificar el gen heterólogo para lograr una expresión óptima.

Uno de los motivos para modificar con técnicas de ingeniería genética una proteína bacteriana que pretenda expresarse en el maíz radica en el contenido inadecuado de G+C del gen original. Por ejemplo, el contenido sumamente bajo de G+C de muchos genes bacterianos (y por tanto, la tendencia a un elevado contenido de A+T) da lugar a secuencias que imitan o duplican las secuencias de control génico de los vegetales que son muy ricas en A+T. La presencia de ciertas secuencias ricas en A+T en el ADN del gen o genes introducidos en las plantas puede ocasionar una transcripción aberrante (por ejemplo, las regiones TATA box que suelen hallarse en los promotores génicos). Por otro lado, la presencia de otras secuencias reguladoras en el ARNm transcrito (por ejemplo, secuencias de señal de poliadenilación (AAUAAA), o secuencias complementarias a los ARN nucleares pequeños implicados en el empalme del pre-ARNm) puede provocar inestabilidad en el ARN. Así pues, un objetivo en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana que se pretende expresar en maíz, preferiblemente denominados genes optimizados para vegetales, consiste en crear una secuencia de ADN con un contenido más elevado de G+C que, preferiblemente, resulte similar a la de los genes del maíz que codifican las enzimas metabólicas. Otro objetivo en el diseño de los genes optimizados para vegetales que codifican una proteína bacteriana consiste en generar una secuencia de ADN cuyas modificaciones no obstaculicen su traducción.

La Tabla 10 ilustra el elevado contenido de G+C del genoma del maíz. Las regiones codificantes de los genes se extrajeron de las entradas del GenBank (Release 71) y las composiciones de bases se calcularon con el programa MacVector™ (Accelrys, San Diego, California, EE.UU.). Las secuencias intrónicas no se tuvieron en cuenta en los cálculos.

Tabla 10: Compilación de contenidos G+C en las regiones codificantes de proteínas de genes del maíz

Clase de proteína ^a	Rango % G + C	Media % G + C ^b
Enzimas metabólicos (76)	44,4-75,3	59,0 (+- 8,0)

Proteínas estructurales (18)	48,6-70,5	63,6 (+- 6,7)
Proteínas reguladoras (5)	57,2-68,8	62,0 (+- 4,9)
Proteínas sin caracterizar (9)	41,5-70,3	64,3 (+- 7,2)
Todas las proteínas (108)	44,4-75,3	60,8 (+- 5,2)

^a El número de genes de la clase se indica entre paréntesis.

^b Valores de la desviación estándar indicados entre paréntesis.

^c La media de los grupos combinados no se tuvo en cuenta en el cálculo de la media.

- 5 Debido a la flexibilidad proporcionada por la redundancia/degeneración del código genético (algunos aminoácidos son codificados por más de un codón), la evolución de los genomas en distintos organismos o clases de organismos se ha decantado hacia un uso diferencial de codones redundantes. Esta "preferencia codónica" queda reflejada en la composición media de bases de las regiones codificantes de proteínas. Por ejemplo, los organismos con un contenido relativamente bajo de G+C utilizan codones portadores de A o T en la tercera posición de los codones
- 10 redundantes, mientras que aquellos con contenidos de G+C más altos utilizan codones cuya tercera posición acoge G o C. Se cree que la presencia de codones "menores" dentro del ARNm podría reducir su tasa absoluta de traducción, especialmente cuando la abundancia relativa del ARNt cargado correspondiente al codón menor es baja. Una consecuencia de esto es que la disminución de la tasa de traducción por codones menores individuales sería como mínimo aditiva para los codones menores múltiples. Y, por consiguiente, los ARNm cuyo contenido de
- 15 codones menores sea relativamente alto tendrán bajas tasas de traducción. Y esto, a su vez, daría como resultado niveles bajos de la proteína codificada.

En genes modificados genéticamente que codifican una proteína bacteriana para ser expresada en maíz (u otra planta, como el algodón o la soja) se ha determinado la preferencia codónica de la planta. La preferencia codónica del maíz es la distribución estadística de los codones que la planta utiliza para codificar sus proteínas; los codones utilizados con más preferencia se muestran en la Tabla 11. Una vez determinada la preferencia, se determina la frecuencia porcentual de los codones en el gen o genes de interés. Deben averiguarse qué codones son preferidos en primer lugar por la planta, así como las segundas, terceras y cuartas opciones de codones, en el caso de que existan. Entonces se puede diseñar una nueva secuencia de ADN que codifique la secuencia de aminoácidos de la proteína bacteriana, pero esta nueva secuencia de ADN diferirá de la secuencia bacteriana original (que codifica la

25 proteína) por la sustitución con codones vegetales (primera, segunda, tercera o cuarta opción preferidas) para especificar el aminoácido en cada posición de la secuencia proteica. A continuación, la nueva secuencia se analiza para detectar dianas de restricción que se hayan podido crear accidentalmente a raíz de la modificación. Las dianas identificadas son modificadas reemplazándolas por codones de primera, segunda, tercera o cuarta opción. Otros lugares de la secuencia que pueden alterar la transcripción o la traducción del gen de interés son las uniones

30 exón:intrón (5' o 3'), señales de adición de poli A, o señales de terminación para la ARN polimerasa. La secuencia se vuelve a analizar y a modificar para reducir la frecuencia de dobletes TA o GC. Además de los dobletes, los segmentos de secuencia G o C que contienen más de cuatro residuos iguales aproximadamente pueden afectar a la transcripción de la secuencia y, por consiguiente, estos bloques también se modifican sustituyendo los codones de primera o segunda elección, etc. con la siguiente opción preferida.

35

Tabla 11. Codones de aminoácidos preferidos para las proteínas expresadas en el maíz

Aminoácido	Codón*
Alanina	GCC/GCG
Cisteína	TGC/TGT
Ácido aspártico	GAC/GAT
Ácido glutámico	GAG/GAA
Fenilalanina	TTC/TTT
Glicina	GGC/GGG
Histidina	CAC/CAT
Isoleucina	AAG/AAT

Leucina	CTG/CTC
Metionina	ATG
Asparragina	AAC/AAT
Prolina	CCG/CCA
Glutamina	CAG/CAA
Arginina	AGG/CGC
Serina	AGC/TCC
Treonina	ACC/ACG
Valina	GTG/GTC
Triptófano	TGG
Tirosina	TAC/TAT
Parada	TGA/TAG

Se prefiere que los genes optimizados para vegetales que codifican una proteína bacteriana contengan alrededor del 63% de codones de primera elección, entre aproximadamente el 22% y aproximadamente el 37% de codones de segunda elección y entre alrededor del 15% y alrededor del 0% de codones de tercera o cuarta elección, hasta sumar el porcentaje total del 100%. Los genes optimizados para vegetales preferidos principalmente contienen alrededor de un 63% de codones de primera elección, por lo menos aproximadamente un 22% de codones de segunda elección, aproximadamente un 7,5% de codones de tercera elección y aproximadamente un 7,5% de codones de cuarta elección, hasta sumar el porcentaje total del 100%. El método descrito permite a un experto en la materia modificar un gen o genes que son foráneos para una planta dada, de modo que se expresen óptimamente en plantas. El método se muestra con más detalle en la solicitud PCT WO 97/13402.

Así pues, el diseño de genes optimizados para vegetales que codifiquen una proteína bacteriana pasa por diseñar una secuencia de ADN que codifique la secuencia de aminoácidos de dicha proteína utilizando un código genético redundante confeccionado a partir de una tabla de preferencia codónica compilada a partir de las secuencias génicas de esa planta en particular. La secuencia de ADN resultante posee un mayor grado de diversidad codónica, una composición de bases conveniente, puede contener dianas para enzimas de restricción ubicadas estratégicamente y carece de secuencias que puedan interferir con la transcripción del gen o con la traducción del ARNm resultante. De ese modo, los genes sintéticos que sean funcionalmente equivalentes a las proteínas/genes de la presente invención se podrán utilizar para transformar hospedadores, incluidas plantas. Se pueden encontrar más directrices sobre la producción de genes sintéticos en, por ejemplo, la patente US nº 5.380.831.

5.2 - Análisis de la reconstrucción.

El análisis exhaustivo de las 888 pares de bases (pb) de la secuencia de ADN de la región codificante original del AAD-1 (v1) (SEC ID nº 3) reveló la presencia de varios motivos de secuencia que se cree que afectan negativamente a la expresión óptima en vegetales, así como una composición codónica que no resulta óptima. Para mejorar la producción de la proteína recombinante tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, se desarrolló una secuencia de ADN "optimizada para vegetales" (SEC ID nº 5) que codifica la SEC ID nº 11, que es la misma que la SEC ID nº 9 original excepto por la adición de un residuo de alanina en la segunda posición. El codón adicional de alanina (GCT; subrayado en la SEC ID nº 5) se incluyó para codificar una diana para Nco I (CCATGG) que abarcaba el codón de inicio ATG, para permitir posteriores operaciones de clonación. Las proteínas codificadas por las regiones codificantes original (v1) y optimizadas para vegetales (v3) son idénticas en un 99,3%, difiriendo únicamente en el aminoácido número 2. En cambio, las secuencias de ADN original (v1) y optimizadas para vegetales (v3) de las regiones codificantes únicamente son idénticas en un 77,7%. Se efectuó una alineación de la secuencia del ADN original y del ADN optimizado para vegetales y en la Tabla 12 se muestran las diferencias en la composición codónica de la secuencia original y de la secuencia optimizada para plantas.

Tabla 12. Comparación de la composición codónica de la región codificante del AAD-1 (v1) original y de su versión optimizada para vegetales.

Amino-	Codón	Nº gen origi-	% gen	Nº gen opt.	% gen opt.	Amino	Codón	Nº gen origi-	Nº gen opt.	% gen opt.
--------	-------	---------------	-------	-------------	------------	-------	-------	---------------	-------------	------------

ES 2 389 843 T3

ácido		nal	origi-nal	plantas	plantas	ácido		nal		plantas	plantas
ALA (A)	GCA	2	9,1	5	22	LEU (L)	CTA	0	0,0	0	0
	GCC	10	45,5	8	35		CTC	5	22,7	7	32
	GCG	9	40,9	0	0		CTG	16	72,7	0	0
	GCT	1	4,5	10	43		CTT	0	0,0	8	36
ARG (R)	AGA	0	0,0	7	30		TTA	0	0,0	0	0
	AGG	0	0,0	7	30		TIG	1	4,5	7	32
	CGA	0	0,0	0	0	LYS (K)	AAA	1	14,3	2	29
	CGC	16	69,6	5	22		AAG	6	85,7	5	71
	CGG	4	17,4	0	0	MET (M)	ATG	8	100	8	100
	CGT	3	13,0	4	17		TTC	10	76,9	9	69
ASN (N)	AAC	8	100,0	4	50	PHE(F)	TTT	3	23,1	4	31
	AAT	0	0,0	4	50		CCA	1	5,9	8	47
ASP(D)	GAC	15	78,9	10	53		CCC	9	52,9	1	6
	GAT	4	21,1	9	47		CCG	7	41,2	0	0
CYS (C)	TGC	3	100,0	2	67	PRO (P)	CCT	0	0,0	8	47
	TGT	0	0,0	1	33		AGC	11	73,3	4	27
END	TAA	0	0,0	0	0		AGT	0	0,0	0	0
	TAG	1	100,0	0	0		TCA	0	0,0	4	27
	TGA	0	0,0	1	100		TCC	2	13,3	3	20
							TCG	2	13,3	0	0
GLN (Q)	CAA	0	0,0	7	54		TCT	0	0,0	4	27
	CAG	13	100,0	6	46	SER (S)	ACA	1	4,3	6	26
GLU (E)	GAA	8	50,0	5	31		ACC	16	69,6	9	39
	GAG	8	50,0	11	69		ACG	5	21,7	0	0
GLY (G)	GGA	0	0,0	6	29		ACT	1	4,3	8	35
	GGC	15	71,4	7	33	TRP(W)	TGG	5	100	5	100
	GGG	3	14,3	2	10		TAC	7	70,0	6	60
	GGT	3	14,3	6	29	TYR (Y)	TAT	3	30,0	4	40
HIS(H)	CAC	6	60,0	5	50		GTA	2	7,1	0	0
	CAT	4	40,0	5	50	VAL(V)	GTC	11	39,3	8	29
ILE(I)	ATA	0	0,0	3	25		GTG	15	53,6	10	36
	ATC	12	100,0	5	42		GTT	0	0,0	10	36
	ATT	0	0,0	4	33						
Totales		148		149		Totales		148		148	

5.3 - Construcción de los vectores binarios

5.3.1- AAD-1 reconstruido (v3). El gen optimizado para vegetales AAD-1 (v3) fue suministrado por Picoscript (acabado el diseño de reconstrucción del gen (véase arriba), la síntesis se encargó a Picoscript) y la secuencia (SEC ID nº 5) se verificó internamente para confirmar que no contenía alteraciones respecto a la secuencia esperada. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con cebadores directos de M13 (SEC ID nº 16) e inversos de M13 (SEC ID nº 17) utilizando reactivos del "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" de Beckman Coulter como se ha indicado antes. Los datos de la secuencia se analizaron y los resultados indicaron que la secuencia de ADN del AAD-1 (v3) optimizado para plantas no contenía anomalías. El gen AAD-1 (v3) se clonó en pDAB726 como un fragmento Nco I-Sac I. El constructo resultante se diseñó como un pDAB720, que contenía: [promotor AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: AAD-1 (v3): Nt OSM 3'UTR: ORF1 polIA 3'UTR] (verificado con digestiones con la enzima de restricción Not I). Un fragmento Not I-Not I que contenía la casete descrita se clonó a continuación en el sitio Not I del vector binario pDAB3038. El vector binario resultante, pDAB721, que contenía la siguiente casete [promotor AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: AAD-1 (v3): Nt OSM 3'UTR: ORF1 polIA 3'UTR: promotor CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR] se digirió con enzimas de restricción (Bam HI, EcoR I, EcoR V, Hind III, Pac I y Xmn I) para verificar que la orientación era correcta. El constructo acabado y verificado (pDAB721) se empleó para la transformación en *Agrobacterium* (véase el apartado 6.2).

5.3.2- AAD1 natural (v1) y AAD-1 modificado (v2). El gen AAD-1 (v1) (SEC ID nº 3) se amplificó con PCR a partir del pDAB3203. Durante la reacción de PCR, se modificaron los cebadores para introducir dianas de restricción para NcoI y SacI en el cebador 5' y en el cebador 3', respectivamente. Para amplificar el fragmento de ADN se emplearon los cebadores "rdpA(ncoI)" [CCC ATG GCT GCT GCA CTG TCC CCC CTC TCC] (SEC ID nº 6) y "3' sacI" [GAG CTC ACT AGC GCG CCG GGC GCA CGC CAC CGA] (SEC ID nº 7) con el sistema Fail Safe PCR System (Epicenter).

El amplicón de PCR se ligó a un vector de clonación pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen) y la secuencia se verificó con cebadores directos de M13 (SEC ID nº 16) e inversos de M13 (SEC ID nº 17) utilizando los reactivos de secuenciación del "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" de Beckman Coulter.

Los datos de secuenciación identificaron a un clon con la secuencia correcta. Durante el análisis se descubrió una diana de restricción para NotI que era superflua, situada hacia el extremo 3' del AAD-1 (v1). Esta diana se eliminó para facilitar la clonación en pDAB3038; para eliminarla se llevó a cabo una reacción de PCR con un cebador 5' interno. La diana de NotI se alteró incorporando un nuevo codón para un aminoácido con el fin de eliminar la diana falsa de NotI. Este cambio alteraría la arginina de la posición 212 convirtiéndola en una cisteína. Se usaron los cebadores de PCR "BstEII/Del NotI" [TGG TGG TGA CCC ATC CGG GCA GCG GCT GCA AGG GCC] (SEC ID nº 8) y "3' sacI" (SEC ID nº 7).

Se realizó una reacción PCR con el sistema Fail Safe PCR System (Epicenter) y el fragmento resultante se clonó en el kit de clonación pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen). La confirmación del producto de PCR correcto se llevó a cabo secuenciando el ADN y el gen "fijado" recibió la designación de AAD-1 (v2) (SEC ID nº 4).

La reacción de secuenciación con el cebador inverso de M13 (SEC ID nº 17) y los reactivos de secuenciación "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" de Beckman Coulter indicó que se había aislado el fragmento de PCR correcto. Este constructo se digirió con las enzimas BstEII y SacI. El fragmento resultante se clonó en el constructo pCR2.1 AAD-1 (v2) (pCR2.1 Delta NotI) y se confirmó mediante una digestión con enzima de restricción.

Acto seguido, el gen AAD-1 (v2) modificado se clonó en el pDAB726 en forma de un fragmento de ADN NcoI/SacI. El constructo resultante (pDAB708) se verificó con digestiones por enzimas de restricción y después se clonó en el vector binario pDAB3038 como un fragmento NotI-NotI. El constructo final resultante recibió la designación pDAB766, que contenía el [promotor AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: AAD-1 (v2): Nt OSM 3'UTR: ORF1 polIA 3'UTR: promotor CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR] y fue digerido con enzimas de restricción para verificar que la orientación era correcta. El constructo acabado se usó entonces para la transformación en *Agrobacterium*.

5.3.3 - Diseño de una secuencia de ADN con codones adaptados a la soja que codifica una EPSPS de soja portadora de mutaciones que confieren tolerancia al glifosato. Este ejemplo ilustra el diseño de una nueva secuencia de ADN que codifica una 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) mutante de soja, optimizada para la expresión en células de soja. La secuencia de aminoácidos de una EPSPS de soja con tres mutaciones se muestra como la SEC ID nº 5 de la WO 2004/009761. Los aminoácidos mutados en dicha secuencia son el residuo 183 (treonina de la proteína original sustituida por una isoleucina), residuo 186 (arginina de la proteína original sustituida por una lisina) y residuo 187 (prolina de la proteína original sustituida por una serina). Así pues, es posible deducir la secuencia de aminoácidos de la proteína EPSPS de soja original reemplazando los aminoácidos sustituidos de la SEC ID nº 5 de la WO 2004/009761 con los aminoácidos originales en las posiciones adecuadas. Esta secuencia original de la proteína se presenta en la presente memoria como la SEC ID nº 20. En la presente memoria también se expone una secuencia de proteína EPSPS de soja portadora de dos mutaciones, a saber, una mutación en el residuo 183 (treonina de la proteína original sustituida por una isoleucina) y en el residuo 187 (prolina de la proteína original sustituida por una serina), presentada como la SEC ID nº 21.

Consultando la página web “kazusa.or.jp/codon” se obtuvo una tabla de uso de codones correspondiente a las secuencias codificantes de proteínas de la soja (*Glycine max*), calculada a partir de 362.096 codones (aproximadamente 870 secuencias codificantes). Estos datos se reformatearon tal y como se muestra en la Tabla 13. Las columnas D y H de la Tabla 13 presentan las distribuciones (en % de uso de todos los codones para ese aminoácido) de los codones sinónimos de cada aminoácido, tal y como se hallan en las regiones codificantes de proteínas de los genes de soja. Es evidente que algunos codones sinónimos de algunos aminoácidos (un aminoácido puede estar codificado por 1, 2, 3, 4 ó 6 codones) raramente están presentes en las regiones codificantes de proteínas de la soja (por ejemplo, compárese el uso de los codones GCG y GCT que codifican la alanina). A partir de los datos de la Tabla 13 se elaboró una tabla con los codones preferidos por la soja. Los codones hallados en los genes de soja con una frecuencia inferior aproximadamente al 10% del total de apariciones de un aminoácido en particular se descartaron. Para equilibrar la distribución de las restantes opciones de codón para un aminoácido, se calculó un promedio ponderado de cada codón con la fórmula:

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

donde C1 es el codón en cuestión, C2, C3, etc. representan los codones sinónimos restantes y los valores % para los codones relevantes se toman de las columnas D y H de la Tabla 13 (descartando los valores de los codones muy poco frecuentes, señalados en negrita). El valor % ponderado de cada codón se ofrece en las columnas C y G de la Tabla 13. TGA se escogió arbitrariamente como codón terminador de la traducción. Las frecuencias de los codones preferidos se introdujeron en una tabla de código genético especializada para el uso con el programa de diseño de genes OptGene™ (Ocimum Biosolutions LLC, Indianapolis, Indiana).

Tabla 13. Representación de los codones sinónimos presentes en las secuencias codificantes de proteína de la soja y cálculo de un conjunto de representación de los codones preferidos para el diseño de un gen sintético optimizado para la soja.

A	B	C	D	E	F	G	H
Amino-ácido	Codón	Ponderado %	Soja %	Amino-ácido	Codón	Ponderado %	Soja %
ALA (A)	GCA	33,1	30,3	LEU (L)	CTA	DNU	9,1
	GCC	24,5	22,5		CTC	22,4	18,1
	GCG	DNU*	8,5		CTG	16,3	13,2
	GCT	42,3	38,7		CTT	31,5	25,5
ARG (R)	AGA	36,0	30,9	LYS (K)	TTA	DNU	9,8
	AGG	32,2	27,6		TTG	29,9	24,2
	CGA	DNU	8,2	MET (M)	AAA	42,5	42,5
	CGC	14,8	12,7		AAG	57,5	57,5
	CGG	DNU	6,0	PHE (F)	ATG	100,0	100
	CGT	16,9	14,5		TTC	49,2	49,2
ASN (N)	AAC	50,0	50,0	PRO (P)	TTT	50,8	50,8
	AAT	50,0	50,0		CCA	39,8	36,5
ASP (D)	GAC	38,1	38,1	SER (S)	CCC	20,9	19,2
	GAT	61,9	61,9		CCG	DNU	8,3
CYS (C)	TGC	50,0	50,0		CCT	39,3	36,0
	TGT	50,0	50,0	SER (S)	AGC	16,0	15,1
END	TAA	DNU	40,7		AGT	18,2	17,1

	TAG	DNU	22,7		TCA	21,9	20,6
	TGA	100,0	36,6		TCC	18,0	16,9
GLN (Q)	CAA	55,5	55,5		TCG	DNU	6,1
	CAG	44,5	44,5		TCT	25,8	24,2
GLU (E)	GAA	50,5	50,5	THR (T)	ACA	32,4	29,7
	GAG	49,5	49,5		ACC	30,2	27,7
GLY (G)	GGA	31,9	31,9		ACG	DNU	8,3
	GGC	19,3	19,3		ACT	37,4	34,3
	GGG	18,4	18,4	TRP (W)	TGG	100,0	100
	GGT	30,4	30,4	TYR (Y)	TAC	48,2	48,2
HIS (H)	CAC	44,8	44,8		TAT	51,8	51,8
	CAT	55,2	55,2	VAL (V)	GTA	11,5	11,5
ILE (I)	ATA	23,4	23,4		GTC	17,8	17,8
	ATC	29,9	29,9		GTG	32,0	32,0
	ATT	46,7	46,7		GTT	38,7	38,7

*DNU = no usar

5 Para obtener una secuencia de ADN optimizada para soja que codificase la proteína EPSPS portadora de dos mutaciones, se tradujo en sentido inverso la secuencia proteínica de la SEC ID nº 21 con el programa OptGene™ utilizando el código genético adaptado a la soja indicado arriba. La secuencia inicial de ADN obtenida de esa forma se modificó compensando los cambios de codón (conservando la representación media ponderada total de los codones) para reducir el número de dobles CG y TA entre codones adyacentes, aumentar el número de dobles CT y TG entre codones adyacentes, eliminar estructuras secundarias intracatenarias muy estables, eliminar o añadir dianas de restricción y eliminar otras secuencias que pudieran afectar negativamente a la expresión o las operaciones de clonación del gen modificado. Otros refinamientos de la secuencia consistieron en eliminar posibles sitios de escisión de intrones vegetales, largos tramos de residuos de A/T o C/G y otros motivos que podrían interferir con la estabilidad del ARN, su transcripción o la traducción de la región codificante en las células vegetales. Se hicieron otros cambios para eliminar grandes marcos de lectura abiertos internos (marcos distintos de +1). Estos cambios se aplicaron de forma limitada para conservar la composición de codones adaptados a la soja descrita arriba y preservar la secuencia de aminoácidos revelada en la SEC ID nº 21.

La secuencia de ADN adaptada a la soja que codifica la proteína EPSPS de la SEC ID nº 21 se ofrece como las bases 1-1575 de la SEC ID nº 22. La síntesis del fragmento de ADN que comprende la SEC ID nº 22 corrió a cargo de un proveedor comercial (PicoScript, Houston Texas).

5.3.4 - Clonación de otros constructos binarios. Para acabar los pDAB3295 y pDAB3757 se utilizó la técnica de clonación GateWay (Invitrogen, nº catálogo 11791-043 y nº catálogo 12535-019). Esta técnica utiliza una recombinación específica de sitio basada en el fago lambda para insertar una casete génica en un vector. Para más información véase *Gateway Technology: A universal technology to clone DNA sequence for functional analysis and expression in multiple systems*, © 1999-2003, Invitrogen Corp., 1600 Faraday Ave., Carlsbad, California 92008, EE.UU. (publicado - 2003). Los demás constructos creados para la transformación en especies vegetales adecuadas se construyeron por medio de procedimientos similares al de arriba y otros métodos moleculares de clonación habituales (Maniatis *et al.*, 1982). La Tabla 14 enumera todos los constructos de transformación utilizados con los promotores apropiados y las características definidas, así como el cultivo objeto de la transformación.

El gen *sacB* se insertó en el vector binario pDAB3289 como un marcador de selección bacteriano negativo para reducir la persistencia de *Agrobacterium* asociada con el tejido vegetal transformado. SacB es una enzima levano-sacarasa sintetizada por *Bacillus* spp. que resulta tóxica para la mayoría de bacterias gramnegativas cuando crecen en presencia de sacarosa (Gay *et al.*, 1983). El gen *sacB* se recuperó en un fragmento *Hind* III del plásmido pRE112 (Edwards, *et al.*, 1998) y se clonó en la diana única para *Hind* III del pDAB3289.

Tabla 14. Constructos binarios utilizados para la transformación de diversas especies vegetales.

N° pDAB	N° pDA S	Especies * transformadas	Gen de interés (GOI)	Promotor	Característica 1	Característica 2	GOI 2	Promotor	Gen de selección bacteriano	Gen de selec. bact. 2	Gen de selec. vegetal	Promotor	Método transformación
721		A, T, Ct, S, Ca	AAD1 v3	AtUbi10	NtOsm	-	-	-	Eritromicina	-	pat	CsVMV	Binario con Agro.
3230		A	EPSPS	AtUbi10	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomina	-	AAD1 v3	CsVMV	Binario con Agro.
3289		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Espectinomina	sacB	HptII	AtUbi3	Binario con Agro.
3291		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Espectinomina	-	HptII	AtUbi3	Binario con Agro.
3295		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomina	-	pat	AtUbi10	Chorro aerosol
3297	1270	A, T	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomina	-	pat	AtUbi10	Binario con Agro.
3403		Cn, R	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicilina	-	Como GOI		Traquitas/Pistola
3404		Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicilina	-	pat	OsActI	Traquitas
3415	1283	Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicilina	-	AHAS v3	OsActI	Traquitas
3602	1421	Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomina	-	AHAS v3	OsActI	Superbinario con Agro
3757		Ca	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Espectinomina	-	pat	AtUbi1	Binario con Agro.
3705		A	AAD2v2	AtUbi10	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Eritromicina	-	pat	CsVMV	Binario con Agro.
*A = <i>Arabidopsis</i>		CsVMV = promotor del virus del mosaico de las nervaduras de mandioca	ZmUbi1 = promotor de la ubiquitina 1 de <i>Zea mays</i>										
T = Tabaco		AtUbi10 = promotor de ubiquitina 10 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	HptII = higromicina fosfotransferasa										
S = Soja		RB7 Mar v2 = región asociada a matriz (MAR) de <i>Nicotiana tabacum</i>											
Ct = Algodón		NtOsm = región sin traducir 5' de la osmotina de <i>Nicotiana tabacum</i> y región sin traducir 3' de la osmotina de <i>Nicotiana tabacum</i>											
R = Arroz													
Cn = Maiz		(721 y 793) AtU ORF1 3' UTR = región sin traducir 3' del marco de lectura abierto 1 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>											
Ca = Colza		(3295 y 3757) AtU ORF24 3' UTR = región sin traducir 3' del marco de lectura abierto 24 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>											

Ejemplo 6 - Transformación en *Arabidopsis* y selección

6.1 - Condiciones de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

Semillas de *Arabidopsis* silvestres se suspendieron en una solución de agarosa al 0,1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EE.UU.). Las semillas suspendidas se almacenaron a 4° C durante 2 días para cumplir los requerimientos de dormición y asegurar la germinación simultánea de las semillas (estratificación).

Sustrato de semillero Sunshine LP5 Mix (Sun Gro Horticulture, Bellevue, Washington, EE.UU.) se cubrió con vermiculita fina y se regó con goteo subterráneo con solución de Hoagland hasta dejarlo empapado. La mezcla de suelo se dejó drenar durante 24 horas. Las semillas estratificadas se sembraron en la vermiculita y se taparon con cubiertas para retener la humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 7 días.

Las semillas germinaron y las plantas se cultivaron en una cámara Conviron (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) en condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) con una intensidad lumínica de 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ con temperatura (22° C) y humedad (40-50%) constantes. Las plantas se regaron inicialmente con solución de Hoagland y después con agua desionizada para mantener el suelo húmedo pero no mojado.

6.2 - Transformación de *Agrobacterium*

De una placa de LB + agar con eritromicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EE.UU.) (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) que contenía colonias DH5 α sembradas en estría se escogió una colonia para inocular cultivos mini prep de 4 ml (LB líquido + eritromicina). Los cultivos se incubaron hasta el día siguiente a 37° C en agitación constante. Para purificar el ADN plasmídico se usaron Spin Mini Preps de Qiagen (Valencia, California, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se prepararon células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* (cepas Z707, EHA101 y LBA4404) con un protocolo de Weigel y Glazebrook (2002). Las células competentes de *Agrobacterium* se transformaron con un método de electroporación adaptado de Weigel y Glazebrook (2002). 50 μl de células competentes de *Agrobacterium* se descongelaron en hielo y se les añadieron 10-25 ng del plásmido deseado. El ADN y la mezcla de células se vertieron en cubetas de electroporación preenfriadas (2 mm). La transformación se llevó a cabo con un Electroporator 2510 de Eppendorf con los siguientes ajustes: Voltaje: 2,4 kV, duración del impulso: 5 ms.

Tras la electroporación, se añadió 1 ml de caldo YEP (composición por litro: 10 g de extracto de levadura, 10 g de Bacto-peptona, 5 g de NaCl) a la cubeta y la suspensión de células-YEP se transfirió a un tubo de cultivo de 15 ml. Las células se incubaron a 28° C en un baño maría con agitación constante durante 4 horas. Finalizada la incubación, el cultivo se sembró en placas de YEP + agar con eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., EE.UU.) (250 mg/l). Las placas se incubaron durante 2-4 días a 28° C.

Las colonias se seleccionaron y sembraron en estría en placas de YEP + agar fresco con eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomycin (250 mg/l) que se incubaron a 28° C durante 1-3 días. Las colonias se seleccionaron para el análisis PCR para verificar la presencia del gen insertado utilizando cebadores específicos del vector. Con Spin Mini Preps de Qiagen, y siguiendo las instrucciones del fabricante, se purificó el ADN plasmídico de las colonias seleccionadas de *Agrobacterium* con la excepción siguiente: para la purificación del ADN se usaron alícuotas de 4 ml de un cultivo mini prep de 15 ml cultivado de un día para otro (YEP líquido + eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l)) y estreptomycin (250 mg/l)). Una alternativa al uso del Spin Mini Prep ADN consistió en lisar las células transformadas de *Agrobacterium*, suspendidas en 10 μl de agua, sometiénolas a 100° C durante 5 minutos. El ADN plasmídico del vector binario utilizado para la transformación de *Agrobacterium* se incluyó como control. La reacción de PCR se completó con ADN-polimerasa Taq de Takara Minis Bio Inc. (Madison, Wisconsin, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante a concentraciones 0,5x. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con un termociclador MJ Research Peltier programado con los siguientes ajustes: 1) 94° C durante 3 minutos, 2) 94° C durante 45 segundos, 3) 55° C durante 30 segundos, 4) 72° C durante 1 minuto, durante 29 ciclos y después 1 ciclo de 72° C durante 10 minutos. La reacción se mantuvo a 4° C después de la ciclación. La amplificación se analizó con electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó con tinción de bromuro de etidio. Se seleccionó una colonia cuyo producto de PCR era idéntico al plásmido control.

6.3 - Transformación de *Arabidopsis*.

Las plantas de *Arabidopsis* se transformaron utilizando el método de inmersión floral. La colonia seleccionada se inoculó en uno o varios precultivos de 15-30 ml de caldo YEP con eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomycin (250 mg/l). El o los cultivos se incubaron hasta el día siguiente a 28° C con agitación constante a 220 rpm. Cada precultivo se usó para inocular dos cultivos de 500 ml de caldo YEP con eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomycin (250 mg/l) y los cultivos se incubaron hasta el día siguiente a 28° C con agitación constante. Las células se precipitaron centrifugándolas a aprox. 8700xg durante 10 minutos a

temperatura ambiente, descartando el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió suavemente en 500 ml de medio de infiltración que contenía: $\frac{1}{2} \times$ de sales de Murashige y Skoog/vitaminas B5 de Gamborg, sacarosa 10% (p/v), bencilaminopurina 0,044 μ M (10 μ l/litro de solución madre 1 mg/ml en DMSO) y Silwet L-77 300 μ l/litro. Plantas de aproximadamente un mes de edad se sumergieron en el medio durante 15 segundos, asegurándose de que las inflorescencias más recientes quedaran sumergidas. A continuación las plantas se dejaron tumbadas y se cubrieron (con cubierta transparente u opaca) durante 24 horas, después se lavaron con agua y se colocaron en pie. Las plantas se dejaron crecer a 22° C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Unas 4 semanas después de la inmersión, se recogieron las semillas.

6.4 - Selección de las plantas transformadas.

Las semillas T₁ recién recogidas (transformadas con el gen original [AAD-1 (v2)] o el gen optimizado para plantas [AAD-1 (v3)]) se dejaron secar durante 7 días a temperatura ambiente. Las semillas T₁ se sembraron en bandejas de germinación de 26,5 x 51 cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, Minn., EE.UU.), a razón de una alícuota de 200 mg de semillas T₁ estratificadas (~10.000 semillas) por bandeja. Las semillas habían permanecido suspendidas en 40 ml de una solución de agarosa al 0,1% y almacenadas a 4° C durante 2 días para cumplir los requisitos de dormición y asegurar una germinación simultánea.

Sustrato de semillero Sunshine LP5 Mix (Sun Gro Horticulture, Bellevue, Washington, EE.UU.) se cubrió con vermiculita fina y se regó con goteo subterráneo con solución de Hoagland hasta dejarlo empapado, y después se dejó drenar por gravedad. Cada alícuota de 40 ml de semillas estratificadas se sembró uniformemente en la vermiculita con una pipeta y se tapó con cubiertas para retener la humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4-5 días. Las cubiertas se retiraron 1 día antes de la selección inicial de las transformantes por medio de la pulverización con glufosinato en postemergencia (selección para el gen PAT cotransformado).

Entre cinco y seis días después de la siembra (DAP) y de nuevo 10 DAP, las plantas T₁ (cotiledón y estadio de 2-4 hojas, respectivamente) se pulverizaron con una solución al 0,2% de herbicida Liberty (200 g m.a./l de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, Mo., EE.UU.) con un volumen de pulverización de 10 ml/bandeja (703 l/ha) con una boquilla de aire comprimido DeVilbiss ajustada para suministrar una dosis efectiva de 280 g m.a./ha de glufosinato por aplicación. Las supervivientes (plantas con crecimiento activo) se identificaron 5-7 días después de la última pulverización y se trasplantaron individualmente a macetas de 3 pulgadas rellenas de medio para macetas (Metro Mix 360). Las plantas trasplantadas se taparon con cubiertas para retener la humedad durante 3-4 días y se depositaron en una cámara de crecimiento a 22° C como se ha indicado antes. Las cubiertas se retiraron y las plantas se trasladaron al invernadero (22 \pm 5° C, 50 \pm 30% HR, 14 h de luz:10 h de oscuridad, mínimo 500 μ E/m²s⁻¹ de luz natural + suplementaria) por lo menos 1 día antes del análisis para valorar la capacidad del AAD-1 (v3) (gen optimizado para vegetales) o del AAD-1 (v2) (gen microbiano natural) para conferir resistencia frente a herbicidas auxínicos fenoxi.

En las plantas T₁ seleccionadas al azar para determinar la resistencia al glufosinato indicadas arriba se confirmó la expresión de la proteína PAT con un kit ELISA para PAT (N° artículo 7000045, Strategic Diagnostics, Inc., Newark, Del., EE.UU.) con el fin de confirmar la fidelidad del proceso de selección sin destruir las plantas (protocolo del fabricante). A continuación, las plantas se separaron en grupos al azar para recibir varias dosis de herbicidas fenoxi (diclorprop ó 2,4-D). Las dosis de fenoxi aplicadas inicialmente fueron de 12,5 g e.a./ha de 2,4-D y 50 ó 200 g e.a./ha de diclorprop. El GR₉₉ de *Arabidopsis* ronda aproximadamente los 50 g e.a./ha con 2,4-D y los 200 g e.a./ha con diclorprop. En los ensayos posteriores se aplicaron dosis elevadas (50, 200, 800 ó 3200 g e.a./ha).

Todas las aplicaciones de herbicidas auxínicos se realizaron con un pulverizador DeVilbiss del modo descrito para aplicar un volumen de 703 l/ha (0,4 ml de solución/maceta de 3 pulgadas) o fueron aplicadas con un pulverizador de carril con un volumen de pulverización de 187 l/ha. El 2,4-D utilizado era de calidad técnica (Sigma, St. Louis, Mo., EE.UU.) disuelto en DMSO y diluido en agua (concentración final de DMSO <1%) o bien la formulación comercial de sal dimetilamina (456 g e.a./l, NuFarm, St Joseph, Mo., EE.UU.). El diclorprop utilizado era de calidad técnica (Sigma, St. Louis, Mo., EE.UU.) disuelto en DMSO y diluido en agua (concentración final de DMSO <1%). Como las dosis de herbicida sobrepasaron los 800 g e.a./ha, el pH de la solución pulverizada resultó demasiado ácido y quemó las hojas de las plantas jóvenes y tiernas de *Arabidopsis*, complicando la evaluación de los efectos primarios de los herbicidas. En lo sucesivo se decidió aplicar siempre estas dosis elevadas de herbicidas fenoxi diluyéndolas en tampón Tris 200 mM (pH 9,0) hasta conseguir un pH final de ~7-8.

Algunos individuos T₁ fueron expuestos a otros herbicidas comerciales en lugar de a herbicidas auxínicos fenoxi. Una cuestión de interés consistió en determinar si el haloxifop podía ser degradado efectivamente en la planta.

Aunque *Arabidopsis*, por ser una dicotiledónea, no es un sistema óptimo para analizar los graminicidas AOPP que inhiben la ACCasa, plantas T₁ transformadas con AAD-1 (v3) fueron sometidas a dosis elevadas (400-1600 g e.a./ha) de ácido RS-haloxifop (sintetizado internamente) con el pulverizador DeVilbiss utilizado del modo descrito arriba; tales dosis provocaron anomalías en el crecimiento y muerte de plantas *Arabidopsis* naturales. Los daños se evaluaron 7 y 14 días después del tratamiento. Asimismo, otros individuos T₁ fueron tratados con fluoroxipir, un herbicida auxínico piridiloxiacetato.

6.5 - Resultados de la selección de las plantas transformadas.

5 Las primeras transformaciones de *Arabidopsis* se efectuaron con el *AAD-1* (v3) (gen optimizado para vegetales). Las transformantes T₁ se seleccionaron primero entre la fracción mayoritaria de semillas no transformadas por medio de un esquema de selección con glufosinato. Entre las aproximadamente 400.000 semillas T₁ cribadas se hallaron 493 plantas resistentes al glufosinato (gen *PAT*), lo que equivale a una frecuencia de transformación/selección del 0,12%. Dependiendo del lote de semillas analizadas, esta osciló entre 0,05-0,23% (véase la Tabla 15). Un lote pequeño de semillas transformadas con el *AAD-1* (v2) (natural) también se seleccionaron utilizando el glufosinato como agente de selección. Se identificaron 278 individuos T₁ resistentes al glufosinato entre 84.000 semillas cribadas (frecuencia de transformación/selección del 0,33%).

Tabla 15: Selección de plantas T₁ transformadas con AAD-1 (v3) (optimizado para vegetales), o AAD-1 (v2) (natural), AAD-2 (v1) (natural), o AAD-2 (v2) por medio de glufosinato y 2,4-D.

Agente de selección	Gen	Preferencia codónica	Semillas totales sembradas y cribadas	Número de T ₁ resistentes	Tasa de selección	Rango de la tasa de selección	% de plantas seleccionadas que expresaban PAT ³
Glufosinate ¹	AAD-1 (v2)	n	84.000	278	0,33%	0,33%	nd ⁴
Glufosinate ¹	AAD-1 (v3)	p	400.500 ^v	493	0,12%	0,05 - 0,23%	97%
2,4-D ²	AAD-1 (v3)	p	70.000	53	0,08%	0,07 - 0,08%	96%
Glufosinate ¹	AAD-2 (v1)	n	1.301.500	228	0,018%	0,007 - 0,021%	100%
Glufosinate ¹	AAD-2(v2)	p	200.000	224	0,11%	0,11%	nd ⁴

¹ Esquema de selección con glufosinato: 280 g m.a./ha de glufosinato aplicados a los 5-6 + 10 DAP

² Esquema de selección con 2,4-D: 50 g m.a./ha de 2,4-D aplicados a los 5-7 + 10-14 DAP

³ Expresión de la proteína PAT determinada con tiras de ELISA PAT

⁴ nd, no determinado

⁵ Preferencia codónica, n = gen microbiano natural, p = optimizado para vegetales

Las plantas T₁ seleccionadas arriba se trasplantaron después a macetas individuales y fueron pulverizadas con diversas dosis de herbicidas ariloxialcanoato comerciales. La Tabla 16 compara la respuesta del gen *AAD-1* (v2) natural y del gen *AAD-1* (v3) optimizado para vegetales a la hora de conferir resistencia contra el 2,4-D a las transformantes T₁ de *Arabidopsis*. Ambos genes confirieron resistencia a plantas T₁ de *Arabidopsis* individuales. Los niveles de respuesta de las plantas sometidas a un mismo tratamiento manifestaron una gran variabilidad, lo que puede atribuirse al hecho de que cada planta representa un evento de transformación distinto. Cabe subrayar que a cualquiera de las dosis de 2,4-D probadas, hubo individuos que no se vieron afectados en absoluto, mientras que otros lo fueron gravemente. En la Tabla 16 se presenta el promedio de daños en la población total por cada dosis a fin de demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con *AAD-1* (v2) o con *AAD-1* (v3) respecto a los controles naturales o transformados con *PAT/Cry1F*. Asimismo, resulta evidente que la tolerancia parece ser significativamente mayor (frecuencia y nivel total de la respuesta individual) con la secuencia de *AAD-1* (v3) optimizada para vegetales frente a la secuencia natural del *AAD-1* (v2) (véase la Tabla 16). Se han aplicado dosis más altas de 2,4-D (hasta 3.200 g e.a./ha) a otros individuos T₁ que expresaban el *AAD-1* (v3). Con tales dosis (6x la dosis de campo), el nivel de daño tiende a ser mayor y la frecuencia de plantas muy resistentes menor. También a estas elevadas dosis, la solución pulverizada resulta demasiado ácida si no se amortigua. Las plantas de *Arabidopsis* que crecen sobre todo en la cámara de crecimiento presentan una cutícula muy fina y las graves quemaduras pueden complicar las pruebas con estas dosis elevadas. A pesar de ello, algunos individuos soportaron 3200 g e.a./ha de 2,4-D sufriendo pocos o ningún daño.

Tabla 16. Respuesta de plantas de *Arabidopsis* T₁ transformadas con *AAD-1* v3 (optimizado para vegetales), o *AAD-1* v2 (natural), o *AAD-2* (natural) a un intervalo de dosis de 2,4-D aplicadas en postemergencia. La respuesta se presenta en términos de % de daño visual a las 2 semanas del tratamiento. Los datos se presentan en forma de histograma de los individuos que manifestaron daño limitado o nulo (<20%), daño moderado (20-40%) o daño grave (>40%). Dado que cada T₁ es un evento de transformación independiente, cabe esperar una variación significativa de las respuestas T₁ individuales dentro de una dosis dada. Se muestra la media aritmética y la desviación estándar de cada tratamiento. El intervalo de la respuesta individual también aparece indicado en la última columna para cada dosis y transformación. Las plantas de *Arabidopsis* transformadas con *PAT/Cry1F* sirvieron como control transformado sensible a los herbicidas auxínicos. La *Arabidopsis* natural no está transformada.

Tabla 16. Respuesta de plantas de *Arabidopsis* T₁ transformadas con *AAD-1* v3 (utilizada para vegetales), o *AAD-1* v2 (natural), o *AAD-2* (natural) a un intervalo de dosis de 2,4-D aplicadas en postemergencia.

	% Daño			% Daño	
				Std	
Gen AAD-1 (v2) natural					
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Dev
Tampón control no tratado	20	6	7	25,3	34,7
50 g e.a./ha 2,4-D	55	16	9	14,8	22,7
200 g e.a./ha 2,4-D	45	11	24	34,1	39,3
800 g e.a./ha 2,4-D	11	32	37	52,5	34,2
	% Daño			% Daño	
Gen AAD-2 natural				Med	Std
Promedios	<20%	20-40%	>40%		Dev
Tampón control no tratado	4	1	1	25,0	21,7
50 g e.a./ha 2,4-D	1	2	11	68,2	30,2
200 g e.a./ha 2,4-D	0	3	11	82,7	28,8
800 g e.a./ha 2,4-D	0	0	14	99,8	0,8
	% Daño			% Daño	
Gen AAD-1 (v3) reconstruido				Med	Std
Promedios	<20%	20-40%	>40%		Dev

Tampón control no tratado	9	0	0		0,0	0,0
50 g e.a./ha 2,4-D	10	1	5		24,3	35,9
200 g e.a./ha 2,4-D	11	4	1		14,0	25,9
800 g e.a./ha 2,4-D	11	4	1		14,7	26,1
	% Daño				% Daño	
Natural					Med	Std
Promedios	<20%	20-40%	>40%			Dev
Tampón control no tratado	11	0	0		0,0	0,0
50 g e.a./ha 2,4-D	0	0	15		90,0	0,0
200 g e.a./ha 2,4-D	0	0	15		95,1	0,5
800 g e.a./ha 2,4-D	0	0	15		100,0	0,0
	% Daño				% Daño	
PAT/CryIF (control transformado)					Med	Std
Promedios	<20%	20-40%	>40%			Dev
Tampón control no tratado	11	0	0		0,0	0,0
50 g e.a./ha 2,4-D	0	0	15		90,7	4,2
200 g e.a./ha 2,4-D	0	0	15		97,2	1,7
800 g e.a./ha 2,4-D	0	0	15		100,0	0,0

La Tabla 17 muestra una respuesta a la dosis similar de plantas de *Arabidopsis* T₁ al ácido fenoxipropiónico, diclorprop. También se observaron tendencias similares con el 2,4-D, lo cual indica que la cadena lateral quiral de ácido propiónico sirve como un sustrato aceptable. A continuación, se determinó que era posible conferir cierto grado de tolerancia al haloxifop a plantas de *Arabidopsis* transformadas expuestas a dosis elevadas de 400-1.600 g e.a./ha (Tabla 18). La dosis de haloxifop (graminicida) utilizada normalmente en el campo es de unos 50-70 g e.a./ha. Las dicotiledóneas se consideran por lo general tolerantes naturales a los herbicidas AOPP, pero en cambio, con tales dosis elevadas se produjeron efectos fisiológicos en *Arabidopsis*. Algunos individuos transformados con AAD-1 (v3) manifestaron una mayor tolerancia al haloxifop. Esto proporciona los primeros datos en plantas de que el AAD-1 (v3) proporciona resistencia frente a AOPP. No se observó resistencia alguna a fluoroxipir (un herbicida auxínico piridiloxiacetato) en las *Arabidopsis* transformadas, dato que concuerda con los estudios *in vitro* en los que se utilizaron una enzima expresada heterológamente.

Tabla 17. Respuesta de plantas de *Arabidopsis* T₁ a un intervalo de dosis de diclorprop aplicadas en postemergencia. La respuesta se presenta en términos de % de daño visual a las 2 semanas del tratamiento. Los datos se presentan en forma de histograma de los individuos que manifestaron poco o ningún daño (<20%), daño moderado (20-40%) o daño grave (>40%). Dado que cada T₁ es un evento de transformación independiente, cabe esperar una variación significativa de las respuestas T₁ individuales dentro de una dosis dada. Se muestra la media aritmética y la desviación estándar de cada tratamiento. El intervalo de la respuesta individual también aparece indicado en la última columna para cada dosis y transformación. Las plantas de *Arabidopsis* transformadas con PAT/Cry1F sirvieron como control transformado sensible a los herbicidas auxínicos. La *Arabidopsis* natural no está transformada.

Tabla 17. Respuesta de *Arabidopsis* T₁ a un intervalo de dosis de diclorprop aplicadas en postemergencia.

AAD-1 v3	% Daño				% Daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%		Med	Std Dev	Rango
Control no tratado	3	0	0		0,0	0,0	0

12,5 g e.a./ha RS-diclorprop	7	1	0		5,0	7,6	0-20
50 g e.a./ha RS-diclorprop	7	1	0		3,1	8,8	0-25
200 g e.a./ha RS-diclorprop	4	1	3		40,0	50,1	0-100
800 g e.a./ha RS-diclorprop	0	5	3		51,9	40,0	20-100
PAT/Cry1F	% Daño				% Daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%		Med	Std Dev	Rango
Control no tratado	3	0	0		0,0	0,0	0
12,5 g e.a./ha RS-diclorprop	0	6	2		38,1	25,3	20-95
50 g e.a./ha RS-diclorprop	0	0	8		80,0	25,3	50-100
200 g e.a./ha RS-diclorprop	0	0	8		98,3	2,2	95-100
800 g e.a./ha RS-diclorprop	0	0	8		100,0	0,0	100
Natural	% Daño				% Daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%		Med	Std Dev	Rango
Control no tratado	3	0	0		0,0	0,0	0
12,5 g e.a./ha RS-diclorprop	3	0	0		13,3	2,9	10-15
50 g e.a./ha RS-diclorprop	0	0	3		53,3	5,8	50-60
200 g e.a./ha RS-diclorprop	0	0	3		95,0	5,0	90-100
800 g e.a./ha RS-diclorprop	0	0	3		100,0	0,6	100

5 Tabla 18. Respuesta de plantas de *Arabidopsis* T₁ a un intervalo de dosis de haloxifop aplicadas en postemergencia y artificialmente altas para demostrar la tolerancia de esta dicotiledónea al graminicida. La respuesta se presenta en términos de % daño visual a las 2 semanas del tratamiento. Los datos presentados en forma de histograma corresponden a los individuos que sufrieron un daño escaso o nulo (<20%), daño moderado (20-40%), o daño grave (>40%). Dado que cada T₁ es un evento de transformación independiente, cabe esperar una variación significativa de las respuestas T₁ individuales dentro de una dosis dada. Se muestra la media aritmética y la desviación estándar de cada tratamiento. El intervalo de la respuesta individual también aparece indicado en la última columna para cada dosis y transformación. Las plantas de *Arabidopsis* transformadas con *PAT/Cry1F* sirvieron como control transformado sensible a los herbicidas auxínicos. La *Arabidopsis* natural no está transformada.

10 Tabla 18. Respuesta de plantas de *Arabidopsis* T₁ a un intervalo de dosis de haloxifop aplicadas en postemergencia y artificialmente altas con objeto de demostrar la tolerancia de esta dicotiledónea al graminicida.

AAD-1 v3	% Daño				% Daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%		Med	Std Dev	Rango
Control no tratado	3	0	0		0,0	0,0	0
100 g e.a./ha haloxifop	4	0	0		0,0	0,0	0
200 g e.a./ha haloxifop	4	0	0		0,0	0,0	0
400 g e.a./ha haloxifop	3	1	0		6,3	9,5	0-20
800 g e.a./ha haloxifop	1	1	2		46,3	42,7	0-85

1600 g e.a./ha haloxifop	1	0	3		65,0	47,3	0-100
PAT/CryIF		% Daño			% Daño		
Promedios	<20%	20-40%	>40%		Med	Std Dev	Rango
Control no tratado	3	0	0		0,0	0,0	0
100 g e.a./ha haloxifop	4	0	0		0,0	0,0	0
200 g e.a./ha haloxifop	4	0	0		10,0	0,0	10
400 g e.a./ha haloxifop	0	4	0		27,5	5,0	20-30
800 g e.a./ha haloxifop	0	0	4		78,8	6,3	70-85
1600 g e.a./ha haloxifop	0	0	4		47,5	43,5	80-100
Natural		% Daño			% Daño		
Promedios	<20%	20-40%>	>40%		Med	Std Dev	Rango
Untreated control	3	0	0		0,0	0,0	0
100 g e.a./ha haloxifop	3	0	0		0,0	0,0	0
200 g e.a./ha haloxifop	3	0	0		0,0	0,0	0
400 g e.a./ha haloxifop	0	3	0		20,0	0,0	20
800 g e.a./ha haloxifop	0	0	3		73,3	10,4	70-85
1600 g e.a./ha haloxifop	0	0	3		93,3	11,5	80-100

6.6 - AAD-1 (v3) como un marcador seleccionable

La capacidad para usar el AAD-1 (v3) como un marcador seleccionable utilizando el 2,4-D como agente de selección se analizó inicialmente con *Arabidopsis* transformadas del modo descrito anteriormente. Semillas T₁ transformadas con PAT y AAD-1 (v3) (pDAB 721) se sembraron en bandejas, germinaron como se ha descrito antes y fueron comparadas con semillas similares tratadas con el esquema de selección normal con glufosinato (5 y 10 DAP). El 2,4-D (50 g e.a./ha) se aplicó a las plántulas de *Arabidopsis* del mismo modo que el glufosinato. Se estudiaron variaciones en el número y en el calendario de aplicaciones. Cada bandeja de plantas recibió una o dos aplicaciones de 2,4-D de acuerdo con uno de los siguientes esquemas de tratamiento: 5+10 DAP, 5+14 DAP, 10 DAP, 10+14 DAP, 14 DAP. Las plantas se calificaron como resistentes o sensibles a los 19 DAP y se llevó a cabo una prueba con tiras ELISA para determinar la frecuencia de contranformación efectiva de un gen PAT activo.

Cincuenta y tres de las 70.000 semillas plantadas fueron identificadas como resistentes al 2,4-D. Con el ELISA se analizó un subgrupo de 44 individuos de esta población para detectar la expresión de la proteína PAT. El 96% de los individuos resultaron positivos, lo que indica la presencia del gen cotransformado, PAT. El escaso número de resultados negativos hallados en el ELISA (4%) concuerda con la tasa de error del 3% hallada en poblaciones de plantas resistentes al glufosinato (Tabla 15). La eficiencia de la selección con 2,4-D (0,08%) aparenta ser algo menor que la del glufosinato (0,12%), pero el intervalo de las tasas de selección en todos los experimentos parece indicar que ambos agentes de selección son igualmente buenos para la selección de las plantas de *Arabidopsis* transformadas con los genes AAD-1 (v3) o PAT, respectivamente. Dos aplicaciones sucesivas permiten identificar con más precisión a los individuos resistentes con los dos herbicidas analizados.

6.7 - Heredabilidad

Diversos eventos T₁ se autopolinizaron para producir las semillas T₂. Estas semillas constituyeron la progenie analizada mediante la aplicación de 2,4-D (200 g e.a./ha) a 100 hermanas T₂ escogidas al azar. Cada planta T₂ se trasplantó a macetas cuadradas de 7,5 cm antes de recibir la pulverización (pulverizador de carril a una dosis de aplicación de 187 l/ha). Más del 60% de las familias T₁ (plantas T₂) segregaron en la proporción prevista de 3 resistentes:1 sensible correspondiente a un solo locus heredado de forma dominante siguiendo un patrón mendeliano, según determinó el análisis de la ji al cuadrado (P>0,05).

Se recogieron semillas de entre 12 y 20 individuos T_2 (semillas T_3). Veinticinco hermanas T_3 de cada una de las ocho familias T_2 escogidas al azar constituyeron la progenie analizada del modo antes descrito. En todas las líneas analizadas se identificaron aproximadamente el tercio de las familias T_2 que debían ser homocigotas (poblaciones no segregantes): la frecuencia osciló entre una y cuatro de las ocho familias estudiadas. Estos datos demuestran que el *AAD1* ($v3$) permanece integrado de forma estable y que se hereda siguiendo un patrón mendeliano durante por lo menos tres generaciones.

6.8 - Resistencia contra otros herbicidas atribuible a la *AAD-1* en *Arabidopsis*

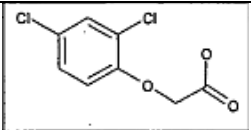
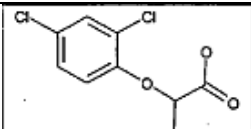
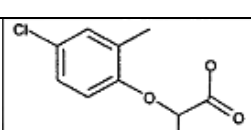
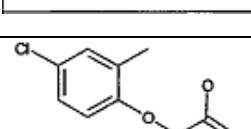
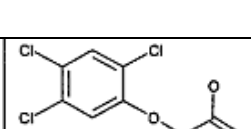
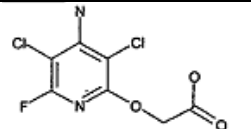
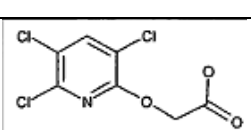
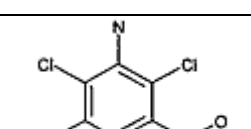
La capacidad del gen *AAD-1* ($v3$) para proporcionar resistencia frente a otros herbicidas ariloxifenoxialcanoato en plantas de *Arabidopsis* transgénicas se determinó utilizando un ensayo en placa *in vitro* modificado. Semillas de *Arabidopsis thaliana* naturales y portadoras del gen optimizado para vegetales *AAD-1* ($v3$) (plantas homocigotas T_4 id=PAAD1.315.064) fueron esterilizadas por agitación durante 10 min en una solución de lejía al 50%. Después se lavaron cuatro veces con agua estéril para eliminar la lejía.

Los análisis de dosis-respuesta se efectuaron con un medio nutritivo (véase más adelante) al que se le añadieron diversas dosis de compuestos problema. Dichos compuestos se añadieron al medio calentado (55°C) en forma de soluciones concentradas en DMSO. Los pocillos de control contenían la cantidad apropiada de DMSO sin ningún compuesto adicional. La concentración final de DMSO nunca superó el 1% (v/v). Una vez mezclada cuidadosamente, se añadió una alícuota de 6 ml del medio calentado con la concentración adecuada del compuesto a pocillos de una bandeja para cultivo de tejidos de poliestireno de 6 pocillos y fondo plano (Falcon 353046, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, N.J., EE.UU.). Una vez solidificado el medio, se depositaron encima aproximadamente entre 20 y 30 semillas de *Arabidopsis*, vertiendo los restantes 2 ml sobre las semillas. Las placas se agitaron suavemente para esparcir las semillas, se cubrieron y se dejaron enfriar hasta que el medio se solidificó completamente. A continuación, las placas se incubaron durante 7 días a 25°C bajo iluminación fluorescente continua ($75\ \mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). La composición del medio nutritivo es la descrita en el Ejemplo 2.2 y en Somerville y Orgen (1982).

Evaluación de la reducción del crecimiento. La porción apical de las plantas de *Arabidopsis* cultivadas en los medios tratados se evaluó visualmente comparándola con la porción apical de las plantas que crecían en los medios que solo contenían DMSO. Los valores se registraron como % de reducción del crecimiento. Las evaluaciones de la inhibición del crecimiento radicular en las plantas de *Arabidopsis* que crecían en los medios tratados se llevaron a cabo extrayendo con cuidado las plantas del medio y midiendo la longitud de la raíz. La longitud radicular se comparó entonces con la de las plantas control para calcular el porcentaje de reducción del crecimiento. Se evaluaron como mínimo cinco plantas de cada tratamiento. Los valores registrados corresponden a la media de todas las plantas evaluadas. Se calculó la concentración necesaria para lograr un efecto inhibitorio del 50% (I_{50}) en las raíces y en los brotes de las plantas de *Arabidopsis* naturales y transformadas con *AAD-1*. En la Tabla 19 se muestran los cocientes de los biotipos resistentes respecto a los sensibles aparecen. Un cociente >2 tanto en las mediciones de las raíces como de los brotes implica una resistencia significativa. Y a mayor cociente, mayor nivel de resistencia. Se observaron niveles significativos de resistencia frente a todos los herbicidas fenoxi comerciales, incluidos los ácidos oxiacéticos (2,4-D y MCPA) y los ácidos oxipropiónicos (diclorprop y mecoprop). De hecho, la evaluación a largo plazo de las raíces demuestra que la resistencia propiciada por el *AAD-1* ($v3$) contra el ácido oxipropiónico es superior a la evidenciada frente a los ácidos oxiacéticos, hecho que concuerda con las características enzimáticas de la *AAD-1* ($v1$). La evaluación de otros herbicidas auxínicos dotados de anillos piridínicos demostró que el *AAD-1* ($v3$) no protege de forma efectiva a *Arabidopsis* contra triclopir y fluoroxipir, ambos herbicidas piridiloxiacetato, ni contra el herbicida de ácido picolínico picloram. La amplia resistencia contra herbicidas auxínicos fenoxi es la primera descrita en plantas *in vivo*. Los herbicidas auxínicos frente a los cuales la *AAD-1* resulta ineficaz podrían ser herramientas viables de control y contención de los cultivos comerciales o las especies vegetales experimentales transformadas con *AAD-1*.

Tabla 19. Evaluación con el ensayo en placa *in vitro* de la resistencia cruzada frente a sustratos herbicidas proporcionada por el *AAD-1* ($v3$) en *Arabidopsis* T_4 homocigotas (ARBTH).

Compuesto	Estructura	wt ARBTH shoot 150	PAAD1.315.064 T3 ARBTH shoot 150	wt ARBTH root 150	PAAD 1.315.064 ARBTH root 150	Cocient e brotes	Cocient e raíces
		ppm					
Auxinas fenoxi							

2,4-D		0,2	10	<0,01	0,04	50	>4
diclorprop		2	5	0,01	1,5	2,5	150
Mecoprop		2	25	0,01	1,5	12,5	150
MCPA		0,2	1	0,01	0,03	5	3
2,4,5-T		1,5	10	<0,01	<0,01	6,67	NA
Auxinas piridínicas							
Fluroxipir		2	1	0,2	0,2	0,5	1
Triclopir		0,2	0,04	0,02	0,02	0,2	1
Picloram		1	0,5	0,3	0,15	0,5	0,5

6.9 - Resistencia a herbicidas aplicados por vía foliar en *Arabidopsis* portadora del AAD-1

La capacidad del AAD-1 (v3) para conferir resistencia frente a otros herbicidas auxínicos ariloxifenoxiacetoato en *Arabidopsis* transgénicas se determinó mediante la aplicación foliar de diversos sustratos descritos en el Ejemplo 6.8. La generación de semillas T₄ de *Arabidopsis*, que eran homocigotas para el AAD-1 (v3) (línea AAD1.01.315.076) se estratificó y se sembró en bandejas de selección de forma muy similar a las plantas *Arabidopsis* del Ejemplo 6.4. Una línea de control transformada portadora del gen *PAT* y del gen de resistencia a insectos *Cry1F* se plantó de manera similar. Las plántulas se trasplantaron a macetas individuales de 3 pulgadas en el invernadero. Todas las plantas se pulverizaron con un pulverizador de carril a 187 l/ha. Fueron expuestas a una gama de herbicidas auxínicos fenoxi: 12,5-1600 g e.a./ha de la sal dimetilamina del 2,4-D (DMA) (Riverside Chemicals), 12,5-1600 g e.a./ha de mecoprop (AH Marks), 50-3200 g e.a./ha de R-diclorprop (AH Marks), 8,75-1120 g e.a./ha de 2,4,5-T (calidad técnica); herbicidas piridiloxiacetatos 50-3200 g e.a./ha de triclopir (Dow AgroSciences) y 50-3200 g e.a./ha de fluroxipir (Dow AgroSciences); y, por último, el metabolito del 2,4-D resultado de la actividad de AAD-1, el 2,4-diclorofenol (DCP, Sigma) (a 50-3200 g e.a./ha, calidad técnica). Todas las aplicaciones se formularon en tampón Hepes 200 mM (pH 7,5). Cada tratamiento se repitió 3-4 veces. Las plantas se evaluaron a los 3 y 14 días después

del tratamiento y se promediaron dos experimentos.

Estos resultados (véase la Tabla 20) confirman que el AAD-1 (v3) en *Arabidopsis* proporciona una fuerte resistencia contra los herbicidas auxínicos fenoxiacéticos, auxínicos fenoxipropiónicos, pero no confiere una resistencia cruzada significativa contra los auxínicos piridiloxiacéticos analizados, resultado que corrobora los datos de los ensayos enzimáticos *in vitro* y de la especificidad de sustrato en placa entera. Además, en las plantas de *Arabidopsis* naturales y transgénicas no se aprecia efecto alguno del metabolito, el 2,4-diclorofenol (DCP).

5

Tabla 20. Comparación de las respuestas de plantas <i>Arabidopsis</i> T ₄ naturales y homocigotas para AAD-1 (v3) frente a varios herbicidas auxínicos aplicados por vía foliar.		
Auxínicos fenoxipropiónicos		
Tratamiento herbicida	Media % de daño en la 14DAT	
	AAD1.01.315.076.T ₄ Plantas homocigotas AAD1	PatCrylf-Control
50 g e.a./ha R-diclorprop	3	31
200 g e.a./ha R-diclorprop	3	73
800 g e.a./ha R-diclorprop	3	89
3200 g e.a./ha R-diclorprop	3	95
12.5 g e.a./ha Mecoprop	3	0
25 g e.a./ha Mecoprop	0	2
50 g e.a./ha Mecoprop	0	17
100 g e.a./ha Mecoprop	0	33
200 g e.a./ha Mecoprop	3	62
400 g e.a./ha Mecoprop	0	78
800 g e.a./ha Mecoprop	0	93
1600 g e.a./ha Mecoprop	0	100
Phenoxyacetic auxins		
Tratamiento herbicida	Media % de daño a 14DAT	
	AAD1.01.315.076.T ₄ Plantas homocigotas AAD1	Pat/Crylf-Control
12.5 g e.a./ha 2,4-D DMA	0	67
25 g e.a./ha 2,4-D DMA	0	78
50 g e.a./ha 2,4-D DMA	0	93
100 g e.a./ha 2,4-D DMA	0	100
200 g e.a./ha 2,4-D DMA	0	100
400 g e.a./ha 2,4-D DMA	0	100
800 g e.a./ha 2,4-D DMA	0	100
1600 g e.a./ha 2,4-D DMA	0	100
8.75 g e.a./ha 2,4,5-T	0	0

17.5 g e.a./ha 2,4,5-T	3	20
35 g e.a./ha 2,4,5-T	0	43
70 g ae/ha 2,4,5-T	3	85
140 g e.a./ha 2,4,5-T	0	95
280 g e.a./ha 2,4,5-T	0	98
560 g e.a./ha 2,4,5-T	17	100
1120 g e.a./ha 2,4,5-T	3	100
Auxínicos piridiloxiacéticos		
Tratamiento herbicida	Media % de daño a 14DAT	
	AAD1.01.315.076.T ₄	
	Plantas homocigotas AAD1	Pat/Cry If-Control
50 g e.a./ha Triclopyr	31	36
200 g e.a./ha Triclopyr	58	65
800 g e.a./ha Triclopyr	74	84
3200 g e.a./ha Triclopyr	97	95
50 g e.a./ha Fluroxypyr	48	76
200 g e.a./ha Fluroxypyr	75	85
800 g e.a./ha Fluroxypyr	88	85
3200 g e.a./ha Fluroxypyr	95	95
Metabolito DCP inactivo		
50 g e.a./ha 2,4-DCP	0	0
200 g e.a./ha 2,4-DCP	0	0
800 g e.a./ha 2,4-DCP	0	0
3200 g e.a./ha 2,4-DCP	0	0

6.10 - Relación del crecimiento de la planta con la expresión de la AAD-1 (v3) en *Arabidopsis*

Se diseñó un experimento para examinar si el nivel de expresión de la AAD-1 (v3) en *Arabidopsis* varía dependiendo de la etapa de crecimiento. Con tal fin, se cultivó en invernadero una línea T₄ homocigota para AAD-1 (v3) y de alta tolerancia (id=PAAD1.01.345.163). La mitad de las plantas fue tratada con 800 g e.a./ha de 2,4-D (del modo antes descrito) y la otra mitad no recibió tratamiento alguno. Dos hojas, la tercera desde el extremo superior y la quinta desde el extremo inferior, se arrancaron de 5 plantas, tanto tratadas como sin tratar, y se analizaron con ELISA y transferencia Western (del modo descrito en el Ejemplo 11) a los 4, 10, 14, 20 y 25 DAT. Las Figuras 8A y 8B demuestran que no hubo una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la AAD-1 (v3) en las hojas jóvenes y viejas. Asimismo, el herbicida 2,4-D tuvo escaso impacto en el nivel de expresión de la proteína AAD-1 (v3). La proteína se había acumulado más en las plantas más viejas y se observó cierta degradación sustancial de la misma en los intervalos de tiempo más largos.

En otro experimento distinto, cuatro líneas T₄ homocigotas distintas de *Arabidopsis* que presentaban diferentes niveles de tolerancia al herbicida 2,4-D fueron pulverizadas con diversas dosis (0, 200, 800 y 3200 g/ha) de 2,4-D tras lo cual se examinaron los daños causados por el herbicida y la expresión de AAD-1 (v3). Cuatro días después del tratamiento herbicida, apenas se observaron daños en tres de las cuatro líneas, incluso con la dosis más elevada (Figura 9A). Dichas plantas también expresaron niveles elevados de AAD-1 (v3), de entre el 0,1% y el 0,25% (Figura 9B). En cambio, la línea con escasa tolerancia expresó menos del 0,1% de AAD-1 (v3) en la TSP y sufrió daños apreciables. Pero lo que resulta más destacable es que estas plantas se habían recuperado de los daños a los 14 DAT (Figura 9A), lo que indica que un bajo nivel de expresión de la AAD-1 (v3) consiguió protegerlas de los daños

graves causados por el herbicida. Todas las plantas control sufrieron daños graves y habían muerto a los 14 DAT tras recibir dosis de por lo menos 800 g e.a./ha de 2,4-D y mayores.

6.11 - Análisis molecular de las *Arabidopsis* portadoras del AAD-1 (v3)

Con objeto de determinar la integración estable de la unidad de transformación vegetal compuesta por los genes *PAT* y *AAD-1* (v3) a varias líneas homocigotas de *AAD-1* (v3) se les practicó un ensayo Invader (métodos de Third Wave Agbio Kit Procedures) para determinar el número de copias del gen *PAT* y/o una transferencia Southern con el ADN total obtenido con el kit DNeasy de Qiagen. El análisis supuso que existía un ligamiento físico directo entre ambos genes, ya que estaban contenidos en el mismo plásmido.

Para el análisis Southern, se sometió un total de 1 µg de ADN a una digestión hasta el día siguiente con Nsi I del pDAB721 a fin de obtener los datos de integración. Las muestras se procesaron en un gel grande de agarosa al 0,85% hasta el día siguiente a 40 voltios. A continuación, el gen se desnaturalizó con NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos y después se neutralizó con Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M y pH de 7,5 durante 30 minutos. Seguidamente se preparó un aparato de gel con SSC 20x para transferir por gravedad el gel a una membrana de nilón (Millipore INYC00010), dejándolo hasta el día siguiente. Acabada la transferencia, la membrana se expuso a luz UV en presencia de un entrelazador (stratagene UV stratalinker 1800) a 1200x100 microjulios. Después la membrana se lavó con SDS 0,1%, SSC 0,1 durante 45 minutos. Finalizado el lavado de 45 minutos, la membrana fue horneada durante 3 horas a 80° C y se conservó a 4° C hasta la hibridación. El molde de hibridación consistió en los cebadores preparados (Pat 5-3 AGATACCTTGTTGGTTGC) (SEC ID nº 23) y (Pat 3-3 CAGATGGATCGTTTGAAGG) (SEC ID nº 24) diseñados para obtener la región codificante del gen *PAT*. El producto se inyectó en un gel de agarosa al 1%, se recortó y después se extrajo el gel con el procedimiento de extracción de Qiagen (28706). La membrana se sometió entonces a una etapa de prehibridación a 60° C durante 1 hora en tampón Perfect Hyb (Sigma H7033). Con el procedimiento Prime it RmT dCTP-labeling rxn (Stratagene 300392) se procedió al revelado con una sonda de ³²P (Perkin Elmer). La sonda sobrante se lavó con columnas ProbeQuant G50 (Amersham 27-5335-01). Se usaron 2 millones de CPM por ml de tampón Perfect Hyb para hibridar las membranas de transferencia hasta el día siguiente. Finalizada la hibridación las membranas se sometieron a dos lavados de 20 minutos a 65° C con SDS 0,1%, SSC 0,1. Finalmente, las membranas se expusieron a película fotográfica dejándolas hasta el día siguiente, incubadas a -80° C.

Los resultados demuestran que todas las plantas resistentes al 2,4-D analizadas contenían el gen *PAT* (y, por tanto, se deduce que el *AAD-1* (v3) también). El análisis del número de copias reveló que el número total de insertos oscilaba entre 1 y >10 copias. Este resultado concuerda con los datos de expresión de la proteína *AAD-1* (v3), lo cual indica que la presencia de la enzima se traduce en niveles significativamente altos de resistencia (>>200 veces) a todos los ácidos fenoxiacéticos y fenoxipropiónicos comerciales.

6.12 - *Arabidopsis* transformada con el apilamiento molecular del gen AAD-1 (v3) y el gen de resistencia al glifosato

Del modo descrito anteriormente se produjeron semillas T₁ de *Arabidopsis* portadoras del plásmido pDAB3230 (*AAD-1* (v3) + *EPSPS*) que codificaba un supuesto carácter de resistencia al glifosato. Las transformantes T₁ se seleccionaron utilizando el *AAD-1* (v3) como marcador seleccionable del modo descrito en el Ejemplo 6.6, con la salvedad de que la dosis de 2,4-D utilizada fue de 75 g e.a./ha. En el primer intento de selección se obtuvieron 24 eventos transformados T₁ que se trasplantaron a macetas de tres pulgadas en el invernadero como se ha descrito antes. También se analizaron tres líneas de control de *Arabidopsis* distintas: natural Columbia-0, líneas T₅ homocigotas *AAD-1* (v3) + *PAT* (transformadas con pDAB721), y una línea homocigota *PAT* + *Cry1F* (control transformado). Sólo las plantas portadoras del pDAB3230 fueron preseleccionadas en el estadio de plántula por su tolerancia al 2,4-D. Cuatro días después del trasplante, las plantas se dividieron en partes iguales para recibir el tratamiento foliar con un pulverizador de carril del modo antes descrito con 0, 26,25, 105, 420 ó 1680 g e.a./ha de glifosato (Glyphomax Plus, Dow AgroSciences) en tampón Hepes 200 mM (pH 7,5). Todos los tratamientos se repitieron 4 ó 5 veces. Las plantas se evaluaron 7 y 14 días después del tratamiento. El cálculo de los valores I₅₀ reveló un nivel de tolerancia >14 veces mayor conferido por el apilamiento del *EPSPS* con el *AAD-1* (v3) (véase la figura 10). El *AAD-1* (v3) no confirió resistencia al glifosato (re: respuesta pDAB721). Estas plantas T₁ se cultivaron para obtener semillas, siendo autopolinizadas para engendrar las semillas T₂. Las plantas T₁ portadoras del pDAB3230 han demostrado tolerancia a dosis letales de 2,4-D y de glifosato. Las plantas T₂ seguirán siendo analizadas para demostrar que estas plantas cotransformadas pueden resistir los tratamientos de mezcla en tanque a base de glifosato+2,4-D como se describe en el Ejemplo 21 y se ha demostrado en maíz transformado con *AAD-1* (v3) en el Ejemplo 8.

Ejemplo 7

Transformación con triquitas del maíz, y uso del AAD-1 (v3) como marcador seleccionable

7.1 - Clonación del AAD-1 (v3)

El fragmento de *AAD-1* (v3) se recibió integrado en un fragmento NcoI/SacI. El constructo pDAB4005 se digirió con NcoI y SacI y se aisló el fragmento central de 5175 pb. Los dos fragmentos se unieron con ADN-ligasa de T₄ y se transformaron en células DH5α. Se realizaron minipreps de las colonias resultantes con el kit mini prep QIA Spin de

Qiagen, y después se digirieron para comprobar la orientación. El plásmido intermedio correcto se denominó pDAB3403. El pDAB3403 y el pDAB8505 (OsAct1/PAT/ZmLip) se digirieron con NotI. La banda de 3442 pb derivada del pDAB3403 y la banda de 11017 pb del pDAB8505 se aislaron y se purificaron. Ambos fragmentos se unieron juntos, se insertaron en células DH5 α y los plásmidos resultantes se analizaron para comprobar la orientación. El constructo final se designó pDAB3404, que contiene ZmUbi1/po-aad1/ZmPer5::OsAct1/PAT/ZmLip.

7.2 - Iniciación del callo/suspensión

Con objeto de obtener embriones inmaduros para iniciar el cultivo de callos, se practicaron cruces F₁ entre progenitores Hi-II A y B cultivados en invernadero (Armstrong *et al.* 1991). Cuando los embriones tenían 1,0-1,2 mm de tamaño (unos 9-10 días después de la polinización) se recogieron las espigas y su superficie se esterilizó lavándolas con jabón Liqui-Nox®, sumergiéndolas en etanol al 70% durante 2-3 minutos y, después, en lejía comercial al 20% (hipoclorito sódico 0,1%) durante 30 minutos.

Las espigas se lavaron con agua destilada estéril, los embriones cigóticos inmaduros se extrajeron en condiciones asépticas y se cultivaron en medio 15Ag10 (medio N6 (Chu *et al.*, 1975), 2,4-D 1,0 mg/l, sacarosa 20 g/l, hidrolizado de caseína 100 mg/l (digestión enzimática), L-prolina 25 mM, AgNO₃ 10 mg/l, Gelrite 2,5 g/l, pH 5,8) durante 2-3 semanas con el escutelo apartado del medio. El tejido que presentaba la morfología adecuada (Welter *et al.*, 1995) se transfirió selectivamente a intervalos quincenales a medio 15Ag10 fresco durante aproximadamente 6 semanas, y después se transfirió a medio 4 (medio N6, 2,4-D 1,0 mg/l, sacarosa 20 g/l, hidrolizado de caseína 100 mg/l (digestión enzimática), L-prolina 6 mM, Gelrite 2,5 g/l, pH 5,8) a intervalos quincenales durante aproximadamente 2 meses.

Para iniciar los cultivos embriogénicos en suspensión, se añadieron aproximadamente 3 ml de volumen celular compactado (PCV) del callo generado a partir de un único embrión a aproximadamente 30 ml de H9CP + medio líquido (mezcla basal de sales MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas MS modificadas con un contenido 10 veces menor de ácido nicotínico y 5 veces más de tiamina-HCl, 2,4-D 2,0 mg/l, ácido α -naftalenacético (NAA) 2,0 mg/l, sacarosa 30 g/l, hidrolizado de caseína 200 mg/l (digestión con ácido), mioinositol 100 mg/l, L-prolina 6 mM, agua de coco 5% v/v (añadida justo antes del subcultivo), pH 6,0). Los cultivos en suspensión se mantuvieron a oscuras en matraces Erlenmeyer de 125 ml en un agitador de temperatura controlada a 125 rpm y 28° C. Las líneas celulares quedaron establecidas por lo general en el plazo de dos a tres meses desde la iniciación. Durante el establecimiento, las suspensiones se subcultivaron cada 3,5 días añadiendo 3 ml de PCV de células y 7 ml de medio acondicionado a 20 ml de H9CP + medio líquido fresco con una micropipeta de punta ancha. Cuando el tejido comenzó a doblar su tamaño, las suspensiones se ampliaron y se introdujeron en matraces de 500 ml en los cuales 12 ml de PCV de células y 28 ml de medio acondicionado se transfirieron a 80 ml de H9CP + medio. Una vez las suspensiones quedaron completamente establecidas, se criopreservaron para uso futuro.

7.3 - Criopreservación y descongelación de la suspensiones

Dos días después del subcultivo, se añadieron 8 ml de crioprotector (disuelto en medio H9CP+ sin agua de coco, glicerol 1 M, DMSO 1 M, sacarosa 2 M, esterilizado con filtro) a 4 ml de PCV de células en suspensión y 4 ml de medio acondicionado, y a continuación se agitó a 125 rpm y 4° C durante 1 hora en un matraz de 125 ml. Al cabo de 1 hora se añadieron 4,5 ml a un criovial Corning de 5,0 ml preenfriado. Una vez llenos los viales, estos se mantuvieron durante 15 minutos a 4° C en un congelador de velocidad controlada, y después se dejaron congelar a una velocidad de -0,5° C/minuto hasta alcanzar una temperatura final de -40° C. Alcanzada dicha temperatura, los viales se transfirieron a cajas con gradillas contenidas en una unidad de almacenamiento Cryoplus 4 (Forma Scientific) llena con vapores de nitrógeno líquido.

Para la descongelación los viales se extrajeron de la unidad de almacenamiento, se depositaron en un contenedor cerrado con hielo seco y después se sumergieron en un baño maría a 40-45° C hasta que la "ebullición" desapareció. Una vez descongelados, los contenidos se vertieron sobre una pila de ~8 papeles de filtro estériles Whatman de 70 mm (Nº 4) en placas de Petri de 100x25 mm tapadas. Tras dejar durante unos minutos que los filtros absorbieran el líquido, el filtro superior con las células se transfirió a medio GN6 (medio N6, 2,4-D 2,0 mg/l, sacarosa 30 g/l, Gelrite 2,5 g/l, pH 5,8) durante 1 semana. Al cabo de la semana, sólo el tejido con una morfología conveniente se transfirió del papel de filtro directamente a medio GN6 fresco. Este tejido se subcultivó cada 7-14 días hasta disponer de 1 a 3 gramos para iniciar el cultivo en suspensión en aproximadamente 30 ml de medio H9CP+ en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Tres mililitros de PCV se subcultivaron en medio H9CP+ fresco cada 3,5 días hasta obtener un total de 12 ml de PCV, momento en que se inició el subcultivo como se describe anteriormente.

7.4 - Dosis-respuesta de tejido no transformado al ácido haloxifop

Se agruparon varias líneas celulares Hi-II donantes sin transformar, se trataron con triquitas sin ADN, se filtraron en medio GN6 a razón de 6 ml por filtro, y se dejó que formaran un callo durante 2-3 semanas a 28° C. Por cada tratamiento, se transfirieron aproximadamente 200 mg del tejido de callo en suspensión a los medios de selección en placas de 60x20 mm que contenían ácido R-haloxifop 30, 100 ó 300 nM. Se hicieron tres duplicados de cada concentración. También se preparó un medio control con bialafos 1 mg/l (formulación comercial Herbiace, Meiji

Seika, Japón) y GN6 (1H) para comparar. El callo se extrajo a las 2 semanas, se pesó y se transfirió a medio fresco con la misma concentración durante otras 2 semanas. Transcurridas un total de 4 semanas, se extrajo el tejido, se pesó por última vez y se desechó. Los resultados se presentan en la figura 11.

También se llevaron a cabo dos estudios independientes de dosis respuesta del callo a los productos de degradación fenólicos del haloxifop y cihalofop para confirmar que estos productos finales no serían perjudiciales para el crecimiento del mismo. Los datos de dosis-respuesta a los fenoles derivados del cihalofop (véase la figura 12) demuestran que con una concentración de fenoles del cihalofop de 1 μM , el crecimiento sigue suponiendo el 76% del observado en el control exento de fenoles del cihalofop. Los datos correspondientes a la dosis-respuesta de los fenoles del haloxifop demuestran que incluso con una concentración de fenoles del haloxifop de 300 nM, el crecimiento fue igual o superior al del control no expuesto a tales fenoles (datos no representados).

7.5 - Transformación con triquitas con selección por bialafos

Alrededor de 24 horas antes de la transformación, 12 ml de PCV de células de maíz embriogénicas criopreservadas en suspensión más 28 ml de medio acondicionado se subcultivaron en 80 ml de medio líquido GN6 (medio GN6 sin Gelrite) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, colocándose en un agitador a 125 rpm y 28° C. Este paso se repitió dos veces con la misma línea celular, de modo que en total se repartieron 36 ml de PCV en 3 matraces. Veinticuatro horas después se extrajo el medio líquido GN6 y se substituyó por 72 ml de medio osmótico GN6 S/M (medio N6, 2,4-D 2,0 mg/l, sacarosa 30 g/l, sorbitol 45,5 g/l, manitol 45,5 g/l, mioinositol 100 mg/l, pH 6,0) por matraz con el fin de lisar las células. Los matraces se colocaron en un agitador a oscuras durante 30-35 minutos, y durante ese tiempo se preparó una suspensión de triquitas de carburo de silicio de 50 mg/ml añadiendo el volumen adecuado de medio líquido GN6 S/M a ~405 mg de triquitas de carburo de silicio autoclavadas (Advanced Composite Materials, Inc.).

Tras la incubación en GN6 S/M, se vertieron los contenidos de los matraces en un único frasco de centrífuga de 250 ml. Una vez sedimentadas las células, se extrajo todo el líquido GN6 S/M menos ~14 ml y se reservó en un matraz estéril de 1 litro para su uso posterior. La suspensión prehumedecida de triquitas se vortexó durante 60 segundos a máxima velocidad y se añadieron 8,1 ml al frasco, al cual se añadieron después 170 μg de ADN como último paso. El frasco se colocó inmediatamente en un mezclador comercial de pintura Red Devil 5400 modificado y se agitó durante 10 segundos. Acabada la agitación, la mezcla de células, medios, triquitas y ADN se añadió al contenido del matraz de 1 litro junto con 125 ml de medio líquido GN6 fresco para reducir la osmolaridad. Las células se dejaron recuperar en un agitador durante 2 horas antes de filtrarlas en un papel de filtro Whatman nº 4 (5,5 cm) utilizando una unidad recolectora de células de vidrio que estaba conectada a un tubo de vacío.

Sobre la superficie del filtro sometido a vacío se pipetearon 3 ó 6 ml de suspensión dispersada. Los filtros se depositaron en placas de 60 x 20 mm con medio GN6, y las placas se cultivaron durante 1 semana a 28° C en una caja oscura cubierta con una lámina de plástico (<2 milímetros de espesor), pero no herméticamente, a fin de reducir la evaporación de las placas individuales.

Al cabo de 1 semana, los papeles de filtro se transfirieron a placas de 60x20 mm con medio GN6 (1H) (medio N6, 2,4-D 2,0 mg/l, sacarosa 30 g/l, mioinositol 100 mg/l, bialafos 1,0 mg/l, Gelrite 2,5 g/l, pH 5,8) o medio GN6D (1H) (igual que el GN6 (1H) excepto por la presencia de dicamba 8,0 mg/l y 2,4-D 0,8 mg/l).

Las placas se depositaron en cajas y se cultivaron como antes durante otra semana. Dos semanas después de la transformación, el tejido se incluyó sembrando la mitad de las células de la placa o bien la totalidad en 3,0 ml de medio de agarosa GN6 fundido (medio N6, 2,4-D 2,0 mg/l, sacarosa 30 g/l, mioinositol 100 mg/l, agarosa Sea Plaque 7 g/l, pH 5,8, autoclavada durante solamente 10 minutos a 121° C) que contenía bialafos 1 mg/l. El tejido se disgregó y 3 ml de agarosa y tejido se vertieron uniformemente sobre la superficie de una placa de 100 x 15 mm con medio GN6 (1H) o GN6D (1H). Este paso se repitió con las demás placas. Finalizada la inclusión, las placas se sellaron individualmente con Nescofilm® o Parafilm M®, y después se cultivaron durante 1 semana a 28° C en cajas oscuras.

Los aislamientos presumiblemente transformados solían hacerse visibles entre 5 y 8 semanas después de la transformación. Los aislamientos potenciales se extrajeron de la placa incluida y se transfirieron a medio de selección fresco de la misma concentración utilizada en las placas de 60 x 20 mm. Si al cabo de 2 semanas aproximadamente se apreciaba un crecimiento sostenido, el evento se consideraba resistente y era sometido al análisis molecular.

La regeneración se inició transfiriendo el tejido de callo a un medio inductor con citocininas, 28 (1H), que contenía bialafos 1 mg/l, sales y vitaminas MS, sacarosa 30,0 g/l, BAP 5 mg/l, 2,4-D 0,25 mg/l, Gelrite 2,5 g/l; pH 5,7. Las células se dejaron crecer con poca luz ($13 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante una semana y después con luz más intensa ($40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) otra semana más antes de transferirlas al medio de regeneración, 36 (1H), idéntico al 28 (1H) salvo porque carecía de reguladores del crecimiento vegetal. Las plántulas pequeñas (3-5 cm) se sacaron y se depositaron en tubos de cultivo de 150 x 25 mm que contenían medio SHGA sin agente de selección (sales basales y vitaminas de Schenk y Hildebrandt, 1972; mioinositol 1 g/l, sacarosa 10 g/l, Gelrite 2,0 g/l, pH 5,8). Una vez las plántulas desarrollaron un sistema radicular y aéreo suficiente, se trasplantaron a suelo en un invernadero.

7.6 - Transformación con triquitas con selección por haloxifop

Los parámetros de inserción del ADN utilizados para la selección directa con herbicidas “fop” fueron idénticos a los del procedimiento de selección con bialafos, excepto en que se cotransformaron juntos 85 µg de pDAB3403 y 85 µg de un constructo que contenía un gen marcador de GFP (proteína verde fluorescente), y que sólo se filtraron 3 ml de suspensión en medio GN6 después de la recuperación de 2 horas.

- 5 Al cabo de 0-7 días en medio GN6 sin agentes de selección, los papeles de filtro se transfirieron a placas de 60x20 mm con medio GN6 que contenía 2,4-D 2 mg/l más ácido R-haloxifop 50, 100 ó 200 nM. Las placas se colocaron en cajas y se cultivaron durante otra semana más. Al cabo de esa semana, el tejido se incluyó sembrando todas las células de la placa en 3,0 ml de medio de agarosa GN6 fundido que contenía la misma concentración de agente de selección que en la transferencia previa. Todas las etapas posteriores fueron idénticas al protocolo de selección con PAT/regeneración salvo porque el medio de regeneración contenía ácido R-haloxifop 100 nM en lugar de bialafos 1 mg/l.

- 15 7.7 - Resultados. Se iniciaron varios experimentos de análisis con diversos niveles de haloxifop y cihalofop, y se recuperaron 47 aislamientos por selección directa. Un subgrupo de eventos en callo fue analizado con PCR y transferencia Western. Tras obtener los datos de expresión, 21 eventos destacados fueron sometidos a un análisis con transferencia Southern. Los resultados obtenidos con NcoI, enzima de restricción de corte único, para obtener los datos de integración después del análisis con sonda del AAD-1 (v3), demuestran sin lugar a dudas la integración estable del AAD-1 (v3) tras la transformación con triquitas combinada con la selección con herbicidas “fop” (ariloxifenoxipropionato).

- 20 7.8 - Demostración cuantitativa de la tolerancia *in vitro* de eventos en callo que expresan la AAD-1 (v3) sometidos a selección con bialafos

- 25 Noventa y siete aislamientos de callo recuperados de la selección con bialafos fueron sometidos a un análisis Invader para conocer el número de copias de PAT así como a un análisis de PTU del AAD-1 (v3) con PCR (véase el Ejemplo 7.10). El análisis de la expresión de la proteína AAD-1 (v3) con transferencia Western/ELISA en sándwich (Ejemplo 11) se llevó a cabo con un subgrupo de los eventos. En la Tabla 21 se describe un resumen. De cada uno de estos eventos se regeneraron por lo menos 15 plantas T₀ con las que se efectuaron pruebas de pulverización y de las que se obtuvieron semillas.

Tabla 21.			
Evento N.º	Nº de copias de PAT	PCR de la PTU del AAD-1 (v3)	Western del callo
3404-001	2	+	+
3404-006	2	+	+
3404-013	3	+	+
3404-017	1	+	+
3404-020	3	+	nd
3404-022	2	+	+
3404-025	2	+	+
3404-027	3	+	+
3404-031	1	+	+
3404-033	2	+	nd
3404-036	3	+	+
3404-044	3	+	+
3404-050	3	+	+
3404-053	3	+	+
3404-074	2	+	+
3404-082	2	+	+

- 5 Un subgrupo más pequeño de estos eventos se evaluó en estudios de dosis-respuesta comparándolo con un control no transformado. Se analizó un intervalo de concentraciones de haloxifop de hasta 400 nM (formulación Gallant Super). Los datos de dosis-respuesta de un evento, el 3404-006, se generaron utilizando los métodos generales del Ejemplo 7.4, y se muestran en la figura 13. Estos demuestran que el evento 3404-006 no manifestó una reducción significativa del crecimiento del callo a concentraciones de haloxifop de hasta 400 nM, mientras que el crecimiento del callo de maíz no transgénico sí se vio inhibido a dicha dosis. Estos datos no han sido normalizados para tener cuenta las diferencias inherentes de crecimiento que no están vinculadas con la expresión del transgén.

7.9 - Transformación con triquitas con selección por imazetapir

- 10 La casete ZmUbi1/AAD-1 (v3)/ZmPer5 se extrajo del pDAB3404 con Ascl/SwaI y se insertó en pDAB2212 para crear el vector para transformación de AAD-1 (v3) y AHAS con triquitas pDAB3415, también denominado pDAS1283). Una vez acabado, este constructo se transformó en maíz por medio de triquitas de carburo de silicio como se ha descrito en el Ejemplo 7.4, excepto porque se filtraron 2 ml de células, proceso al que siguieron una recuperación de 7 días en medio GN6 y la selección con un medio que contenía imazetapir 3 µM procedente del herbicida Pursuit® DG. El análisis Invader permitió identificar 36 eventos que contenían los genes AAD-1 (v3) y AHAS.
- 15 Cincuenta y tres eventos de callos de maíz derivados de estas transformaciones se analizaron con ELISA y con transferencia Western para determinar la expresión de AAD-1 (v3) - un subgrupo de los datos se muestra a continuación. En los eventos citados en la Tabla 22, los niveles de expresión de los eventos detectados como positivos oscilaron entre 90 y más de 1000 ppm en la proteína soluble total.

Tabla 22.		
Número de ID del evento AAD-1	Nivel de expresión (ppm)	Transferencia Western
1283[1]-001	2	-
1283[I]-002	206	+++
1283[I]-003	1	-
1283[I]-004	90	+++
1283[I]-005	1	-
1283[I]-006	105	+++
1283[I]-007	212	++
1283[I]-008	114	±
1283[I]-009	305	+
1283[1]-010	2	-
1283[1]-011	4	-
1283[1]-012	200	+++
1283[1]-013	134	+++
1283[1]-014	4	-
1283[1]-015	194	+++
1283[1]-016	4	-
1283[1]-017	196	+++
1283[1]-018	3	-
1283[1]-019	178	+
1283[I]-020	260	++

1283[I]-021	144	+++
1283[I]-022	140	+++
1283[I]-023	191	+++
1283[I]-024	392	++
1283[I]-025	368	++
1283[I]-026	14	-
1283[I]-027	1006	++
Control Neg	3	-
Control Neg	3	-
Patrón (0,5 µg/mL)		++
Patrón (5 µg/mL)		++++

7.10 - Análisis molecular: materiales y métodos aplicados a maíz

7.10.1 - Obtención del tejido, aislamiento y cuantificación del ADN. Tejido fresco repartido en varios tubos se liofilizó a 4° C durante 2 días. Una vez completamente seco, se introdujo una perla de tungsteno (Valenite) en cada tubo y las muestras de tejido se sometieron durante 1 minuto a molienda en seco con un molino de perlas Kelco. Después se realizó el procedimiento de aislamiento de ADN DNeasy del modo acostumbrado (Qiagen, DNeasy 69109). A continuación, una alícuota del ADN extraído se tiñó con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se leyó en el fluorímetro (BioTek) con patrones conocidos para obtener la concentración en ng/µl.

7.10.2 - Análisis con ensayo Invader. Las muestras de ADN se diluyeron hasta 20 ng/µl y se desnaturalizaron incubándolas en un termociclador a 95° C durante 10 minutos. A continuación se preparó la mezcla Signal Probe con la mezcla de oligonucleótidos facilitada y MgCl₂ (Third Wave Technologies). Alícuotas de 7,5 µl se colocaron en cada pocillo de la placa del ensayo Invader seguidas por alícuotas de 7,5 µl de los controles, patrones y muestras desconocidas diluidas a 20 ng/µl. A todos los pocillos se les añadió 15 µl de aceite mineral (Sigma) para cubrirlos. Las placas se incubaron entonces a 63° C durante 1 hora y se leyeron en el fluorímetro (Biotek). El % de señal respecto al fondo de la sonda diana se dividió por el % de señal respecto al fondo de la sonda de control interna para calcular el cociente. El cociente de los patrones (cuyo número de copias es conocido) desarrollados y validados con transferencia Southern, se usó para estimar el número de copias de los eventos desconocidos.

7.10.3 - Reacción en cadena de la polimerasa. Como molde se emplearon 100 ng de ADN total. Se usaron 20 mM de cada cebador con el kit Takara Ex Taq PCR Polymerase (Mirus TAKRR001A). Los cebadores utilizados para la PTU del AAD-1 (v3) fueron: (Directo-ATAATGCCAGC CTGTAAACGCC) (SEC ID nº 25) e (Inverso-CTCAAGCATATGAATGACCT CGA) (SEC ID nº 26). La reacción de PCR se realizó en un termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94° C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 63° C durante 30 segundos, y 72° C durante 1 minuto y 45 segundos seguidos por 72° C durante 10 minutos. Los cebadores utilizados para la PCR de la región codificante del AAD-1 (v3) fueron: (Directo-ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEC ID nº 27) e (Inverso-CGGGC AGGCCTAACTCCACCAA) (SEC ID nº 28). La reacción de PCR se llevó a cabo con un termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94° C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 65° C durante 30 segundos, y 72° C durante 1 minuto y 45 segundos seguidos por 72° C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se analizaron con una electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con EtBr.

7.10.4 - Análisis con transferencia Southern. El análisis con transferencia Southern se llevó a cabo con el ADN total obtenido con el kit DNeasy de Qiagen. Un total de 2 µg de ADN fueron sometidos a una digestión hasta el día siguiente con Afl II y también con EcoRV en el caso del pDAB3404, con NcoI en el del pDAB3403, y con SspI en el del pDAB1421 a fin de obtener los datos de integración. Acabada la digestión se inyectó una alícuota de ~100 ng en un gel al 1% para confirmar que la digestión había sido completa. Después de esta comprobación, las muestras se procesaron en un gel de agarosa grande al 0,85% hasta el día siguiente a 40 voltios. A continuación, el gel se desnaturalizó con NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos y se neutralizó con Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M y pH de 7,5 durante 30 minutos. Seguidamente se preparó un aparato de gel con SSC 20x para transferir por gravedad el gel a una membrana de nilón (Millipore INYC00010), dejándolo hasta el día siguiente. Acabada la transferencia, la membrana se expuso a luz UV en presencia de un entrelazador (stratagene UV stratalinker 1800) a 1200x100 microjulios. Después la membrana se lavó con SDS 0,1%, SSC 0,1 durante 45 minutos. Finalizado el lavado de 45 minutos, la membrana fue horneada durante 3 horas a 80° C y después se conservó a 4° C hasta la hibridación. El

molde de hibridación se preparó con la PCR de la región codificante antes señalada utilizando el plásmido pDAB3404. El producto se inyectó en un gel de agarosa al 1%, se recortó y después se extrajo el gel con el procedimiento de extracción de Qiagen (28706). La membrana se sometió entonces a una etapa de prehibridación a 60° C durante 1 hora en tampón Perfect Hyb (Sigma H7033). Con el procedimiento Prime it RmT dCTP-labeling rxn (Stratagene 300392) se procedió al revelado con una sonda de ³²P (Perkin Elmer). La sonda sobrante se lavó con columnas ProbeQuant G50 (Amersham 27-5335-01). Se usaron 2 millones de CPM para hibridar las membranas de transferencia hasta el día siguiente. Finalizada la hibridación, las membranas se sometieron a dos lavados de 20 minutos a 65° C con SDS 0,1%, SSC 0,1. Finalmente, las membranas se expusieron a película fotográfica dejándolas hasta el día siguiente, incubadas a -80° C.

10 **Ejemplo 8 - Datos de tolerancia *in vivo* y de tolerancia en el campo generados por eventos portadores del AAD-1 (v3) seleccionados con PAT (pDAB3404)**

8.1 - Tolerancia de plantas de maíz T₀ a herbicidas AOPP

Cuando se pudieron regenerar más de 15 plantas clonales por evento, se transfirieron plantas adicionales al invernadero para someterlas a una selección preliminar por tolerancia aplicando en postemergencia herbicidas AOPP a plantas de maíz T₀. Las plantas aclimatadas en el invernadero se dejaron crecer hasta que brotaron 2-4 hojas nuevas de aspecto normal del verticilio (es decir, plantas que habían superado con éxito la transición del cultivo *in vitro* a las condiciones del invernadero). Las plantas se cultivaron en el invernadero a 27° C con 16 horas de luz:8 horas de oscuridad. A continuación, las plantas se trataron con formulaciones comerciales de uno de los tres herbicidas AOPP siguientes: Assure® II (DuPont), Clincher* (Dow AgroSciences) o Gallant Super* (Dow AgroSciences) correspondientes respectivamente a quizalofop, cihalofop y haloxifop. Las aplicaciones de herbicida se efectuaron con un pulverizador de carril con un volumen de pulverización de 187 l/ha, altura de pulverización 50 cm, y todas las pulverizaciones incorporaron el aceite vegetal concentrado Agridex al 1% v/v. El número de clones de cada evento varió de una semana a otra debido al ritmo de regeneración y aclimatación de cada evento. En conjunto, se intentó tratar a clones representativos de cada evento con un intervalo de dosificación del herbicida comprendido entre 1× dosis letal (~1/8× dosis de campo) hasta 8× dosis de campo (64× dosis letal). La dosis letal se define como la dosis que causa daños >95% a la línea endogámica Hi-II. La Hi-II constituye la base genética de las transformantes de la presente invención.

Los AOPP son en general herbicidas muy potentes que matan el maíz. El maíz Hi-II nacido de semillas de tres o cuatro hojas es erradicado (daños >95%) con 8,8, 62,5, y 4,4 g e.a./ha de haloxifop, cihalofop y quizalofop, respectivamente. Todas las líneas transformadas con AAD-1 (v3) estudiadas sobrevivieron a una dosis mínimamente letal de todos los herbicidas AOPP analizados. De hecho, la mayoría de las líneas analizadas sobrevivieron sin daños visibles (14 DAT) aun después de recibir una 8× dosis de campo de quizalofop (64× dosis letal). Varios clones individuales de los eventos "017" y "038," empero, sufrieron daños significativos a dosis elevadas. Ello podría ser resultado de una menor expresión del gen debido al lugar o al modo de inserción del mismo.

En la mayoría de los eventos quedó demostrado un alto nivel de tolerancia a AOPP, incluso cuando las aplicaciones tuvieron lugar en plantas recién salidas del cultivo *in vitro* (estadio T₀). Resulta destacable que esta tolerancia se consumara frente a los tres herbicidas AOPP y que probablemente pueda hacerse extensiva a todos los herbicidas de esa clase, como se ha demostrado previamente con la AAD-1 *in vitro*.

40 La Figura 14 ofrece las respuestas de varios clones del evento transformados con AAD-1 (v3) y sin transformar a dosis letales de dos herbicidas AOPP (haloxifop y quizalofop) aplicados 1 semana antes.

La Tabla 23 contiene los datos de las respuestas de eventos seleccionados de maíz T₀ transformados con AAD-1 (v3) a tres herbicidas AOPP aplicados en postemergencia.

Tabla 23. Respuesta de eventos seleccionados de maíz T ₀ transformados con AAD-1 (v3) a tres herbicidas AOPP aplicados en postemergencia.						
Constructo	Evento	Cloneo	Haloxifop* g e.a./ha	Cyhalofop** g e.a./ha	Quizalofop*** e.a./ha	% daño a 14 DAT
3404	001	016	8.8			0
3404	001	018		62.5		0
3404	001	017			8.8	0
3404	001	019			8.8	30

ES 2 389 843 T3

3404	001	020			35	0
3404	017	018			35	0
3404	017	019			35	0
3404	017	020			70	0
3404	017	021			70	0
3404	017	022			140.	0
3404	017	023			140	30
3404	017	024			' 280	30
3404	017	025			280	20
3404	022	019	8.8			0
3404	022	020	17.5			0
3404	022	016	17.5			0
3404	022	024		62.5		0
3404	022	018		125		0
3404	022	021			8.8	0
3404	022	017			17.5	0
3404	022	022			35	0
3404	022	023			70	0
3404	033	012			35	0
3404	033	013			70	0
3404	033	014			70	0
3404	033	015			140	0
3404	033	016			280	0
3404	038	016	8.8			0
3404	038	018		62.5		0
3404	038	017			8.8	0
3404	038	019			35	70
3404	038	020			35	80
3404	038	021			70	80
3404	038	022			70	80 .

(dosis letal =
8.8 e e.a./ha)

(dosis letal =
62.5 e e.a./ha)

(dosis letal =
4.4 e e.a./ha)

*Gallant super[#] + COC 1% (v/v)

**Clincher[#] + COC 1% (v/v)

***Assure II + COC 1% (v/v)

#Marca registrada de Dow AgroSciences, LLC

8.2 - Tolerancia en campo de plantas de maíz T₁ portadoras del pDAB3404 a los herbicidas quizalofop, 2,4-D y glufosinato

Se llevaron a cabo dos ensayos de campo en estaciones agrícolas de Hawai e Indiana. Semillas de maíz de plantas T₁ endogámicas fueron utilizadas para evaluar la tolerancia de 16 líneas de evento AAD-1 frente a quizalofop y 2,4-D. Tres híbridos no transformados se incluyeron a efectos comparativos. El híbrido Hi-II × 5XH571 comparte el mismo linaje que las líneas del evento AAD-1 (v3). El híbrido Croplan 585SR es una línea resistente a setoxidim.

El diseño experimental consistió en un sistema de parcelas subdivididas con cuatro réplicas. La parcela principal fue el tratamiento herbicida y la subparcela el evento AAD-1 (v3) o el híbrido de comparación. Las parcelas consistían en una hilera de 3,7 metros con aproximadamente 25 semillas plantadas en cada hilera. Por lo que respecta a los eventos AAD-1, en cada replicado se sembraron semillas de un linaje diferente de cada evento.

Las parcelas de AAD-1 (v3) recibieron en el estadio V2 la aplicación de glufosinato a 560 g m.a./ha para eliminar las plantas no transformadas. Los tratamientos del experimento incluyeron formulaciones comerciales de quizalofop aplicadas a 70 y 140 g e.a./ha, 2,4-D (sal dimetilamina) a 560 y 1120 g e.a./ha, y un control no tratado. Los tratamientos se aplicaron con una mochila pulverizadora con lanza difusora que proporcionaba un volumen de pulverización de 187 l/ha a una presión de 130-200 kPa. Los tratamientos con quizalofop se aplicaron en el estadio V3-V4 y los tratamientos con 2,4-D en el estadio V5-V6.

Las parcelas tratadas con quizalofop se evaluaron visualmente para detectar los daños al cultivo al cabo de una y tres semanas de la aplicación (WAA) utilizando una escala de 0-100%, en la cual 0 significa sin daños y 100 muerte completa. Las parcelas tratadas con 2,4-D se evaluaron visualmente para detectar el encamado de las plantas 2 días después de la aplicación (DAA) utilizando una escala de 0-100% en la que 0 equivale a ninguna planta encamada y 100 equivale a todas las plantas encamadas. Asimismo, las parcelas tratadas con 2,4-D fueron analizadas visualmente 3-4 WAA para evaluar la deformación de las raíces fúlcreas con una escala de 0-10.

8.2.1 - Resultados

La respuesta del evento AAD-1 (v3) a las dosis más altas analizadas de quizalofop y 2,4-D se muestran en la Tabla 24. Dichas dosis representan aproximadamente el doble de las dosis comerciales normales. Los híbridos no transformados resultaron gravemente dañados (80-100%) por el quizalofop a 70 g e.a./ha, incluida la línea resistente a setoxidim, aunque esta manifestó una tolerancia ligeramente mejor que los otros dos híbridos. Todos los eventos AAD-1 (v3) excepto un linaje del evento 3404.001 manifestaron una tolerancia excelente al quizalofop a 70 g e.a./ha. No se observaron síntomas visibles en los eventos AAD-1 (v3) excepto en los casos mencionados anteriormente.

Tabla 24.												
Treatmento (dosis) =	Quizalofop (140 g e.a./ha)		2,4-D amina (1120 g e.a./ha)		2,4-D amina (1120 g e.a./ha)		Resultados del análisis			Cocientes de segregación de resistencia tras pulverización con Liberty		
Evaluación	% de daño 3 WAA (escala 0-100)		% de encamado (escala 0-100)		Deformación raíces fúlcreas 3-4 WAA (escala 0-10)		Número copias de AAD-1 en hoja (análisis southern)	Transf. Western de AAD-1 en hojas T ₀	ELISA de AAD-1 en hojas T ₀	Media de población T ₁		Media de población T ₂
Evento o Híbrido	IN	HI	IN	HI	IN	HI				IN	HI	HI
3404.001	25	25	0	5	1	2	3	+++	+++	40%	47%	X
3404.006	0	0	0	0	0	0	1	++	+++	33%	26%	X
3404.013	0	0	0	0	0	0	1	+	+++	63%	58%	X
3404.017	0	0	1	0	0	0	2	+/-	++	48%	47%	X

Tabla 24.												
Treatmento (dosis) =	Quizalofop (140 g e.a./ha)		2,4-D amina (1120 g e.a./ha)		2,4-D amina (1120 g e.a./ha)		Resultados del análisis			Cocientes de segregación de resistencia tras pulverización con Liberty		
Evaluación	% de daño 3 WAA (escala 0-100)		% de encama-do (escala 0-100)		Deformación raíces fúlcreas 3-4 WAA (escala 0-10)		Número copias de AAD-1 en hoja (análisis southern)	Transf. Western de AAD-1 en hojas T ₀	ELISA de AAD-1 en hojas T ₀	Media de población T ₁		Media de población T ₂
Evento o Híbrido	IN	HI	IN	HI	IN	HI				IN	HI	HI
3404.020	0	0	0	0	0	0	2	++	+++	50%	51%	X
3404.022	0	0	1	0	0	0	1	+	++	.51%	57%	76%*
3404.025	0	0	0	0	0	0	2	+++	++++	55%	59%	X
3404.027	0	0	3	0	0	0	5	+	++	51%	50%	X
3404.031	0	0	1	0	0	0	1	++	++++	47%	43%	61%*
3404.033	0	0	0	0	0	0	2 o 3	+	++	52%	49%	X
3404.036	0	0	0	0	0	0	4	++	+++	52%	48%	X
3404.044	0	0	1	0	0	1	1	+	+/-	50%	48%	X
3404.050	0	0	0	1	0	1	2	nd	nd	38%	28%	X
3404.053	0	0	1	0	0	0	2	+++	+++	48%	56%	X
3404.074	0	0	0	0	0	0	1	++	+++	53%	52%	73%*
3404.082	0	0	0	0	0	1	3	nd	nd	38%	36%	X
DK493	100	100	20	23	8	9						
HI-II X												
5XH571	100	100	13	34	7	9						
CROPLAN												
585SR	80	96	11	33	9	9						
*Concuerda con la segregación de un carácter regido por un solo locus dominante según el análisis de la ji al cuadrado (P > 0,05)												

El 2,4-D aplicado a la dosis de 1120 g e.a./ha provocó niveles significativos (11-33%) de epinastia en los híbridos no transformados, una respuesta normal cuando se aplican a partir del estadio de crecimiento V4. En todos los eventos de AAD-1 (v3) se observó una escasa o nula epinastia, excepto en un linaje de 3404.001 (estudiado sólo en Indiana) donde se produjeron niveles moderados (5-13%).

5

Las raíces fúlcreas de los híbridos no transformados quedaron gravemente deformadas (evaluadas con 9 en una escala de 0-10) por el 2,4-D a 1120 g e.a./ha. De nuevo, esta es una respuesta normal al 2,4-D cuando se aplica a partir del estadio de crecimiento V4. Al igual que con la respuesta de epinastia, se observaron pocos o nulos daños en las raíces fúlcreas en los eventos AAD-1 (v3), excepto en un linaje de 3404.001.

10 Tendencias similares se observaron con las dosis más bajas de quizalofop y 2,4-D, aunque en los híbridos no transformados se observaron niveles de respuesta reducidos pero todavía significativos (datos no representados).

Estos resultados indican que la mayoría de líneas de eventos transformados con *AAD-1 (v3)* manifestaron un alto nivel de resistencia al quizalofop y al 2,4-D a dosis que eran letales o que causaban graves malformaciones epinásticas a los híbridos de maíz no transformados. Véase también la figura 16.

8.2.2 - Proporciones de segregación mendeliana previstas en tres eventos T_2 . Plantas de linajes individuales de cada evento fueron autopolinizadas al azar en el campo. Las semillas T_2 se recolectarán a mano cuando alcanzaron la madurez fisiológica. Partiendo del número de copias del gen único (véase la Tabla 24 anterior) y del rendimiento global de la generación T_1 (segregación, tolerancia a herbicidas y vigor), se escogieron tres eventos (022, 031 y 074) para proseguir la evaluación en el campo. Las hileras de cada evento se plantaron con una sembradora de cono de precisión, a razón de 2500-3000 semillas por hilera. En el estadio de crecimiento V2, todas las líneas *AAD-1 (v3)* fueron pulverizadas con 140 g e.a./ha de quizalofop (Assure® II) utilizando una mochila pulverizadora como se ha descrito previamente. Esta dosis mató rápidamente todos los segregantes “nulos” (no transformados). Todos los eventos presentaron una proporción de segregación concordante con la herencia mendeliana de un locus único de herencia dominante (3 resistentes:1 sensible, o supervivencia del 75%) (véase la Tabla 24). Los homocigotos y los hemocigotos del evento 74 fueron identificados analizando la cigosidad (véase la descripción del ensayo Invader de *AAD-1 (v3)* en maíz). Las plantas hemocigotas se eliminaron y las plantas homocigotas *AAD-1 (v3)* se cruzaron con maíz BE1146 endogámico por introgresión y homocigoto para el carácter de resistencia al glifosato NK603, dando lugar a una semilla híbrida F_1 homogénea que es hemocigota para la resistencia al glifosato, el *AAD-1 (v3)* y la resistencia al glufosinato.

8.3 - Apilamiento del *AAD-1 (v3)* y de *PAT* con los genes de resistencia al glifosato en maíz

Plantas de maíz T_2 homocigotas para *AAD-1 (v3)/PAT* se cruzaron con plantas de maíz resistentes al glifosato para producir semillas F_1 portadoras de los genes *AAD-1 (v3)*, *PAT* y de resistencia al glifosato como se describe en el ejemplo anterior.

Las semillas F_1 se sembraron individualmente en macetas de 3 pulgadas rellenas con medio de crecimiento Metro-Mix® 360 (Sun Gro Horticulture). Las macetas se regaron inicialmente con solución de Hoagland por goteo subterráneo hasta empapar el sustrato, que después se dejó drenar por gravedad, cultivándose a 27° C en condiciones de 16 horas de luz:8 horas de oscuridad en el invernadero. Durante el resto del estudio las plantas se regaron con goteo subterráneo con agua desionizada.

Las plantas se dejaron crecer hasta que brotaron 2-4 hojas del verticilio. En este momento las aplicaciones de herbicida se efectuaron con un pulverizador de carril con un volumen de pulverización de 187 l/ha, a una altura de 50 cm. Las plantas se pulverizaron con dosis de 2,4-D DMA, glifosato, glufosinato, y con diversas combinaciones de los tres. Todas las aplicaciones se formularon en tampón Hepes de 200 mM (pH 7,5). En las pulverizaciones que incluían glufosinato el tratamiento se formuló añadiendo sulfato amónico al 2% p/v.

A los 3 y 14 días del tratamiento (DAT) se evaluaron las plantas. Se les asignó una puntuación de daños observando si presentaban enanismo, clorosis y necrosis. Las plantas calificadas con una puntuación de daños del 90% o superior se consideraron muertas. Los resultados del estudio a los 14 DAT se ofrecen en la Tabla 25.

Tabla 25.

	Dosis de campo	% daños en el 14 DAT	
		Hi II X 5XH751	RR/PAT/AAD1
		Med	Med
Control no tratado	-	0	0
840 g e.a./ha glifosato	1X	98	0
1680 g e.a./ha glifosato	2X	100	0
3360 g e.a./ha glifosato	4X	100	0
560 g e.a./ha 2,4-D DMA	1X	10	0
1120 g e.a./ha 2,4-D DMA	2X	14	0
2240 g e.a./ha 2,4-D DMA	4X	29	0
470 g e.a./ha glufosinato	1X	80	0

940 g e.a./ha glufosinato	2X	90	3
1880 g e.a./ha glufosinato	4X	96	15
840 g e.a./ha glifosato + 560 g e.a./ha 2,4-D DMA	1X + 1X	96	1
1680 g e.a./ha glifosato + 1120 g e.a./ha 2,4-D DMA	2X + 2X	100	2
3360 g e.a./ha glifosato + 2240 g e.a./ha 2,4-D DMA	4X + 4X	100	1
470 g e.a./ha glufosinato + 560 g e.a./ha 2,4-D DMA	1X + 1X	89	5
940 g e.a./ha glufosinato + 1120 g e.a./ha 2,4-D DMA	2X + 2X	91	10
1880 g e.a./ha glufosinato + 2240 g e.a./ha 2,4-D DMA	4X + 4X	97	13
840 g e.a./ha glifosato + 470 g e.a./ha glufosinato	1X + 1X	90	5
1680 g e.a./ha glifosato + 940 g e.a./ha glufosinato	2X + 2X	98	15
3360 g e.a./ha glifosato + 1880 g e.a./ha glufosinato	4X + 4X	100	15

Este estudio demostró que el gen *AAD-1* (v3) en maíz se puede apilar con un gen de resistencia al glifosato y otro gen de resistencia al glufosinato para proporcionar una fuerte tolerancia en el campo al 2,4-D, el glifosato y el glufosinato, solos o en combinaciones de tanque.

- 5 8.3.1 - Resistencia del maíz portador del *AAD-1* (v3) a las combinaciones de 2,4-D DMA y quizalofop. Semillas T₂BC₁ del evento hemicioto número 3404-025.001R/R001 Bulked.001.S058 se sembraron individualmente en macetas de 3 pulgadas preparadas con medio de crecimiento Metro-Mix[®] 360. Las macetas se regaron inicialmente con solución de Hoagland por goteo subterráneo hasta empapar el sustrato, y después se dejó drenar por gravedad, cultivándose a 27° C en condiciones de 16 horas de luz:8 horas de oscuridad en el invernadero. Durante el resto del estudio las plantas se regaron con goteo subterráneo con agua desionizada.

Las plantas se dejaron crecer hasta el estadio V1 en el invernadero. En ese momento las plantas se seleccionaron con 560 g e.a./ha de Assure[®] II al que se había añadido aceite vegetal concentrado Agridex al 1% en tampón Hepes 200 mM con un pulverizador de carril de laboratorio ajustado a 187 l/ha. Se dejaron pasar 4 días para que las plantas manifestaran los síntomas de la selección. Ninguna de las plantas sufrió daños. Las aplicaciones de herbicida se realizaron con un pulverizador de carril a un volumen de pulverización de 187 l/ha, a una altura de 18 pulgadas. Todas las aplicaciones se formularon con tampón Hepes 200 mM (pH 7,5) con la adición de Agridex al 1% v/v.

A los 3 y 14 días del tratamiento (DAT) se evaluaron las plantas asignándolas una puntuación de daños si presentaban enanismo, clorosis o necrosis. Las plantas calificadas con una puntuación de daños del 90% o superior se consideraron muertas. Las plantas de este linaje presentaron un 0% de daños a los 14 DAT con todas las combinaciones de mezcla en tanque, mientras que las plantas naturales sufrieron daños del 100%. Estos resultados indican que el *AAD-1* (v3) no sólo proporciona una sólida resistencia en el campo frente al 2,4-D y el quizalofop, sino también frente a dosis exageradas de múltiples combinaciones de las dos familias químicas. Resulta lógico pensar que se pueden implementar nuevas medidas de control de malas hierbas basadas en combinaciones de herbicidas auxínicos fenoxi y graminicidas de AOPP en el maíz (o en otros cultivos transformados con *AAD-1*) que hasta ahora no eran posibles con un solo gen HTC.

8.3.2 - Tolerancia de plantas de maíz T₀ (pDAB3403) al herbicida quizalofop. Un conjunto de aproximadamente ocho clones T₀ de 17 eventos distintos se regeneró y se transfirió al invernadero para someterlos a una selección preliminar por tolerancia con una dosis discriminadora de quizalofop aplicada en postemergencia. El tratamiento se aplicó con un pulverizador de carril a 35 g e.a./ha (1x dosis de campo, 4x dosis letal) a las plantas de maíz T₀ con 3 hojas adaptadas al invernadero, con las condiciones del pulverizador de carril antes descritas. Las plantas se calificaron como resistentes o sensibles 7 días después del tratamiento. En cada aplicación del herbicida se incluyó un maíz control no transgénico. Dos eventos, los eventos 014 y 047, presentaron dos o más clones T₀ sensibles a 35 g e.a./ha de quizalofop, lo cual indica un nivel inesperado de sensibilidad en tales eventos. Los 15 eventos restantes manifestaron una integración estable, así como una expresión estable de la proteína y la capacidad para tolerar una concentración 4x dosis letal de quizalofop en toda la planta.

8.3.3 Expresión del *AAD-1* (v3) en términos de tolerancia al quizalofop

Tres linajes T₂ distintos extraídos de 3404 transformaciones que habían sido preseleccionadas con Liberty[®] (como previamente se ha descrito) para eliminar los nódulos se escogieron para comparar su tolerancia al quizalofop

merced a la expresión del AAD-1 (v3). La expresión se midió a los 14 DAT (datos no mostrados) y a los 30 DAT (véase la figura 15). La línea con mayor tolerancia, el evento 3404-074, siempre expresó una cantidad más elevada de AAD-1 (v3) que los otros dos eventos a dosis de campo 1x y superiores. De estos datos se concluye que el maíz que expresa el AAD-1 (v3) puede quedar protegido de los daños causados por quizalofop en la dosis más elevada analizada (2240 g/ha), que es 16 veces la 1x dosis de campo de 35 g/ha. Asimismo, el nivel de expresión resultó uniforme a lo largo de todo el experimento.

Ejemplo 9 - Transformación de maíz con el AAD-1 (v3) mediante *Agrobacterium*

9.1 - Material vegetal

Semillas de un cruce F₁ de "High II" (esto es, Progenitor A y B) (Armstrong *et al.*, 1991) se plantaron directamente en macetas de 5 galones que contenían una mezcla de Metro-Mix[®] 360:suelo mineral 95:5. Las plantas se cultivaron en invernadero con un fotoperiodo de 16 horas complementado con una combinación de lámparas de haluro metálico y sodio de alta presión.

9.2 - Fuente de tejido

Para obtener embriones Hi-II (F₂) inmaduros, se llevaron a cabo polinizaciones controladas entre hermanas. El día de la polinización se embolsaron las panículas que desprendían polen recogiendo así el polen fresco que después se aplicó cuidadosamente a los estigmas. Los embriones inmaduros se aislaron tal y como se describe en el Ejemplo 7.2.

9.3 - Preparación de un vector superbinario

La construcción de un constructo de *Agrobacterium*, el pDAB2272, portador del gen AAD-1 (v3) y del gen marcador seleccionable AHAS se efectuó aislando el fragmento NotI de 3443 pares de bases del pDAB3404 portador de ZmUbi1 v2/AAD-1 (v3)/ZmPer5 v2 e insertándolo en el sitio NotI del pDAB8549. El plásmido resultante contiene las casetes ZmUbi1 v2/AAD-1 (v3)/ZmPer5 v2 y OsAct1 v2/AHAS v3/ZmLip v1 flanqueadas por regiones MAR no idénticas en la orientación directa. Este plásmido se transformó posteriormente en el LBA4404/pSB1 para crear un vector superbinario, que se denominó pDAB3602 y que también se designa como pDAS1421.

9.4 - Fuente de bacterias

Todas las transformaciones se llevaron a cabo con el vector "superbinario" de Japan Tobacco descrito en la Patente US nº 5.591.616 ("Method for Transforming Monocotyledons"). Para preparar la suspensión de *Agrobacterium* del tratamiento, 1-2 contenidos de asas con bacterias recombinantes pDAS1421, sembradas en estría en una placa con medio YP, se depositaron en 5 ml de medio LS-inf. Mod (Medio basal LS (Linsmaier y Skoog, 1965), vitaminas N6, 2,4-D 1,5 mg/l, sacarosa 68,5 g/l, glucosa 36,0 g/l, L-prolina 6 mM, pH 5,2). La mezcla se vorteo hasta conseguir una suspensión uniforme. La concentración bacteriana se determinó con un fotolorímetro Klett-Summerson midiendo la densidad de la solución. La solución se ajustó a una concentración de 200 unidades Klett ($\sim 1 \times 10^9$ ufc/ml) y se le añadió acetosiringona 100 µM.

9.5 - Infección y cocultivo

Los embriones inmaduros se aíslan directamente en un tubo de microcentrífuga que contiene 2 ml de medio líquido LS-inf. Mod. Cada tubo, que contiene ~ 100 embriones, se vortea durante 3-5 s. El medio se elimina y se sustituye con medio líquido fresco y se repite el vorteo. El medio líquido se descarta de nuevo y se sustituye por una solución de *Agrobacterium* a la concentración de 200 Klett. La mezcla de *Agrobacterium* y embriones se vortea durante 30 s. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, los embriones se transfirieron a medio LS-As Mod (medio basal LS, vitaminas N6, 2,4-D 1,5 mg/l, sacarosa 30,0 g/l, L-prolina 6 mM, AgNO₃ 0,85 mg/l, acetosiringona 100 µM, Gelrite 3,0 g/l, pH 5,8) durante 5 días de cocultivo a 25°C.

9.6 - Estudios de dosis-respuesta con embriones inmaduros

Los estudios de dosis-respuesta se iniciaron con embriones inmaduros tratados con la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 carente de un plásmido como se ha descrito antes. Una vez tratados, los embriones se cocultivaron durante 5 días a 25° C y a continuación se transfirieron a medios de selección que contenían diversos niveles de R-haloxifop o R-cihalofop. Los embriones también se transfirieron a medios que contenían bialafos 1 mg/l e imazetapir 100 nM como controles negativos. Los embriones se evaluaron calculando el % de formación de callos embriogénicos al cabo de 2 semanas y, de nuevo, a las 4 semanas. Los embriones se expusieron a niveles de R-haloxifop de hasta 30 nM, pero pese a ello se observó una reducción insuficiente de la formación de callos con los niveles más elevados, por lo que en los experimentos de transformación se optó por emplear concentraciones aún más elevadas (50-100 nM). Los datos del crecimiento de los embriones en el medio con cihalofop se muestran en la figura 17.

9.7 - Selección

Después del cocultivo, los embriones fueron sometidos a un proceso de selección en dos etapas con el cual se

obtuvieron los aislamientos transformados. Para la selección se empleó medio LSD Mod (medio basal LS, vitaminas N6, 2,4-D 1,5 mg/l, MES 0,5 g/l, sacarosa 30,0 g/l, L-prolina 6 mM, AgNO₃ 1,0 mg/l, cefotaxima 250 mg/l, Gelrite 2,5 g/l, pH 5,7) que se usó junto con uno o dos niveles de selección de haloxifop, cihalofop o imazetapir. Durante la fase de selección, los embriones se cultivaron a oscuras a 28° C. Los embriones fueron sometidos a una primer nivel de selección (R-haloxifop 50-100 nM o R-cihalofop 300 nM) durante 14 días, y después a otro nivel superior (ácido R-haloxifop 250-500 nM o cihalofop 1,5 µM) a razón de 5 embriones/placa. Una parte de los embriones también se expuso en dos pasos a imazetapir (100 y después 500 nM) mediante el preparado Pursuit® DG como control positivo. Pursuit® se utiliza como agente de selección químico cuando se emplea el gen *AHAS*, según la Patente US n° 5.731.180. El tejido se transfirió cada 15 días al mismo medio hasta obtener colonias embriogénicas. Estas colonias se mantuvieron sometidas a una elevada presión selectiva durante el resto del periodo de cultivo. Las colonias transgénicas recuperadas se hicieron recrecer transfiriéndolas a medio de selección fresco cada quince días para su regeneración y posterior análisis.

9.8 - Regeneración y producción de semillas

Para la regeneración, los cultivos se transfirieron a medio de "inducción" 28 y medio de "regeneración" 36 (citados previamente) que contenían R-haloxifop 100 nM o cihalofop 1,5 µM para diferenciar las plántulas. Una vez establecidas las plántulas, se trasladaron a tubos con SHGA para permitir el crecimiento y el desarrollo de los brotes y las raíces tal y como se ha descrito antes. A continuación se realizaron polinizaciones controladas para producir semillas del modo descrito anteriormente.

9.9 - Recuperación de eventos y detalles del análisis; Selección de plantas enteras de los linajes de maíz T₀ portadores de los genes *AAD-1 (v3)* y *AHAS* (pDAS1421).

Setenta y dos eventos transformados con *Agrobacterium* se seleccionaron con varios niveles de ácido R-haloxifop y ácido R-cihalofop *in vitro*. Veintidós muestras de callo se analizaron con transferencia Southern para confirmar la integración estable del *AAD-1 (v3)* en el genoma del modo previamente descrito. Diez eventos de copia única, indicados en la Tabla 26, se escogieron para la regeneración.

Tabla 26.					
Evento en maíz	Agente de selección <i>in vitro</i>	Nº de copias por Southern (callo)	Transferencia Western (AAD-1) Callo T ₀	Evaluación de linajes T ₀ resistentes a 35 g e.a./ha de quizalofop	
				Resistente	Sensible
	(nM)	AAD-1			
1421[21]-016	50 Haloxifop	1	+	8	0
1421[22]-020	100 Haloxifop	1	++	8	0
1421[22]-022	100 Haloxifop	1	+	8	0
1421[22]-023	100 Haloxifop	1	++	8	0
1421[3]-036	100 Haloxifop	1	++	8	0
1421 [41]-031	300 Cihalofop	1	++	9	0
1421[4]-032	300 Cihalofop	1	++	8	0
1421 [4J]-033	300 Cihalofop	1	++	12	0
1421 [4]-034	300 Cihalofop	1	++	8	0
1421 [41]-035	300 Cihalofop	1	++	6	0
Los eventos con más de 1 copia no se trasladaron al invernadero					

Un mínimo de seis linajes clónicos regenerados por evento se transplantaron al suelo en el invernadero y se seleccionaron con un pulverizador de carril del modo antes descrito aplicando 35 g e.a./ha de quizalofop cuando brotaron 2-4 hojas nuevas normales (véase el apartado 8.3.3). La presencia de la proteína AAD-1 en la transferencia Western concordó perfectamente con la resistencia al herbicida en la generación T₀, independientemente del herbicida AOPP empleado en la selección. El segundo gen de HTC (*AHAS*) no tuvo ninguna repercusión negativa

sobre la función del gen *AAD-1* (v3).

Ejemplo 10 - Purificación de la *AAD-1* (v1) para la creación de anticuerpos y la caracterización bioquímica

Todas las operaciones realizadas durante la purificación se llevaron a cabo a 4° C. Células de *E. coli* congeladas o frescas procedentes de un cultivo de aproximadamente 1 litro, cultivadas y estimuladas como en el Ejemplo 3, se resuspendieron en 200 ml de tampón de extracción que contenía Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM y 2 ml de Cocktail inhibidor de proteasas (Sigma), y se disgregaron con sonicación en hielo con un sonicador Branson. El extracto soluble se obtuvo por centrifugación en una centrífuga GSA (Sorvall) a 12.000 rpm (24.000 g) durante 20 minutos. A continuación, el sobrenadante se introdujo en una columna de intercambio iónico Mono Q (Pharmacia HR 10/10) equilibrada con Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, y la columna se lavó con el mismo tampón con 10 volúmenes de columna (80 ml). La proteína se eluyó con 80 ml de un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,25 M en el tampón de la columna, recogiendo fracciones de 2 ml. Las fracciones que contenían la *AAD-1* (v1) se agruparon y se concentraron con columnas para centrifuga dotadas con una membrana MWCO de 30 kDa (Millipore). A continuación, la muestra se separó con una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 (Pharmacia, XK 16/60) con tampón a base de Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M y DTT 1 mM, pH 8,0 y un caudal de 1 ml/min. Las fracciones purificadas se analizaron con SDS-PAGE y la concentración de proteínas se determinó con el ensayo de Bradford utilizando albúmina de suero bovino como patrón.

Ejemplo 11 - Purificación de la *AAD-1* recombinante y producción de anticuerpos

El plásmido pDAB3203 portador del gen *AAD-1* (v1) se mantuvo congelado a -80° C en células TOP10F' (Invitrogen) como cepa Dow Recombinant DR1878. Para la expresión, el ADN plasmídico purificado del cultivo de células TOP10F' con el kit Wizard de Promega (Fisher, nº catálogo PR-A1460) se transformó en células BL-21 Star (DE3) (Invitrogen, nº catálogo C6010-03) siguiendo el protocolo del fabricante. Después de la transformación, 50 µl de las células se sembraron en placas de agar LB S/S y se incubaron hasta el día siguiente a 37° C. Todas las colonias de la placa de agar se recogieron y se introdujeron en un matraz de 500 ml dotado de tres placas deflectoras con 100 ml de LB y se incubaron a 37° C con una velocidad de agitación de 200 rpm durante 1 h. Acto seguido, se indujo la expresión del gen con IPTG 1 mM, y se incubaron durante 4 h a 30° C con 200 rpm de agitación. Los 100 ml de cultivo se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 200 ml de medio para extracción que contenía Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM y 2 ml de Cocktail inhibidor de proteasas (Sigma), y se disgregaron con sonicación en hielo con un sonicador Branson. El lisado se centrifugó a 24.000x g durante 20 min para eliminar los restos celulares. Por último, el sobrenadante que contenía la proteína *AAD-1* se sometió a un protocolo de purificación.

Las purificaciones de la *AAD-1* (v1) se llevaron a cabo a 4° C, tal y como se expone en el Ejemplo 10, a menos que se indique lo contrario. El lisado celular se depositó en una columna de intercambio iónico Mono Q (Pharmacia, nº catálogo HR 10/10) equilibrada con Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM, seguida de un lavado con 80 ml del mismo tampón. Las proteínas se eluyeron con 80 ml de un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,25 M en tampón de columna, recogiendo fracciones de 2 ml. Las fracciones que contenían la *AAD-1* se agruparon y concentraron con columnas para centrifugación dotadas de una membrana MWCO de 30 kDa (Millipore). A continuación, la muestra se separó con una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 (Pharmacia, XK 16/60) con tampón a base de Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 0,15 M y DTT 1 mM. La concentración de proteínas se determinó con el ensayo de Bradford utilizando la albúmina de suero bovino como patrón.

Cinco miligramos de *AAD-1* (v1) purificada se remitieron a Zymed Laboratories, Inc. (South San Francisco, California, EE.UU.) para iniciar la producción de anticuerpos policlonales de conejo. El conejo recibió 5 inyecciones en el lapso de 5 semanas; cada inyección contenía 0,5 mg de la proteína purificada suspendidos en 1 ml de adyuvante incompleto de Freund. Los sueros se analizaron con ELISA y transferencia Western para confirmar la especificidad y la afinidad antes de proceder a la purificación por afinidad y la conjugación con peroxidasa de rábano (HRP) (Zymed Lab Inc).

11.1 - Extracción de la *AAD-1* (v3) de las hojas de las plantas

Se cortaron aproximadamente entre 50 y 100 mg de tejido foliar en pequeños trozos y se depositaron en tubos de microcentrifuga que contenían 2 perlas de acero inoxidable (4,5 mm; Daisy Co., nº catálogo 145462-000) y 300 µl de tampón de extracción para plantas (PBS con Tritón X-100 0,1% y DTT 10 mM). Los tubos se agitaron durante 4 min en un homogeneizador de tipo *Bead beater* a velocidad máxima y después se centrifugaron durante 10 min a 5.000xg. El sobrenadante que contenía las proteínas solubles de la planta se analizó para determinar la proteína soluble total (TSP) y las concentraciones de *AAD-1* (v3).

11.2 - Ensayo de Bradford

La concentración de proteína soluble total extraída del tejido foliar se determinó con el ensayo de Bradford utilizando la albúmina de suero bovino (BSA) como patrón. Cinco microlitros de BSA diluida en serie en PBS o del extracto vegetal se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos con las muestras por triplicado. Las concentraciones de patrón oscilaron entre 2000 y 15,6 µg/ml. El concentrado de proteína a analizar se diluyó en primer lugar 5x en PBS, solución de la que se añadieron 250 µl a cada pocillo, incubándose a temperatura ambiente

durante 5 min. La densidad óptica (D.O.) se midió a 595 nm con un lector de microplacas. La concentración de proteína de cada muestra se extrapoló a partir de la curva patrón con el programa Softmax[®] Pro (versión 4.0) (Molecular Devices).

11.3 - Enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA).

- 5 El ensayo se realizó a temperatura ambiente si no se indica lo contrario. Se tapizó una placa de microtitulación de 96 pocillos con cien microlitros de anticuerpo anti-AAD-1 purificado (0,5 µg/ml) que permaneció en incubación a 4° C durante 16 horas. La placa se lavó cuatro veces con tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato 100 mM (PBS; pH 7,4) que contenía Tween 20 al 0,05%) utilizando un lavador de placas, y después se bloqueó con leche descremada al 4% disuelta en PBS durante 1 hora. Finalizado el lavado, se incubaron en los pocillos 100 µl de
- 10 AAD-1 patrón a concentraciones conocidas o de extracto vegetal (véase el apartado anterior). La curva patrón se trazó con concentraciones de AAD-1 purificada comprendidas entre 100 y 1,6 ng/ml por triplicado. Los extractos vegetales se diluyeron 5, 10, 20 y 40x en PBS y se analizaron por duplicado. Al cabo de una hora de incubación la placa se lavó del mismo modo indicado arriba. Cien microlitros de conjugado de anticuerpo anti-AAD-1 con HRP (0,25 µg/ml) se incubaron en cada pocillo durante 1 hora antes de eliminarlos por lavado. Cien microlitros de sustrato de HRP, 1-Step[™] Ultra TMB-ELISA (Pierce), se incubaron en cada pocillo durante 10 minutos y después la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 0,4 N. A continuación se midió la D.O. de cada pocillo con un lector de microplaca a 450 nm. Para determinar las concentraciones de AAD-1 en el extracto vegetal, se promedió el valor de la D.O. de las muestras duplicadas y la concentración se extrapoló a partir de la curva patrón con el programa Softmax[®] Pro versión 4.0 (Molecular Devices).
- 20 Para la comparación, cada muestra se normalizó con su concentración TSP y se calculó el porcentaje de expresión respecto a la TSP.

11.4 - Análisis por transferencia Western

- Los extractos vegetales y los patrones de AAD-1 (5 y 0,5 µg/ml) se incubaron con tampón para muestra de Laemmli a 95° C durante 10 minutos y se separaron por electroforesis en un gel prefabricado de Tris-Glicina al 8-16%. A continuación, las proteínas se trasladaron por electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa con un protocolo ordinario. Tras bloquear la membrana con leche descremada al 4% disuelta en PBS, se procedió a detectar la proteína AAD-1 con un antisuero anti-AAD-1 seguido por conjugados anti-conejo de cabra/HRP. La proteína detectada se visualizó utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL Western Analysis Reagent (Amersham, nº catálogo RPN 21058).

30 Ejemplo 12 - Transformación de tabaco

- La transformación de plantas de tabaco con *Agrobacterium tumefaciens* se llevó a cabo siguiendo un método similar, aunque no idéntico, a métodos publicados (Horsch *et al.*, 1988). El tejido para la transformación se obtuvo con el proceso siguiente: semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Kentucky 160) con la superficie esterilizada se sembraron sobre medio TOB, un medio sin hormonas de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) solidificado con agar. Las plantas se cultivaron durante 6-8 semanas en una sala de incubación iluminada a 28-30° C y las hojas para el protocolo de transformación se recogieron en condiciones estériles. Se cortaron trozos de hoja de aproximadamente un centímetro cuadrado en condiciones estériles, descartando el nervio principal. Cultivos de una cepa de *Agrobacterium* (EHA101S, portadora del pDAB721, AAD-1 (v3) + PAT), se hicieron crecer durante un día en un matraz en agitación a 250 rpm y a 28° C; después se extrajo el sedimento por centrifugación y se resuspendió en sales de Murashige y Skoog estériles, ajustándose hasta obtener una densidad óptica final de 0,5 a 600 nm. Los trozos de hoja se sumergieron en esta suspensión bacteriana durante aproximadamente 30 segundos, después se secaron con toallitas de papel estériles y se depositaron cara arriba sobre medio TOB+ (medio de Murashige y Skoog con ácido indolacético 1 mg/l y benciladenina 2,5 mg/l) y se incubaron a oscuras a 28° C. Dos días después los trozos de hoja se trasladaron a medio TOB+ con cefotaxima 250 mg/l (Agri-Bio, North Miami, Florida, EE.UU.) y glufosinato amónico 5 mg/l (materia activa de Basta, Bayer Crop Sciences) y se incubaron a 28-30° C con luz. El medio TOB+ con cefotaxima y Basta se renovó dos veces a la semana durante las dos primeras semanas y una vez a la semana a partir de entonces. Entre 4 y 6 semanas después los trozos fueron tratados con las bacterias, y las plantas pequeñas que brotaban de los focos transformados se sacaron de la preparación y se plantaron en cajas Phytatray[™] II (Sigma) llenas de medio TOB que contenía cefotaxima 250 mg/l y Basta 10 mg/l. Estas plántulas se cultivaron en una sala de incubación iluminada. Tres semanas después, se cortaron pedazos de tallo que se replantaron en el mismo medio. Las plantas estuvieron listas para el traslado al invernadero al cabo de 2 ó 3 semanas más.

- Una vez en el invernadero, el agar de las raíces se eliminó lavándolas y se trasplantaron en tierra en macetas cuadradas de 13,75 cm. Las macetas se colocaron en una bolsa Ziploc[®] (SC Johnson & Son, Inc.), por cuyo fondo circulaba agua corriente, permaneciendo bajo luz indirecta a 30° C durante una semana. Al cabo de 3-7 días, se abrió la bolsa, las plantas se fertilizaron y se dejaron crecer en la bolsa abierta hasta que se aclimataron al invernadero, momento en el que se retiró la bolsa. Las plantas se cultivaron en condiciones cálidas ordinarias (30° C, 16 horas de día, 8 horas de oscuridad, mínimo de luz natural + complementaria = 500 µE/m²s⁻¹).

Antes de la propagación, las plantas T_0 se muestrearon para analizar su ADN y determinar el número de copias insertadas. Por conveniencia se analizó el gen *PAT*, que estaba ligado molecularmente al *AAD-1* (*v3*). El tejido fresco se colocó en tubos y se liofilizó a 4° C durante 2 días. Una vez completamente seco el tejido, se colocó en el tubo una perla de tungsteno (Valenite) y las muestras se sometieron durante 1 minuto a molturación en seco con un molino de perlas Kelco. Después se procedió a aislar el ADN con DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). Una alícuota del ADN extraído se tiñó con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se leyó en un fluorímetro (BioTek) con patrones conocidos para obtener la concentración en ng/μl.

Las muestras de ADN se diluyeron a 9 ng/μl, y después se desnaturalizaron incubándolas en un termociclador a 95° C durante 10 minutos. A continuación se preparó la mezcla Signal Probe utilizando la mezcla de oligonucleótidos proporcionada y $MgCl_2$ (Third Wave Technologies). En los pocillos de una placa para ensayo Invader se depositaron alícuotas de 7,5 μl y después alícuotas de 7,5 μl de los controles, patrones y de las muestras desconocidas diluidas a 20 ng/μl. Todos los pocillos se cubrieron con 15 μl de aceite mineral (Sigma). A continuación, las placas se incubaron a 63° C durante 1,5 horas y se leyeron en un fluorímetro (Biotek). El % de señal respecto al fondo de la sonda diana se dividió por el % de señal respecto al fondo de la sonda de control interna para calcular el cociente. El cociente de los patrones (cuyo número de copias es conocido) desarrollados y validados con transferencia Southern, se usó para estimar el número de copias de los eventos desconocidos (Tabla 27).

Tabla 27. Eventos T_0 en plantas de tabaco transformadas con pDAB721 (*AAD-1*(*v3*) + *PAT*).

Evento	Nº copias PAT (Southern)	Región codificante PCR de <i>AAD-1</i>	ELISA frig <i>AAD-1</i> /ml extracto vegetal)	Tolerancia relativa de T_0 a pulverización con 2,4-D*
721(1)1	1	+	0.9	Media
721(2)1	nd	nd	0.6	Media
721(2)2	5	+	0.3	Baja
721(2)3	3	+	2.6	Media
721(2)5	5	+	4.1	Variable
721(2)6	3	+	0.5	Variable
721(2)8	5	+	0.3	Alta
721(2)11	3	+	n/a	Alta
721(2)12	3	+	4.1	Media
721(2)13	2	+	0.5	Media
721(2)14	5	+	0.2	Alta
721(2)16	4	+	.3.2	Media
721(2)17	3	+	nd	Alta
721(2)18	5	+	nd	Alta
721(2)19	>10	+	nd	Baja
721(2)20	5	+	nd	Media
721(2)21	4	+	nd	Alta
721(2)22	7	+	nd	Media
721(2)23	>10	+	nd	Variable
721(3)003	3	+	nd	Variable
721(3)008	2	+	nd	Alta

Tabla 27. Eventos T₀ en plantas de tabaco transformadas con pDAB721 (AAD-1(v3) + PAT).

Evento	Nº copias PAT (Southern)	Región codificante PCR de AAD-1	ELISA frig AAD-1 /ml extracto vegetal)	Tolerancia relativa de T ₀ a pulverización con 2,4-D*
721(3)012	1	+	nd	Alta
721(3)4	2	+	0.5	Alta
721(3)5	9	+	3.3	Alta
721(3)6	4	+	7.1	Variable
721(3)9	2	+	1	Baja
721(3)10	3	+	0.6	Alta
721(3)11	7	+	6	Baja
721(3)13	4	+	0.1	Alta
721(3)014	2	+	0.1	Media
nd = no realizado				
Leyenda: Tolerancia relativa* Daño a 3200 g e.a./ha de 2,4-D (14 DAT)				
Baja Daño >50%				
Media Daño 20-50%				
Alta Daño <20%				
Variable Contradictorio				

Las estimaciones del número de copias fueron confirmadas analizando varios eventos con transferencia Southern. El análisis por transferencia Southern se efectuó con el ADN total obtenido con el kit DNeasy de Qiagen. Un total de 2 µg de ADN se sometieron a una digestión hasta el día siguiente con NsiI y con HindIII para el pDAB721 a fin de obtener los datos de integración. Después de la digestión se procesó una alícuota de ~100 ng en un gel al 1% para comprobar que la digestión era completa. Después de esta comprobación, las muestras se procesaron con el mismo protocolo indicado en el Ejemplo 6, apartado 11.

Todos los eventos se analizaron asimismo con PCR para determinar la presencia del gen AAD-1 (v3) utilizando las mismas muestras de ADN extraído. Como molde se utilizó un total de 100 ng de ADN total. Se usaron 20 mM de cada cebador con el kit Takara Ex Taq PCR Polymerase kit (Mirus TAKRR001A). Los cebadores utilizados para la PCR de la región codificante del AAD-1 fueron: (RdpAcodF ATGGCTCA TGCTGCCCTCAGCC) (SEC ID nº 27) y (RdpAcodR CGGGCAGGCCTAACTCCACC AA) (SEC ID nº 28). La reacción de PCR se llevó a cabo con un termociclador 9700 Geneamp (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 seguidos por 72° C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se analizaron con electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con EtBr. Entre 4 y 12 linajes clonales de cada uno de los 30 eventos positivos en la PCR se generaron y se trasladaron al invernadero.

Plantas representativas de 19 eventos (a razón de una planta por evento) se analizaron para determinar la expresión de la AAD-1 (v3) con los métodos ELISA descritos previamente. Todos los eventos analizados manifestaron niveles detectables de la AAD-1 (v3) (Tabla 27). La expresión de la proteína resultó variable en los diferentes eventos.

Plantas T₀ de los 30 eventos fueron expuestas a un amplio intervalo de dosis de 2,4-D aplicadas cuando tenían 3-4 pulgadas de altura. Las pulverizaciones se hicieron del modo antes descrito con un pulverizador de carril a un volumen de pulverización de 187 l/ha. A clones representativos de cada evento se les aplicó la sal dimetilamina de 2,4-D (Riverside Corp) a 0, 50, 200, 800 ó 3200 g e.a./ha mezclada con agua desionizada. Cada tratamiento se repitió 1-3 veces. Las evaluaciones de los daños se efectuaron a los 3 y 14 DAT. Todos los eventos analizados resultaron más tolerantes al 2,4-D que la línea de control sin transformar KY160. En varios eventos se produjo cierta epinastia inicial provocada por el herbicida auxínico con la dosis de 800 g e.a./ha y con dosis inferiores a esta. Algunos eventos no sufrieron daños con esta dosis (equivalente a 1,5x la dosis de campo). Todos los eventos manifestaron a los 3 DAT algún grado de daño auxínico temporal tras ser tratados con 3200 g e.a./ha. Con esta

elevada dosis también se observaron algunas quemaduras foliares debido a la acidez de la solución pulverizada. En los ensayos sucesivos las soluciones que contenían dosis elevadas de 2,4-D se tamponaron. La respuesta de las plantas T₀ tratadas con 3200 g e.a./ha de 2,4-D (~6x la dosis de campo) se empleó para clasificar la tolerancia relativa de cada evento como “baja” (daño >50% a los 14 DAT), “media” (daño 20-50%), “alta” (daño <20%). Algunos eventos manifestaron una respuesta desigual en las réplicas del tratamiento y se consideraron “variables” (Tabla 27).

Verificación de la alta tolerancia al 2,4-D

De cada uno de los eventos que sobrevivieron a las dosis elevadas de 2,4-D se reservaron entre dos y cuatro individuos T₀ que se dejaron autofecundar en el invernadero para engendrar las semillas T₁. De la generación T₀ se escogieron dos líneas de tabaco portadoras del AAD-1 (v3) (eventos 721(2)-013.010 y 721(3)-008.005). Las semillas T₁ se estratificaron y se sembraron en bandejas de selección muy similares a las de *Arabidopsis* (Ejemplo 6.4); después se eliminaron selectivamente los nulos no transformados de esta población segregante con 280 g m.a./ha de glufosinato (selección por PAT). Las supervivientes se trasplantaron a macetas individuales de 3 pulgadas en el invernadero. Estas líneas habían manifestado niveles medios y altos de resistencia al 2,4-D en la generación T₀. En las plantas T₁ que no proceden directamente del tejido cultivado cabe esperar una respuesta más coherente. Estas plantas se compararon con tabaco KY 160 natural. Todas las plantas fueron tratadas con un pulverizador de carril a 187 l/ha, con el que recibieron un intervalo de 70-4480 g e.a./ha de 2,4-D sal dimetilamina (DMA), R-diclorprop, y una mezcla 50/50 de ambos herbicidas. Todas las aplicaciones se formularon con tampón Hepes 200 mM (pH 7,5). Cada tratamiento se repitió 4 veces. Las plantas se evaluaron 3 y 14 días después del tratamiento, asignándolas una puntuación de daños si presentaban enanismo, clorosis o necrosis. La generación T₁ está segregando, de modo que cabe esperar una respuesta variable debido a la diferencia en cigosidad (Tabla 28). No se observaron daños con las dosis inferiores a 1x la dosis de campo (560 g e.a./ha) de 2,4-D y de R-diclorprop en ningún evento. Los daños observados con dosis de hasta 8x la dosis de campo (4480 g de e.a./ha) resultaron ínfimos, en forma de enanismo, sin que hubiera daños por el herbicida auxínico. Estos resultados indican que el AAD-1 (v3) puede conferir un grado de tolerancia comercial, incluso a una dicotiledónea tan sensible a las auxinas como el tabaco. Estos resultados también demuestran que es posible conferir resistencia contra los herbicidas auxínicos fenoxi quirales (ácido 2,4-diclorofenoxipropiónico) y aquirales (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), tanto solos como combinados en mezcla de tanque.

Tabla 28. Respuesta de plantas de tabaco T1 segregantes para AAD-1 a herbicidas auxínicos fenoxi.

	KY160 - natural	721(2)013.010 (tolerancia media en la generación T ₀)	721(3)008.005 (tolerancia alta en la generación T ₀)
Herbicidea	Daño % medio de las réplicas a los 14 DAT		
560 g e.a./ha 2,4-D DMA	75	5	0
1120 g e.a./ha 2,4-D DMA	80	5	2
2240 g e.a./ha 2,4-D DMA	90	5	0
4480 g e.a./ha 2,4-D DMA	95	5	5
560 g e.a./ha R-diclorprop	70	5	0
1120 g e.a./ha R-diclorprop	75	5	0
2240 g e.a./ha R-diclorprop	88	5	0
4480 g e.a./ha R-diclorprop	95	10	5
560 g e.a./ha 2,4-D DMA/R-diclorprop	80	5	5
1120 g e.a./ha 2,4-D DMA/R-diclorprop	80	10	10
2240 g e.a./ha 2,4-D DMA/R-diclorprop	95	15	15
4480 g e.a./ha 2,4-D DMA/R-diclorprop	95	15	15

También se llevó a cabo una prueba con 100 plantas de la progenie de cada una de las dos líneas AAD-1 (v3)

(eventos 721(2)-013.010 y 721(3)-008.005). Las semillas se estratificaron, sembraron y trasplantaron con el mismo procedimiento indicado, con la salvedad de que las plantas nulas no fueron eliminadas por selección con Liberty. Todas fueron pulverizadas con 560 g e.a./ha de 2,4-D DMA del modo antes descrito. Al cabo de 14 DAT, se contabilizaron las plantas resistentes y sensibles. Ambos eventos, '013' y '008', segregaron como un carácter mendeliano dominante (3R:1S) según determinó el análisis de la ji al cuadrado. La AAD-1 se hereda como un gen de resistencia a herbicidas auxínicos fenoxi en muchas especies.

La tolerancia en el campo quedó demostrada plantando semillas T₁ o T₂ en el invernadero, eliminando selectivamente las plantas nulas con Liberty del modo descrito, y cultivando las plántulas en bandejas de trasplante de 72 alvéolos (Hummert International) con medio Metro 360 en las condiciones de cultivo indicadas arriba. Las plantas se trasplantaron en parcelas en el campo con una plantadora industrial de hortalizas. Para mantener el crecimiento vigoroso de las plantas se utilizó riego por goteo o aspersión. Una vez alcanzaron 6-12 pulgadas de altura, las plantas de tabaco se pulverizaron con una amplia gama de herbicidas auxínicos fenoxi y se evaluaron como se muestra arriba. Los factores de estrés ambiental son más acusados en las condiciones de campo, pero a tenor de la experiencia con el maíz transformado con AAD-1 (v3), cabe esperar una sólida transferencia de la resistencia del invernadero al campo.

Ejemplo 13 - Transformación de soja

Las técnicas de transferencia génica han sido utilizadas con éxito para mejorar la soja mediante la introducción de caracteres como la tolerancia a herbicidas (Padgett *et al.*, 1995), la modificación de aminoácidos (Falco *et al.*, 1995) y la resistencia a insectos (Parrott *et al.*, 1994). La introducción de caracteres foráneos en especies cultivadas requiere métodos que permitan la producción rutinaria de líneas transgénicas con secuencias marcadoras seleccionables, que contienen insertos sencillos. Los transgenes deberían heredarse en forma de un solo locus funcional para simplificar la mejora genética. Se ha descrito la inserción de genes foráneos en soja cultivada mediante el bombardeo con microproyectiles de ejes embrionarios cigóticos (McCabe *et al.*, 1988) o cultivos embriogénicos somáticos (Finer y McMullen, 1991), y la transformación con *Agrobacterium* de explantes de cotiledón (Hinchee *et al.*, 1988) o embriones cigóticos (Chee *et al.*, 1989).

Las plantas transformadas con *Agrobacterium* suelen contener insertos sencillos con un bajo número de copias (Birch, 1991). Los tres tejidos diana investigados para la transferencia de genes en la soja poseen ventajas y desventajas: ejes embrionarios cigóticos (Chee *et al.*, 1989; McCabe *et al.*, 1988), cotiledón (Hinchee *et al.*, 1988) y cultivos embriogénicos somáticos (Finer y McMullen, 1991). Este último ha sido objeto de extensas investigaciones como tejido diana para la transferencia directa de genes. Los cultivos embriogénicos suelen ser bastante prolíficos y son viables durante mucho tiempo. No obstante, se ha vinculado la esterilidad y las aberraciones cromosómicas sufridas por transformantes primarias a la edad de las suspensiones embriogénicas (Singh *et al.*, 1998) y, por tanto, la iniciación continua de nuevos cultivos parece ser necesaria para que los sistemas de transformación de la soja puedan emplear este tejido. Este sistema requiere un elevado nivel de 2,4-D, una concentración de 40 mg/l, para iniciar el callo embriogénico y ello plantea un problema fundamental para el uso del gen AAD-1 (v3), ya que el locus transformado podría no desarrollarse con 2,4-D en el medio. Así pues, la transformación del meristemo parece ser el método ideal para el desarrollo de plantas resistentes al 2,4-D con el AAD-1 (v3).

13.1 - Método de transformación 1: transformación del nudo cotiledonar de la soja con *Agrobacterium tumefaciens*

Las primeras descripciones de transformación de la soja refirieron el uso como diana de células meristemáticas de la región del nudo cotiledonar (Hinchee *et al.*, 1988) y la multiplicación de brotes a partir de los meristemos apicales (McCabe *et al.*, 1988). En el método del nudo cotiledonar con *A. tumefaciens*, la preparación del explante y la composición de los medios de cultivo estimulan la proliferación de meristemos auxiliares en el nudo (Hinchee *et al.*, 1988). Todavía no se sabe con certeza si tales tratamientos desencadenan la formación de un callo realmente desdiferenciado, pero totipotente. La recuperación de múltiples clones de un evento de transformación originado a partir de un solo explante y la infrecuente recuperación de plantas quiméricas (Clemente *et al.*, 2000; Olhoft *et al.*, 2003) apuntan a su origen en una sola célula, célula transgénica que se multiplica hasta engendrar bien un cultivo meristemático transgénico que prolifera, bien un brote uniformemente transformado que se multiplica en nuevos brotes. El método para la multiplicación de brotes de soja, basado originalmente en el bombardeo con microproyectiles (McCabe *et al.*, 1988) y, en fecha más reciente, adaptado a la transformación con *Agrobacterium* (Martinell *et al.*, 2002), no sufre aparentemente el mismo grado o tipo de desdiferenciación que el método del nudo cotiledonar, porque el sistema está basado en la identificación de quimeras en la línea germinal. El intervalo de genotipos que se están logrando transformar con el método del nudo cotiledonar con *Agrobacterium* crece sin cesar (Olhoft y Somers, 2001). Este método basado en la formación de meristemo *de novo* y la multiplicación de brotes está menos limitado a genotipos específicos. Además, se trata de un protocolo que no está basado en el 2,4-D, lo que resulta ideal para un sistema de selección con este herbicida. Por consiguiente, el método del nudo cotiledonar podría ser el método de elección para el desarrollo de cultivares de soja resistentes al 2,4-D. Aunque la descripción de este método se remonta a 1988 (Hinchee *et al.*, 1988), sólo en fecha muy reciente se ha podido refinar para conseguir de forma rutinaria la transformación con alta frecuencia de varios genotipos de soja (Zhang *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2004).

13.1.1 - Preparación de *Agrobacterium*. El plásmido, pDAB721, contiene el gen AAD-1 (v3) bajo el control del

promotor Ubi10 de *Arabidopsis*. Este plásmido también contiene el gen *PAT*, controlado con el promotor de la actina del arroz, el cual codifica una enzima que degrada el glufosinato y que puede ser utilizado como agente de selección para las transformantes. Este vector puede ser utilizado en el experimento de transformación descrito a continuación. El constructo pDAB721 se introdujo en la cepa de *Agrobacterium* EHA101S mediante electroporación.

- 5 Los cultivos de *Agrobacterium* portadores del pDAB721 destinados a las transformaciones se pueden cultivar en medio YEP (peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l, pH 7,0). Los cultivos de *Agrobacterium* se precipitan a baja velocidad y se resuspenden en medio líquido SCM (véase abajo) hasta obtener una D.O.660 de 0,6 antes de proceder a la inoculación.

- 10 13.1.2 - Transformación de la planta. Semillas de "Thorne," "Williams82" y "NE3001", genotipos públicos de soja, se pueden desinfectar con un lavado de 20 minutos en lejía comercial (NaClO) al 20% (v/v) a la que se añaden 2 gotas de Liqui-Nox®. Las semillas deben enjuagarse cinco veces con agua estéril y sembrarse en medio sin hormonas SHGA, dejándolas germinar durante 5 días a 24° C con un fotoperiodo de 18/6 horas de luz/oscuridad. El medio B5 contiene macro y micronutrientes y vitaminas y está descrito por Gamborg *et al.* (1968) (Sigma, nº catálogo G 5893, St. Louis). Todos los medios se solidifican con agar lavado al 0,8% (p/v) (Sigma, nº catálogo A 8678). Como
15 alternativa, ciertos genotipos de soja pueden ser sometidos a un procedimiento de esterilización superficial en seco con gas cloro (Cl₂) en que las semillas maduras se depositan en placas de Petri de 100 x 25 mm formando una monocapa, a razón de unas 130 semillas por placa. Se colocan 3 ó 4 placas en un desecador con una campana extractora de gases, de tal forma que las placas queden medio abiertas y que haya espacio suficiente para colocar un vaso de precipitados de 250 ml en medio del desecador. El vaso de precipitados se llena con 95 ml de lejía comercial, a los que se añaden gota a gota 5 ml de HCl concentrado (12N) dejándolos resbalar por el costado del
20 vaso. El desecador se cierra inmediatamente y se deja durante por lo menos 16 horas en la campana extractora. Acabada la esterilización, las placas se cierran y se depositan en una cabina de flujo laminar donde se dejan abiertas durante unos 30 minutos para eliminar el gas Cl₂ sobrante. A continuación las semillas se hacen germinar del modo descrito anteriormente. Las semillas esterilizadas en seco permanecen estériles a temperatura ambiente durante unas 2 semanas. Los explantes para la inoculación se preparan de un modo antes descrito (Hinchey *et al.*, 1988).

- Los explantes deben inocularse durante 30 minutos. El medio de cocultivo y de resuspensión de *Agrobacterium* consiste en medio B5 complementado con BAP 1 mg/l, GA3 1 mg/l, sacarosa 3% (p/v), MES (ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico) 20 mM, L-cisteína 400 mg/l (Olhoff y Somers, 2001) pH 5,7, ditiotreitól (DTT) 0,99 mM y acetosiringona (AS) 200 µM. Los explantes se cocultivan durante 5 días a 25° C. Tras el cocultivo, los explantes se lavan con el medio de cocultivo que contiene timentin 100 mg/l y cefotaxima 200 mg/l, sin MES ni AS.
30

- A continuación, los explantes deben colocarse en un medio inductor de brotes y transferirse cada 14 días durante un total de 28 días antes de la selección con herbicida. El medio inductor de brotes consiste en medio B5 sin diluir complementado con BAP 1,7 mg/l, timentin 100 mg/l, cefotaxima 200 mg/l pH 5,7 y sacarosa 3% (p/v). Los
35 cotiledones deben colocarse con su lado adaxial hacia arriba y la región del nudo cotiledonar a ras con el medio, y ser expuestos a niveles crecientes de Basta (2, 5, 6 y por último 7 mg/l de glufosinato amónico) o a niveles subletales de 2,4-D comprendidos entre 10 mg y 400 mg/l cada 2 semanas durante un total de 8 semanas.

- Los explantes diferenciados se transfieren entonces a un medio de elongación de brotes durante 4 a 10 semanas más, donde permanecen expuestos a la misma selección con glufosinato o bajo una menor presión selectiva con 2,4-D, en concentraciones de 10 mg a 100 mg/l. El medio de elongación consiste en medio B5 (Sigma, nº catálogo M0404) con ribósido de zeatina 1 mg/l, IAA (ácido indol-3-acético) 0,1 mg/l, GA3 0,5 mg/l, glutamina 50 mg/l, asparragina 50 mg/l, y sacarosa 3 % (p/v), pH 5,8. Los brotes elongados se hacen enraizar, sin ninguna otra selección, en medio MS diluido a la mitad/vitaminas B5 sin diluir, más NAA (ácido α-naftalenacético) 0,5 mg/l o IAA 0,1 mg/l y sacarosa 2% (p/v).
40

- Los antibióticos, timentin y cefotaxima, se mantienen presentes en los medios durante toda la selección. El medio de los cultivos se renueva cada 2 semanas. Las plántulas se aclimatan durante 1 ó 2 semanas antes del traslado al invernadero.
45

- 13.1.3 - Evaluación de la progenie. Plantas T₀ se dejan autofecundar en el invernadero para engendrar las semillas T₁. Las plantas T₁ (y en la medida en que se disponga de suficientes clones, también las plantas T₀) son pulverizadas con diferentes dosis de herbicida para determinar el nivel de protección frente al mismo proporcionado por los genes *AAD-1* (v3) y *PAT* en la soja transgénica. Las dosis de 2,4-D aplicadas a las plantas T₀ consisten normalmente en una o dos dosis selectivas del orden de 100 a 400 g e.a./ha. Por su parte, las semillas T₁ reciben dosis de herbicida más amplias, comprendidas entre 50-3200 g e.a./ha de 2,4-D. De igual forma, las plantas T₀ y T₁ se pueden seleccionar por su resistencia al glufosinato mediante un tratamiento en postemergencia con 200-800 y
50 50-3200 g e.a./ha de este herbicida, respectivamente. El análisis de la expresión de la proteína se efectúa del modo descrito en el Ejemplo 9 para *Arabidopsis* y maíz. La herencia del *AAD-1* (v3) se averigua analizando la segregación en la progenie T₁ y T₂ de los caracteres de tolerancia a los herbicidas.
55

13.2 - Método de transformación 2: transformación con *Agrobacterium* "sin agitación" de una suspensión de células de soja no regenerables

Suspensiones de células de soja DAS se cultivaron en un tercer ciclo con 10 ml de volumen de suspensión sedimentada transferidos a 115 ml de medio líquido fresco. El volumen de células sedimentadas se determinó dejando asentar la suspensión celular durante 2 min en un matraz de 125 ml tras una agitación enérgica y extrayendo las células del fondo del mismo con una micropipeta de 10 ml con punta ancha. Después, los matraces se colocaron en agitadores orbitales a 140 rpm.

Alícuotas de 4 ml de células en suspensión a una D.O.⁶⁰⁰ de 0,72 se transfirieron junto con acetosiringona (AS) 200 µM a una placa de Petri estéril de 100x25. Después, se añadieron 100 µl de una suspensión de *Agrobacterium* EHA105 con una densidad a D.O.⁶⁵⁰ de 1,2 y se mezcló bien. La placa con la mezcla de *Agrobacterium* y de células en suspensión se agitó bien con movimientos circulares y se depositó en una cámara oscura de crecimiento a una temperatura constante de 25° C.

13.2.1 - Selección de las células de soja en suspensión y aislamiento de las colonias transformadas. Al cabo de 4 días de cocultivo la placa se volvió a agitar para mezclar la suspensión y se transfirió una alícuota de 1,5 ml al medio de selección que a continuación se esparció sobre medio gelificado en una placa de Petri de 100x15 ml. El medio de selección consistía en medio B5 sin disolver complementado con BAP 1,7 mg/l, timentin 100 mg/l, cefotaxima 200 mg/l pH 5,7 y sacarosa al 3% (p/v), añadiéndosele además glufosinato amónico en una concentración de 5 mg/l. Tras permanecer 10 min en la campana extractora para el secado, las placas se incubaron durante 4 semanas a oscuras y a 28° C. Las colonias seleccionadas crecieron y once de ellas se transfirieron a medio fresco para 3 experimentos distintos y se mantuvieron durante 3-4 meses. Las 11 colonias resistentes escogidas produjeron callos que crecieron en el medio de selección con glufosinato 5 mg/l. Las células en suspensión sin transformar resultaron sensibles a la siembra en medio con glufosinato amónico 0,5 mg/l. En cambio, las colonias transformadas resistieron una concentración 5x de glufosinato amónico y se mantuvieron hasta 4 meses.

Los eventos de callo se muestrearon para los análisis cuando alcanzaron entre 2 y 3 cm de diámetro. por lo menos dos colonias aisladas en dos experimentos distintos fueron analizadas para determinar la expresión de la proteína AAD-1. Los análisis con ELISA y Western de ambos aislamientos arrojaron un resultado positivo para la expresión de proteínas AAD-1. Los análisis con ELISA (Tabla 29) y con transferencia Western (Figura 18) de los dos callos de soja independientes transformados con el gen *AAD-1* (v3) indicaron que las células del callo estaban expresando la proteína AAD-1 (v3). El ELISA en sándwich detectó un 0,0318% y un 0,0102% de *AAD-1* (v3) en la proteína soluble total extraída de dos muestras de tejido de callo. Debido a la sensibilidad y la reactividad cruzada del antisuero, en la transferencia Western se observaron bandas múltiples. Pese a ello, en ambas muestras de callo se observó la banda específica de la *AAD-1* (v3), a diferencia del tejido natural (negativo) donde no estaba presente. Los análisis por PCR de la región codificante demostraron la presencia de productos del tamaño esperado de las regiones codificantes de *AAD1* y *PAT* en estas colonias, lo cual indica que habían sido transformadas.

Tabla 29. Datos de PCR y ELISA de los eventos transgénicos de soja.

Evento	PCR de la región codificante de AAD-1	PCR de la región codificante de PAT	TSP (Hg/ml)	AAD-1 (ng/ml)	% Expresión
1-1	+	+	1995,13	633,89	0,0318%
2-1	+	+	2018,91	205,92	0,0102%
Control negativo	-	-	2074,63	-1,22	-0,0001%

13.3 - Método de transformación 3: Transformación con chorro de aerosol de callo embriogénico de soja

El cultivo de callo embriogénico de soja y el proceso de exposición al chorro de aerosol se describen en la patente US nº 6.809.232 (Held *et al.*).

Los callos embriogénicos de varias variedades de élite Stine, 96E750, 96E94, 97E986, 96E144 y 96E692 incluido, entre otras se recogieron por separado en el centro de placas de B1-30 3Co5My o B1-30 3Co5My0.25PA0.5K tres días después de haber sido trasladadas a medio fresco. A continuación, el tejido se pulverizó con pDAB3295 utilizando ADN linealizado a una concentración aproximada de 0,2 µg/ml. Después de la pulverización del aerosol, el callo embriogénico se transfirió a B1-30 3Co5My o B1-30 3Co5My0.25PA0.5K frescos para un pase de un mes. El tejido se transfirió seguidamente a un medio selectivo que contenía bialafos 1 mg/l. Durante la selección, el bialafos se mantuvo normalmente a 1 mg/l durante los dos primeros pases de un mes y después se aumentó a 2 mg/l durante los tres a siete meses siguientes. Los eventos transgénicos se identificaron cuando el tejido de callo generado por los experimentos de transformación comenzó a organizarse y a generar estructuras embriogénicas mientras todavía permanecía en medio selectivo con 2,4-D más bialafos. Una vez identificadas, las estructuras en maduración se regeneraron en plantas siguiendo el protocolo siguiente: las estructuras embriogénicas se trasladaron

de B1-30 3Co5My o B1-30 3/co5My0.25PA0.5K a medio B3. Al cabo de 3 ó 4 semanas de crecimiento en medio B3, las estructuras individuales se transfirieron a medio fresco. Transcurridas otras 3 ó 4 semanas, los embriones maduros se transfirieron a medio B5G y se expusieron a la luz. Los embriones que se alargaron y produjeron raíces se transfirieron a tubos con medio 1/2 B5G donde prosiguieron su desarrollo en plántulas; por último, estas se sacaron de los tubos y se plantaron en macetas.

Se probaron algunas variantes de los medios citados en la Tabla 30, p. ej., B1-30 3Co5My, elaborado con agua de coco al 3% y mioinositol 5 g/l añadidos a B1-30. Otras variantes incluyeron: B1-30 3Co5My0.25 PA0.5K, que contenía medio basal B1-30 más agua de coco al 3%, mioinositol 5 g/l, ácido fítico 0,25 g/l y KH_2PO_4 adicional 0,5 g/l; y 1/2 B5G, que contenía todos los ingredientes del medio B5G diluidos a la mitad.

Tabla 30. Medios de crecimiento para soja			
	Ingredientes por litro		
	BI-30	B3	B5G
Sales Ms	4,43 g	4,43 g	
Sales B5			3,19g
NaEDTA	37,3 mg	37,3 mg	37,3 mg
2,4-D	30 mg		
Carbón activado		5g	
Phytagar	8g	8g	
Gelrite			2g
PH	5,8	5,8	5,8

Ejemplo 14 - Introducción del AAD-1 (v3) en algodón

14.1 - Protocolo de transformación del algodón

Semillas de algodón (genotipo Co310) se sumergen en etanol al 95% durante 1 minuto para esterilizar su superficie, se lavan, se esterilizan con lejía comercial al 50% durante veinte minutos, y después se lavan 3 veces con agua destilada estéril antes de dejarlas germinar en medio G (véase Tabla 31) en cajas Magenta GA-7 expuestas a una alta intensidad lumínica, 40-60 $\mu\text{E}/\text{m}^2$, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 28°C.

Segmentos cuadrados de cotiledón (~5 mm) se extrajeron de plántulas de 7-10 días de edad y se depositaron en placas de Petri con medio líquido M (véase Tabla 31) (Nunc, nº artículo 0875728). Los segmentos cortados se trataron con una solución de *Agrobacterium* durante 30 minutos y después se transfirieron a medio M semisólido (Tabla 31), permaneciendo en cocultivo durante 2-3 días. Al término de este, los segmentos se transfirieron a medio MG (Tabla 31). La carbenicilina es el antibiótico utilizado para matar a *Agrobacterium* y el glufosinato amónico es el agente de selección que únicamente debe permitir el crecimiento de las células portadoras del gen transferido.

Preparación de *Agrobacterium*. Inocular 35 ml de medio Y (Tabla 31) (con estreptomicina (solución madre de 100 mg/ml) y eritromicina (solución madre 100 mg/ml)) con el contenido de un asa de bacterias dejadas crecer durante un día a oscuras y 28° C, en agitación a 150 rpm. El día siguiente, la solución de *Agrobacterium* se vierte en un tubo de centrifuga Oakridge estéril (Nalge-Nunc, 3139-0050), y se centrifuga con un aparato Beckman J2-21 a 8.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descarta, el sedimento se resuspende en 25 ml de líquido M (Tabla 31) y se vortea. Una alícuota del mismo se coloca en un tubo de cultivo de vidrio (Fisher, 14-961-27) para la lectura en un fotocolorímetro (Klett-Summerson, modelo 800-3). La nueva suspensión se diluye con medio líquido M para proceder a la lectura en el fotocolorímetro Klett de 10^8 ufc/ml con un volumen total de 40 ml.

Al cabo de tres semanas, el callo formado a partir de los segmentos de cotiledón se aísla y se transfiere a medio MG fresco. El callo se transfiere a medio MG durante 3 semanas más. A continuación, se traslada a medio CG (Tabla 31) y se transfiere de nuevo a medio fresco de selección al cabo de tres semanas. Después de otras tres semanas, el tejido de callo se transfiere a medio D (Tabla 31) carente de reguladores del crecimiento vegetal para la inducción del callo embriogénico. Tras 4-8 semanas en este medio, se forma el callo embriogénico, que puede distinguirse del callo no embriogénico por su color amarillento-blancuzco y las células granulares. Los embriones comienzan a regenerarse poco después y presentan un distintivo color verde.

Los embriones más grandes y desarrollados se aíslan y se transfieren a medio DK (Tabla 31) para completar el desarrollo embrionario. Tres semanas después (o cuando los embriones hayan crecido), los embriones germinados se transfieren a medio fresco para el desarrollo de brotes y raíces. Al cabo de 4-8 semanas, todas las plantas bien desarrolladas se trasplantan al suelo y se cultivan hasta que alcanzan la madurez. Al cabo de un par de meses, la

5

Tabla 31. Medios para la transformación del algodón								
Ingredientes por litro	G	M líquido	M	MG	CG	D	DK	Y
Sales LS (5X)	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml			
Glucosa		30 g	30 g	30 g	30 g	20 g		
vit B5 modificada(1000x)	1 ml	1ml	1ml	1ml	1ml	10 ml	1 ml	
Cinetina (1mM)		1ml	1ml	1 ml	4,6 ml		0,5ml	
2,4-D (1mM)		1ml	1 ml	1ml				
Agar	8 g		8 g	8 g	8 g	8 gs	8 g	
Sales DKW (D190)						1 saquete	1 saquete	
Mioinositol (100x)						1 ml	10 ml	
Sacarosa 3%	30 g						30 g	10 grams
NAA								
Carbenicilina (250 mg/ml)				2 ml	0,4 ml			
GLA (10mg/ml)				0,5 ml	0,3 ml			
Peptona								10 g
Extracto de levadura								10 g
NaCl								5 g

14.2 - Pormenores del experimento

Para este experimento se trataron 500 segmentos de cotiledón con pDAB721. De los 500 segmentos tratados, 475 presentaron callos aislados durante la selección (frecuencia de transformación del 95%). El callo se seleccionó con glufosinato amónico, debido a la inclusión del gen *PAT* en el constructo, puesto que ya se había elaborado un esquema de selección. El análisis de la línea del callo mediante PCR e Invader permitió determinar los patrones de inserción y comprobar que el gen estuviera presente en el estadio de callo; las líneas de callos que eran embriogénicas fueron sometidas a un análisis Western.

10

15 14.3 - Resultados del análisis de los callos

El análisis tenía por propósito descartar todas las líneas que no contuvieran la PTU completa, no manifestaran expresión o tuvieran un alto número de copias; tales líneas no se regenerarían. De las 475 líneas de callos transformados con pDAB721, 306 se sometieron al análisis PCR y al ensayo Invader (Tabla 32). Muy pocas líneas arrojaron un resultado negativo en la PCR. Los resultados de Invader no están listos todavía íntegramente porque de algunas muestras no se pudo extraer suficiente ADN, y tuvieron que volver a enviarse. No obstante, los datos disponibles hasta ahora del ensayo Invader demuestran que pocas líneas analizadas presentan un gran número de copias (>2 copias) (Tabla 32). Debido al gran número de líneas que superaron el análisis, fue preciso reducir el número de líneas de callos embriogénicos mantenidas por su excesivo volumen. Noventa líneas se enviaron para el análisis con Western, y ocho de ellas resultaron negativas. Este análisis reveló una elevada expresión en la mayoría de las líneas (Tabla 32). A tenor de los resultados de estos análisis (y de los resultados pendientes) se están manteniendo 82 líneas de callos embriogénicos para la regeneración de las plantas.

20

25

Tabla 32. Análisis de los callos de algodón

Línea	N.º de copias	PTU	Western	Línea	N.º de copias	PTU	Western
1	2	pos	***	43	1	pos	*****
2	1	pos	***	44	ADN escaso	pos	*****
3	1	pos	***	45	1	pos	*****
4		pos	***	46	2	pos	*****
5	1	pos	***	47	1	pos	***
6	1	pos	neg	48	1	pos	***
7	1	pos	****	49	3	pos. dudoso	neg
8	1	pos	*****	50	1	pos	****
9		pos	*	51	4	pos	neg
10	1	pos	*	52	2	pos	****
11	1	pos	*****	53	1	pos	***
12	1	pos	*	54	1	pos	****
13	1	pos	*	55	1	pos	neg
14	1	pos	**	56	5	pos	*
15	1	pos	****	57	2	pos. dudoso	neg
16	1	pos	*****	58	8	pos	****
17	1	pos	*	59	2	pos	****
18	1	pos	***	60	5	pos	*****
19	1	pos	**	61	1	pos	**
20	1	pos	*****	62	1	pos	**
21		pos	*****	63	1	pos	***
22	1	pos	*****	64	1	pos	***
23	1	pos	*****	65	3	pos	****
24		pos	* ó neg	66	5	pos	*
25	1	pos	****	67	6	pos	*
26	1	pos	****	68	ADN escaso	pos	neg
27	ADN escaso	pos	*****	69	ADN escaso	pos	****
28	ADN escaso	pos	**	70	ADN escaso	pos	**
29	ADN escaso	pos	*****	71	ADN escaso	pos. dudoso	**
30	17	pos	*	72	ADN escaso	pos	****
31	ADN escaso	pos	*****	73	ADN escaso	neg	***
32	ADN escaso	pos	*****	74	ADN escaso	pos. dudoso	***
33	ADN escaso	pos	****	75	ADN escaso	pos	***

34	ADN escaso	pos. dudoso	*****
35	ADN escaso	pos	****
36	ADN escaso	pos	neg
37	ADN escaso	pos	****
38	ADN escaso	neg	*****
39	1	pos	****
40	ADN escaso	pos	*
41	ADN escaso	pos	*
42	ADN escaso	pos	**
Patrón AAD1 5µg/ml *****			
Patrón AAD1 0,5µg/ml **			

76	ADN escaso	pos	neg
77	ADN escaso	pos. dudoso	****
78	ADN escaso	pos	****
79	1	pos	**
80	ADN escaso	pos	***
81	ADN escaso	pos	***
82	ADN escaso	pos	***
83	ADN escaso	neg	****
84	ADN escaso	pos	***
85	ADN escaso	pos	**
86	ADN escaso	pos	*

14.4 - Regeneración de la planta

Dos líneas de algodón portadoras del AAD-1 (v3) que produjeron plantas con arreglo al protocolo indicado se enviaron al invernadero. Para demostrar que el gen AAD-1 (v3) confiere al algodón resistencia frente al 2,4-D, plantas de algodón portadoras del AAD-1 (v3) y otras naturales fueron tratadas con un pulverizador de carril a 187 l/ha. Las plantas recibieron una dosis de 560 g e.a./ha de 2,4-DMA formulado en tampón Hepes 200 mM (pH 7,5) y fueron evaluadas 3, 7 y 14 días después del tratamiento. Se les asignó una puntuación de daños observando si presentaban enanismo, clorosis y necrosis. Las plantas que recibieron una puntuación de daño igual o superior al 90% se consideraron muertas. Tres días después del tratamiento (DAT) las plantas naturales comenzaron a mostrar epinastia y recibieron una puntuación del 15%; en cambio, las plantas portadoras del AAD-1 (v3) manifestaron 0% de daños. A los 7 DAT, las plantas naturales seguían presentando epinastia y los brotes nuevos habían comenzado a amarronarse; recibieron una puntuación del 50%. A los 14 DAT, las plantas con AAD-1 (v3) seguían indemnes, mientras que las naturales presentaban un acusado enanismo, con las zonas de nuevo crecimiento marrones y marchitas, recibiendo una valoración del 90% en esa fecha.

Este estudio demuestra que el gen AAD-1 (v3) confiere al algodón una notable tolerancia frente al 2,4-D aplicado en dosis de hasta 560 g e.a./ha.

Ejemplo 15 - Transformación con *Agrobacterium* de otros cultivos

A partir de la presente descripción, es posible transformar otros cultivos según la presente invención por medio de técnicas conocidas en la disciplina. Para la transformación de centeno con *Agrobacterium*, véase p. ej., Popelka y Altpeter (2003). Para la transformación de soja con *Agrobacterium*, véase p. ej., Hinchee *et al.*, 1988. Para la transformación de sorgo con *Agrobacterium*, véase p. ej., Zhao *et al.*, 2000. Para la transformación de cebada con *Agrobacterium*, véase p. ej., Tingay *et al.*, 1997. Para la transformación de trigo con *Agrobacterium*, véase p. ej., Cheng *et al.*, 1997. Para la transformación de arroz con *Agrobacterium*, véase p. ej., Hiei *et al.*, 1997.

Los nombres científicos de esas y otras plantas se enumeran a continuación. Debe quedar claro que es posible utilizar esas y otras técnicas de transformación (sin *Agrobacterium*) para llevar a cabo la transformación del gen AAD-1 (v3), por ejemplo, en las plantas siguientes, entre otras: maíz (*Gramineae*, *Zea mays*), trigo (*Pooideae*, *Triticum* spp.), arroz (*Gramineae*, *Oryza* spp. y *Zizania* spp.), cebada (*Pooideae*, *Hordeum* spp.), algodón (*Abroma* *Dicotyledoneae*, *Abroma augusta*, y *Malvaceae*, *Gossypium* spp.), soja (*Leguminosae*, *Glycine max*), remolacha azucarera (*Chenopodiaceae*, *Beta vulgaris altissima*), caña de azúcar (*Arenga pinnata*), tomate (*Solanaceae*, *Lycopersicon esculentum* y otras spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* y otras spp., y *Cyphomandra betacea*), patata, batata, centeno (*Pooideae*, *Secale* spp.), pimientos (*Solanaceae*, *Capsicum annuum*, *sinense* y *frutescens*), lechuga (*Compositae*, *Lactuca sativa*, *perennis* y *pulchella*), col, apio (*Umbelliferae* *Apium graveolens*), berenjena (*Solanaceae*, *Solanum melongena*), sorgo (todas las especies de *Sorghum*), alfalfa (*Leguminosae*, *Medicago sativum*), zanahoria (*Umbelliferae*, *Daucus carota sativa*), judías (*Leguminosae*, *Phaseolus* spp. y otros géneros), avenas (*Avena sativa* y *strigosa*), guisantes (*Leguminosae*, *Pisum*, *Vigna* y *Tetragonolobus* spp.), girasol (*Compositae*, *Helianthus annuus*), calabaza (*Dicotyledoneae*, *Cucurbita* spp.), pepino (*Dicotyledoneae* genera), tabaco (*Solanaceae*, *Nicotiana* spp.), *Arabidopsis* (*Cruciferae*, *Arabidopsis thaliana*), césped (*Lolium*, *Agrostis* y otras familias), y trébol (*Leguminosae*). Tales plantas, con genes AAD-1 (v3), por ejemplo, están incluidas en la presente invención.

Ejemplo 16 - Apilamiento del gen *AAD-1* (v3) con el gen de resistencia a herbicidas *AHAS*

El apilamiento de *AAD-1* (v3) con el gen de resistencia a herbicidas *AHAS* se describe en el Ejemplo 7.9.

Ejemplo 17 - Más pruebas de resultados sorprendentes: *AAD-1* vs. *AAD-2*17.1 - Clonación inicial del *AAD-2* (v1)

En la base de datos de NCBI se identificó otro gen homólogo (véase el sitio web ncbi.nlm.nih.gov; entrada nº AP005940) que sólo mantenía una identidad de aminoácidos del 44% con el *tfdA*. Este gen se denomina en la presente memoria *AAD-2* (v1) por coherencia. La identidad porcentual se determinó traduciendo las secuencias de ADN del *AAD-2* y del *tfdA* (SEC ID nº 12 y entrada GENBANK Nº M16730, respectivamente) a sus respectivas proteínas (SEC ID nº 13 y entrada GENBANK Nº M16730, respectivamente), y después procediendo al alineamiento múltiple de las secuencias por medio del programa ClustalW, incluido en el paquete de software Vector NTI.

La cepa de *Bradyrhizobium japonicum* portadora del gen *AAD-2* (v1) se adquirió en el Northern Regional Research Laboratory (NRRL, cepa nº B4450). La cepa liofilizada se revivió siguiendo el protocolo del NRRL y se conservó a -80° C en glicerol al 20% para uso interno como la cepa bacteriana *Dow Bacterial DB 663*. De esta solución madre congelada, se sembró el contenido de células de un asa en una placa de agar triptona y soja para el aislamiento, incubándose a 28° C durante 3 días. Una sola colonia se sembró en 100 ml de caldo de triptona y soja contenidos en un matraz de 500 ml con tres placas deflectoras, que se incubó hasta el día siguiente a 28° C en un agitador de plataforma a 150 rpm. De este se aisló el ADN total con el protocolo para gramnegativas del kit DNeasy de Qiagen (Qiagen, nº catálogo 69504). Para amplificar el gen diana a partir del ADN genómico se diseñaron los siguientes cebadores: Directo: 5' ACT AGT AAC AAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA CGA T 3' [(brjap 5'(spel) SEC ID nº 14 (añadidos una diana de restricción para Spe I y un sitio de unión a ribosoma (RBS))], e Inverso: 5' TTC TCG AGC TAT CAC TCC GCC GCC TGC TGC TGC 3' [(brjap 3' (xhoI) SEC ID nº 15 (añadido una diana para Xho I)].

Las reacciones de 50 microlitros se prepararon del modo siguiente: tampón Fail Safe Buffer 25 µl, cada cebador 1 µl (50 ng/µl), ADNg 1 µl (200 ng/µl), H₂O 21 µl, polimerasa Taq 1 µl (2,5 unidades/µl). Tres tampones Fail Safe - A, B y C - se usaron en tres reacciones distintas. A continuación, se llevó a cabo la PCR con las condiciones siguientes: ciclo de desnaturalización por calor a 95° C durante 3,0 minutos; 95° C durante 1,0 minuto, 50° C durante 1,0 minuto, 72° C durante 1,5 minutos, durante 30 ciclos; seguidos de un ciclo final de 72° C durante 5 minutos, utilizando el FailSafe PCR System (Epicenter, nº catálogo FS99100). El producto resultante de la PCR de ~1 kb se clonó en pCR 2.1 (Invitrogen, nº catálogo K4550-40) siguiendo el protocolo incluido, utilizando como cepa hospedadora la *E. coli* TOP10F' químicamente competente, para verificar la secuencia de nucleótidos.

Diez de las colonias blancas surgidas se sembraron en 3 µl de caldo Luria + ampicilina 1000 µg/ml (LB Amp) y se dejaron crecer hasta el día siguiente a 37° C con agitación. Los plásmidos de cada cultivo se purificaron con el kit Nucleospin Plus Plasmid Miniprep Kit (BD Biosciences, nº catálogo K3063-2) siguiendo el protocolo incluido. El ADN aislado se sometió a una digestión con enzimas de restricción para confirmar la presencia del producto de la PCR en el vector pCR2.1. El ADN plasmídico se digirió con la enzima de restricción EcoRI (New England Biolabs, nº catálogo R0101S). La secuenciación se llevó a cabo con el kit Beckman CEQ Quick Start (Beckman Coulter, nº catálogo 608120) utilizando un cebador directo de M13 [5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'] (SEC ID nº 16) y otro inverso [5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'] (SEC ID nº 17), según las instrucciones del fabricante. Esta secuencia génica y su proteína correspondiente recibieron una nueva designación general de *AAD-2* (v1) para mantener la coherencia interna.

17.2 - Construcción del vector binario de *AAD-2* (v1)

El gen *AAD-2* (v1) se amplificó por PCR a partir del pDAB3202. Durante la reacción de PCR se modificaron los cebadores para introducir dianas de restricción para AflIII y SacI en el cebador 5' y en el cebador 3', respectivamente. Los cebadores "NcoI de Brady" [5' TAT ACC ACA TGT CGA TCG CCA TCC GGC AGC TT 3'] (SEC ID nº 18) y "SacI de Brady" [5' GAG CTC CTA TCA CTC CGC CGC CTG CTG CTG CAC 3'] (SEC ID nº 19) se usaron para amplificar un fragmento de ADN por medio del sistema Fail Safe PCR System (Epicentre). El producto de la PCR se clonó en el vector de clonación pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen) y la secuencia se verificó con los cebadores M13 directo e inverso utilizando los reactivos para secuenciación del kit "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit", de Beckman Coulter. Los datos de la secuenciación permitieron identificar un clon con la secuencia correcta (pDAB716). Seguidamente, el fragmento del gen *AAD-2* (v1) AflIII/SacI se clonó en el vector pDAB726 NcoI/SacI. El constructo resultante (pDAB717); promotor AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: *AAD-2* (v1): Nt OSM3'UTR: ORF1 polIA 3'UTR se verificó con digestiones con enzimas de restricción (con NcoI/SacI). Este constructo a su vez se clonó en el pDAB3038 binario con un fragmento de ADN NotI-NotI. El constructo resultante (pDAB767); promotor AtUbi10: Nt OSM5'UTR: *AAD-2* (v1): Nt OSM 3'UTR: ORF1 polIA 3'UTR: promotor del CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR se digirió con enzimas de restricción (NotI, EcoRI, HindIII, NcoI, PvuII y Sall) para verificar la correcta orientación. El constructo acabado (pDAB767) se empleó para la transformación en *Agrobacterium*.

17.3 - Comparación de las especificidades de sustrato de *AAD-2* (v1) y *AAD-1* (v1)

La actividad de un extracto de *E. coli* que expresaba la *AAD-2* (v1) (pDAB3202) preparado como en el Ejemplo 11 se

analizó con cuatro herbicidas, a saber, 2,4-D, (R,S)-diclorprop, (R,S)-haloxifop y (R)-haloxifop (todos en una concentración final de 0,5 mM) utilizando 3 μ l (42 μ g) de extracto de *E. coli* por ensayo, con un período de ensayo de 15 min. La figura 22 muestra que la actividad relativa de la AAD-2 (v1) sobre los sustratos fue: 2,4-D = diclorprop > (R,S)-haloxifop >> (R)-haloxifop. Por tanto, la AAD-2 (v1) difiere de la AAD-1 (v1) en que posee un nivel similar de actividad sobre el 2,4-D y el diclorprop (mientras que la actividad de la AAD-1 (v1) sobre el 2,4-D es ~10% de la manifestada contra diclorprop). La AAD-2 (v1) también difiere de la AAD-1 (v1) en que es incapaz de actuar contra el (R)-haloxifop. La Tabla 33 contiene los datos de otros sustratos analizados con AAD-1 (v1) y AAD-2 (v1) que confirman que esta última es específica para sustratos (S)-enantiómeros, a diferencia de la AAD-1 (v1), que lo es para (R)-enantiómeros. En otra prueba la AAD-2 (v1) difirió de la AAD-1 (v1) en que se detectaron pequeñas o nulas cantidades de fenoles derivados del 2,4-D sulfonato (en el que un grupo sulfonato sustituye al carboxilato del 2,4-D) mientras que la AAD-1 (v1) genera niveles significativos de fenoles a partir de este compuesto (~25% del 2,4-D).

Tabla 33. Comparación de la actividad de AAD-1 y AAD-2 sobre varios sustratos. Los sustratos se analizaron a 0,5 mM durante 15 min en MOPS 25 mM pH 6,8, Fe^{2+} 200 μ M, ascorbato sódico 200 μ M, α -cetoglutarato 1 mM con 4 μ l de extracto de AAD-1 (32 μ g de proteína) o 3 μ l de extracto de AAD-2 (42 μ g de proteína).

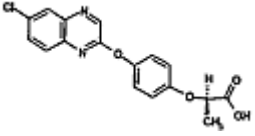
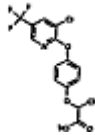
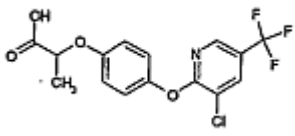
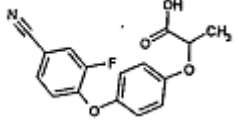
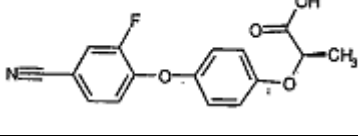
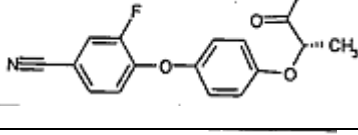
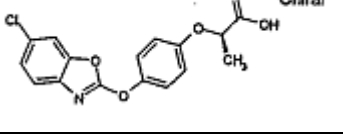
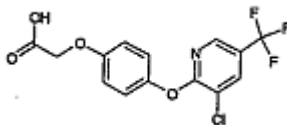
ESTRUCTURA	ID Reg	Compuesto	Enantiómero	A510	
				AAD1	AAD2
	18706	quizalofop	R	0,27	0,01
	8671	haloxifop	R	0,12	0
	66905	haloxifop	R,S	0,1	0,3
	14623	cihalofop	R,S	0,12	0,1
	14603	cihalofop	R	0,14	0
	7466	cihalofop	S	0	0,15
	11044492	fenoxaprop	R	0,14	0

Tabla 33. Comparación de la actividad de AAD-1 y AAD-2 sobre varios sustratos. Los sustratos se analizaron a 0,5 mM durante 15 min en MOPS 25 mM pH 6,8, Fe^{2+} 200 μM , ascorbato sódico 200 μM , α -cetoglutarato 1 mM con 4 μl de extracto de AAD-1 (32 μg de proteína) o 3 μl de extracto de AAD-2 (42 μg de proteína).

ESTRUCTURA	ID Reg	Compuesto	Enantiómero	A510	
				AAD1	AAD2
	43865	haloxifop-acetato	-	0	0,22

La cinética enzimática de las proteínas AAD-1 (v1) y AAD-2 (v1) parcialmente purificadas se comparó utilizando el 2,4-D como sustrato. Véase la figura 19. Los valores K_m correspondientes al 2,4-D ascendieron a 97 y 423 μM para la AAD-1 (v1) y la AAD-2 (v1) respectivamente, y los valores de la $V_{\text{máx}}$ aparente fueron de 0,11 y 0,86 unidades de A_{510} , respectivamente (Tabla 34). Dado que en los análisis se utilizaron cantidades equivalentes de enzima (determinadas por el análisis con SDS-PAGE), se puede concluir que la k_{cat} de la AAD-2 (v1) con el 2,4-D es casi ocho veces mayor que la de la AAD-1 (v1), y que el k_{cat}/K_m es dos veces mayor. Por tanto, la AAD-2 (v1) es significativamente más eficiente a la hora de degradar el 2,4-D *in vitro* que la AAD-1 (v1). Este hecho contrasta sorprendentemente con los resultados hallados *in vivo* en las plantas y que se describen a continuación, en los cuales las plantas que expresaban la AAD-1 (v1) resultaron significativamente más resistentes al 2,4-D que las portadoras de AAD-2 (v1).

Tabla 34. Comparación de los valores K_m y $V_{\text{máx}}$ correspondientes a las ariloxialcanoato dioxigenasas (AAD) de pDAB3202 (AAD-2) y pDAB3203 [AAD-1 (v1)] obtenidos con diferentes sustratos herbicidas:

Enzima	Compuesto	K_m (μM) \pm SE	V_{max} (unidades de A510)	K_m/V_{max} (unidades arbitrarias)
AAD-2	2,4-D	423 (± 1)	0,86	2,03
AAD-1 (v1)	2,4-D	97 (± 21)	0,11	1,16

Nota: los ensayos se realizaron en MOPS pH 6,75 + α -cetoglutarato 1 mM + ascorbato sódico 0,1 mM + Fe^{2+} 0,1 mM y los fenoles liberados se detectaron por colorimetría con 4-aminoantipirina/ferricianuro.

17.4 - Evaluación de las plantas de *Arabidopsis* transformadas

Semillas T_1 transformadas con un gen natural [AAD-1 (v2)], un gen optimizado para vegetales [AAD-1 (v3)] o un gen natural AAD-2 (v1) recién recogidas se dejaron secar por espacio de 7 días a temperatura ambiente. Después se sembraron en bandejas de germinación de 26,5 x 51 cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, Minnesota, EE.UU.), en cada una de las cuales se plantaron alícuotas de 200 mg de semillas T_1 estratificadas (~10.000 semillas) que previamente habían sido suspendidas en 40 ml de solución de agarosa al 0,1% y mantenidas a 4° C durante 2 días para completar los requerimientos de la dormición y asegurar una germinación simultánea.

Sustrato de semillero Sunshine LP5 Mix (Sun Gro Horticulture, Bellevue, Washington, EE.UU.) se cubrió con vermiculita fina, se regó por goteo subterráneo con solución de Hoagland hasta dejarlo empapado, y después se dejó drenar por gravedad. Cada alícuota de 40 ml de semillas estratificadas se sembró uniformemente en la vermiculita con una pipeta y se tapó con una cubierta para retener la humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4-5 días. Las cubiertas se retiraron 1 día antes de la selección inicial de transformantes mediante una pulverización en postemergencia con glufosinato (que seleccionó a las contras transformadas con el gen *PAT*).

Entre 5 y 6 días después de la siembra (DAP) y de nuevo a los 10 DAP, las plantas T_1 (cotiledón y estadio de 2-4 hojas, respectivamente) se pulverizaron con una solución de herbicida Liberty al 0,2% (200 g m.a./l de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, Mo., EE.UU.) con un volumen de pulverización de 10 ml/bandeja (703 l/ha) utilizando una boquilla de aire comprimido DeVilbiss para suministrar una dosis efectiva de 280 g m.a./ha de glufosinato por aplicación. Las plantas supervivientes (las que continuaban creciendo) se identificaron 5-7 días después de la última pulverización y se trasplantaron de forma individual a macetas de 3 pulgadas rellenas con medio para macetas (Metro Mix 360). Las plantas trasplantadas se taparon con cubiertas para retener la humedad durante 3-4 días y se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 22° C como antes. Posteriormente, las cubiertas

se retiraron y las plantas se trasladaron al invernadero ($22 \pm 5^\circ \text{C}$, $50 \pm 30\%$ HR, 14 h de luz:10 h de oscuridad, mínimo de luz natural + complementaria = $500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) por lo menos 1 día antes del ensayo destinado a analizar la capacidad de AAD-1 (v3), AAD-1 (v2) o AAD-2 (v1) para conferir resistencia contra herbicidas auxínicos fenoxi.

5 En plantas T₁ seleccionadas por su resistencia frente al glufosinato y escogidas al azar se confirmó la expresión de la proteína PAT por medio de un kit de ELISA para PAT (nº artículo 7000045, Strategic Diagnostics, Inc., Newark, Delaware, EE.UU.); de ese modo se confirmó de forma no destructiva la fidelidad del proceso de selección (protocolo del fabricante). A continuación las plantas se asignaron al azar para recibir diversas dosis de 2,4-D (50-800 g e.a./ha).

10 Las aplicaciones de herbicida se realizaron con un pulverizador de carril ajustado a un volumen de pulverización de 187 l/ha. El 2,4-D empleado consistió en una formulación comercial de la sal dimetilamina (456 g e.a./l, NuFarm, St Joseph, Mo., EE.UU.) mezclada con tampón Tris 200 mM (pH 9,0).

17.5 - Resultados de la selección de las plantas transformadas

15 Las primeras transformaciones de *Arabidopsis* se efectuaron con el gen AAD-1 (v3). En primer lugar, las transformantes T₁ se seleccionaron entre el conjunto de semillas no transformadas mediante un esquema de selección con glufosinato. Más de 400.000 semillas T₁ fueron sometidas a selección y entre ellas se hallaron 493 plantas resistentes al glufosinato (gen PAT), lo que equivale a una frecuencia de transformación/selección de 0,12%. Dependiendo del lote de semillas analizado, esta osciló entre 0,05-0,23% (véase la Tabla 15 en el Ejemplo 6.5 precedente). También con el glufosinato como agente de selección, se detectó un pequeño lote de semillas transformadas con el gen natural AAD-1 (v2). Entre las 84.000 semillas analizadas se identificaron 278 individuos T₁ resistentes al glufosinato (frecuencia de transformación/selección del 0,33%). Sorprendentemente, las transformaciones de *Arabidopsis* con el gen natural AAD-2 (v1) arrojaron una frecuencia de transformación muy baja al seleccionarse por la tolerancia al glufosinato (función de marcador seleccionable PAT). Entre las alrededor de 1,3 millones de semillas analizadas sólo se recuperaron 228 plantas transformantes para el glufosinato, lo que equivale a una frecuencia de transformación/selección del 0,018% (véase la Tabla 15). Así pues, la frecuencia de transformación del AAD-2 (v1) natural sólo supuso el 6% de la del AAD-1 (v2) natural. El gen AAD-2 (v1) natural fue optimizado posteriormente de manera artificial, clonado e incorporado en un pDAB3705 para transformar *Arabidopsis* con los métodos antes descritos (véase el Ejemplo 5). El gen AAD-2 (v2) optimizado para vegetales (SEC ID nº 29, que codifica la SEC ID nº 30) manifestó una frecuencia de selección en *Arabidopsis* T₁ con herbicida Liberty que resultó normal, de aproximadamente 0,11% (véase la Tabla 15).

30 Las plantas T₁ seleccionadas se trasplantaron a macetas individuales y se pulverizaron con diversas dosis de herbicidas ariloxialcanoato comerciales. La Tabla 16 (en el Ejemplo 6.5 anterior) compara la respuesta de los genes AAD-1 (v2), AAD-1 (v3), AAD-2 (v1) y AAD-1 (v2) para conferir resistencia contra el 2,4-D a plantas *Arabidopsis* T₁ transformadas. Todos los genes proporcionaron cierta resistencia sustancial contra el 2,4-D respecto a las líneas control transformadas y sin transformar, aunque los diversos constructos manifestaron una amplia variabilidad en su capacidad para conferir resistencia frente al 2,4-D a las plantas T₁ de *Arabidopsis*. Los niveles de respuesta de las plantas sometidas a un mismo tratamiento manifestaron una gran variabilidad, lo que puede atribuirse al hecho de que cada planta representa un evento de transformación distinto. Cabe subrayar que a cualquiera de las dosis de 2,4-D probadas, hubo individuos que no se vieron afectados en absoluto, mientras que otros lo fueron gravemente. En la Tabla 16 se presenta el promedio de daños en la población total por cada dosis con objeto de demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con AAD-1 (v2), AAD-1 (v3), AAD-2 (v1) o con AAD-1 respecto a los controles naturales o transformados con PAT/Cry1F.

45 Sorprendentemente, las plantas transformadas con AAD-2 (v1) resultaron mucho menos resistentes al 2,4-D que las transformadas con los genes AAD-1 (v2) o AAD-1 (v3) (Tabla 16), tanto en términos de frecuencia de plantas muy tolerantes como de promedio total de daños. Ninguna planta transformada con AAD-2 (v1) sobrevivió a 200 g e.a./ha de 2,4-D relativamente indemne (daños visuales <20%), y los daños de la población global oscilaron alrededor del 83%. En cambio, el 56% (45 de 80) de las plantas T₁ transformadas con AAD-1 (v2) sobrevivieron a 200 g e.a./ha de 2,4-D sin daños sustanciales (promedio de daños en la población = 34%), y >73% (11 de 15) de las plantas T₁ portadoras del AAD-1 (v3) resultaron indemnes (promedio de daños en la población = 14%). Véase la figura 20. La tolerancia en las portadoras del gen AAD-2 (v2) optimizado para vegetales resultó ligeramente mejor respecto al gen natural; en cambio, la comparación de los genes AAD-1 y -2 optimizados para vegetales indica una ventaja significativa para el AAD-1 (v3) expresado en planta (véase la Tabla 16).

55 Estos resultados son inesperados, dado que la comparación *in vitro* de las AAD-1 (v2) y AAD-2 (v1) naturales indicaba que el 2,4-D era más degradado por la AAD-2 (v1). La AAD-2 (v1) se expresa en las plantas T₁ en diferentes grados con el tamaño previsto, pero su expresión confiere escasa protección contra los daños causados por el 2,4-D. Existe poca correlación entre el nivel de expresión observado en la transferencia Western y el nivel de daño causado por el 2,4-D en las mismas plantas. Véase la figura 21. No resultó patente ninguna gran diferencia en el nivel de expresión de la proteína (en planta) entre los genes AAD-2 natural y optimizado para vegetales. Estos datos corroboran los resultados previos que convierten la expresión funcional de la AAD-1 (v3) en la planta como un medio de conferir resistencia a los herbicidas 2,4-D y AOPP en un hecho inesperado.

Ejemplo 18 - Aplicaciones de desherbado en presiembra

Este ejemplo y los siguientes son ejemplos concretos de nuevas aplicaciones herbicidas que la presente invención de AAD-1 hace posibles.

Las aplicaciones de herbicidas en presiembra tienen por finalidad matar las malas hierbas que han brotado durante el invierno o a inicios de primavera antes de plantar los cultivos. Normalmente dichas aplicaciones se realizan en sistemas de cultivo sin laboreo o laboreo reducido donde antes de la siembra no se ha llevado a cabo la eliminación física de las malas hierbas. El programa herbicida, por tanto, debe controlar un espectro muy amplio de malas hierbas dicotiledóneas y gramíneas que está presente en el momento de la siembra. Glifosato, gramoxona y glufosinato son ejemplos de herbicidas no selectivos y no residuales muy utilizados en las aplicaciones herbicidas en presiembra. Algunas malezas, sin embargo, resultan difíciles de controlar en esa época del año debido a uno o varios de los factores siguientes: insensibilidad intrínseca de la especie o el biotipo al herbicida, tamaño relativamente grande de las malezas anuales de invierno, y condiciones meteorológicas frías que limitan la absorción y actividad del herbicida. Existen varias opciones para la mezcla en tanque de los herbicidas a fin de aumentar el espectro y la actividad contra las malas hierbas cuando los herbicidas más selectivos resultan ineficientes. Un ejemplo consistiría en aplicar una mezcla en tanque de 2,4-D y glifosato para controlar a *Conyza canadensis* (calta). El glifosato se puede utilizar en dosis de 420 a 1680 g e.a./ha, más habitualmente entre 560 y 840 g e.a./ha, para el control en presiembra de la mayoría de malezas presentes, pero también se pueden aplicar entre 280-1120 g e.a./ha de 2,4-D para ayudar a controlar numerosas malas hierbas de hoja ancha (por ejemplo, la calta). El 2,4-D es un herbicida de elección por su eficacia contra un amplísimo abanico de malas hierbas dicotiledóneas, incluso a bajas temperaturas, y su módico coste. No obstante, si el futuro cultivo es una dicotiledónea sensible, los residuos de 2,4-D que permanezcan en el suelo (a pesar de su breve vida media) pueden afectarlo. La soja es un cultivo sensible que requiere un periodo mínimo de tiempo de 7 (para 280 g e.a./ha de 2,4-D) a 30 días (para aplicaciones de 2,4-D de 1120 g e.a./ha) entre las aplicaciones de desherbado y la siembra. El uso del 2,4-D como tratamiento en presiembra del algodón está prohibido (véanse las etiquetas oficiales, la mayoría disponibles en el CPR, 2003 o en línea en cdms.net/manuf/manuf.asp). En el caso del algodón o la soja transformados con AAD-1 (v3), estos cultivos deben ser capaces de sobrevivir a los residuos de 2,4-D presentes en el suelo a causa de los tratamientos de desherbado efectuados hasta justo antes o incluso después de la siembra, pero antes de la emergencia del cultivo. La mayor flexibilidad y el menor coste de los otros integrantes de la mezcla de tanque (o de la premezcla comercial) mejorarán las opciones de control de malas hierbas y aumentarán la efectividad de las aplicaciones de desherbado en situaciones importantes de laboreo reducido o nulo. Este ejemplo es una de las muchas opciones que estarán disponibles. Los expertos en técnicas de control de malas hierbas advertirán otras aplicaciones como, por ejemplo, gramoxona + 2,4-D o glufosinato + 2,4-D utilizando los productos descritos en las etiquetas oficiales de los herbicidas (CPR, 2003) y los usos descritos en la *Agrilience Crop Protection Guide* (2003), entre otras. Los expertos en la materia también reconocerán que el ejemplo anterior también se puede aplicar a cualquier cultivo sensible al 2,4-D (o a otro herbicida auxínico fenoxi), que quedará protegido por el gen AAD-1 (v3) siempre que este quede integrado de forma estable.

Ejemplo 19 - Uso en cultivo de los herbicidas auxínicos fenoxi en soja, algodón y otros cultivos de dicotiledóneas transformados únicamente con AAD-1 (v3)

El gen AAD-1 (v3) puede posibilitar el uso de los herbicidas auxínicos fenoxi (por ejemplo, 2,4-D, diclorprop, MCPA y otros) para el control de un amplio espectro de malas hierbas latifolias directamente en cultivos que normalmente son sensibles al 2,4-D. La aplicación del 2,4-D en dosis de 280 a 2240 g e.a./ha permitiría controlar la mayoría de arvenses latifolias presentes en los entornos agrícolas; habitualmente se utilizan sobre todo 560-1120 g e.a./ha. En un sistema de control integral de las malas hierbas también se deben controlar las gramíneas. En estos momentos hay registrada una amplia gama de graminicidas, como por ejemplo haloxifop, quizalofop, fenoxaprop, fluazifop, setoxidim y cletodim, para el uso en la mayoría de cultivos de dicotiledóneas, los cuales toleran de forma natural tales herbicidas. Una combinación de quizalofop (20-100 g e.a./ha) y 2,4-D (420-840 g e.a./ha) podría proporcionar dos mecanismos de acción herbicidas en un cultivo de dicotiledónea transformada con AAD-1 (v3) (esto es, soja o algodón) que controlarían la mayoría de malas hierbas agronómicas de manera similar al glifosato en cultivos tolerantes al mismo (véanse los espectros de control de malas hierbas en las características técnicas de la *Crop Protection Guide* de Agrilience).

Una ventaja de esta herramienta adicional es el coste sumamente bajo del herbicida de hoja ancha y el potencial control residual de breve vida que proporcionan las dosis más altas de 2,4-D y/o los herbicidas AOPP cuando se utilizan en dosis elevadas, a diferencia de un herbicida no residual como el glifosato, que no consigue controlar las malas hierbas que germinan tardíamente. Esta herramienta también facilita un mecanismo para rotar los modos de acción herbicidas con las ventajas de los HTC como una estrategia integrada para el manejo de la resistencia a herbicidas y los cambios en la flora arvense en una estrategia de rotación de HTC con un cultivo tolerante a glifosato/AAD-1 (v3), tanto si se rotan las especies de cultivo como si no. Asimismo, los componentes para el control de gramíneas y dicotiledóneas de este sistema son independientes el uno del otro, lo que permite a un experto en técnicas de control de malas hierbas decidir cuál es la proporción de herbicida AOPP y auxínico más eficaz y rentable económicamente. Por ejemplo, si en el momento de la aplicación del herbicida predominan las latifolias, se puede aplicar un tratamiento con 560 a 1120 g e.a./ha de 2,4-D, sin ningún herbicida más. Así se reducirían las aplicaciones innecesarias de herbicida, proporcionando flexibilidad para reducir los costes de producción y la carga

ambiental de pesticidas, al tiempo que se reduciría la presión selectiva innecesaria que puede acabar generando resistencia a los herbicidas entre las malas hierbas.

Otros beneficios pueden incluir la tolerancia a la deriva o la volatilización del 2,4-D, fenómenos responsables de daños en cultivos de dicotiledóneas cercanos; no es necesario respetar un periodo entre la aplicación y la siembra (véase el ejemplo anterior); y se reducen los problemas de daños por contaminación en cultivos de dicotiledóneas provocados por una limpieza poco esmerada de los tanques que han contenido 2,4-D. El dicamba y otros herbicidas se pueden seguir utilizando para el control de los ricios de dicotiledóneas transformadas con AAD-1 (v3).

Los expertos en la materia también reconocerán que el ejemplo anterior es aplicable a cualquier cultivo sensible al 2,4-D (o a otro herbicida auxínico fenoxi) que quedaría protegido por el gen AAD-1 (v3) si queda transformado de forma estable. Un experto en las técnicas de control de malas hierbas reconocerá que la transformación con AAD-1 (v3) posibilita el uso de varios herbicidas auxínicos fenoxi comerciales solos o en combinación con cualquier herbicida AOPP comercial. Las dosis específicas de otros herbicidas representativos de estas familias químicas se pueden calcular con las etiquetas de los herbicidas compiladas en el manual CPR (*Crop Protection Reference*) o una compilación similar o con cualquier referencia de protección de cultivos comercial o académica como la *Crop Protection Guide* de Agrilience (2003). Todos los herbicidas alternativos que puedan ser utilizados en HTC gracias al AAD-1 (v3), ya sea en aplicaciones de un solo herbicida, en mezcla de tanque o secuenciales, se consideran dentro del ámbito de la presente invención.

Ejemplo 20 -Uso en cultivo de los herbicidas auxínicos fenoxi y AOPP en maíz, arroz y otras especies de monocotiledóneas transformadas únicamente con AAD-1 (v3)

De un modo análogo, la transformación de especies de gramíneas (como, entre otras, maíz, arroz, trigo, cebada o césped y gramíneas forrajeras) con AAD-1 (v3) permitiría el uso de graminicidas AOPP muy eficaces en cultivos que normalmente son sensibles a estos herbicidas. La mayoría de gramíneas presentan una tolerancia natural a los herbicidas auxínicos como los herbicidas auxínicos fenoxi (2,4-D, diclorprop y otros). No obstante, el nivel relativamente bajo de selectividad para el cultivo ha mermado la utilidad en dichos cultivos debido a la mayor brevedad del intervalo de aplicación y a malas hierbas latifolias alternativas. Los cultivos de monocotiledóneas transformados con AAD-1 (v3) permitirían el uso de una combinación de tratamientos similar a la descrita en los cultivos de dicotiledóneas, como es la aplicación de 2,4-D a dosis de 280 a 2240 g e.a./ha para controlar la mayoría de malas hierbas latifolias, aunque generalmente se utilizarían 560-1120 g e.a./ha. Por su parte, se pueden utilizar diversos graminicidas AOPP de amplio espectro (haloxifop, quizalofop, fenoxaprop, fluazifop, etc.) para controlar un gran número de malas hierbas gramíneas. Los graminicidas de ciclohexanodiona como setoxidim, cletodim, etc. no podrían ser utilizados en este sistema como en los cultivos de dicotiledóneas, ya que la AAD-1 no confiere protección contra esta familia química y los cultivos de gramíneas son sensibles de forma natural a los derivados de la ciclohexanodiona. No obstante, este atributo posibilitaría el uso de tales herbicidas como medio para controlar los ricios de monocotiledóneas transformadas con el AAD-1 (v3). A partir de ahora, la AAD-1 hace posible la adopción de estrategias de control de malas hierbas similares a las de los cultivos de dicotiledóneas. Una combinación de quizalofop (20-100 g e.a./ha) y 2,4-D (420-840 g e.a./ha) proporcionaría dos mecanismos de acción distintos en un cultivo de monocotiledóneas transformadas con AAD-1 (v3) (por ejemplo maíz y arroz) que controlaría la mayoría de malas hierbas agronómicas de un modo similar al glifosato en los cultivos tolerantes a este (véanse los espectros de control de malas hierbas consultando las características técnicas en la *Crop Protection Guide* de Agrilience).

Una ventaja de esta herramienta adicional es el coste sumamente bajo del herbicida de hoja ancha y el potencial control residual de breve vida que proporcionan las dosis más altas de 2,4-D y/o los herbicidas AOPP cuando se utilizan en dosis elevadas, a diferencia de un herbicida no residual como el glifosato, que no consigue controlar las malas hierbas que germinan tardíamente. Esta herramienta también facilita un mecanismo para rotar los modos de acción herbicidas con las ventajas de los HTC como una estrategia integrada para el manejo de la resistencia a herbicidas y los cambios en la flora arvense en una estrategia de rotación de HTC con un cultivo tolerante a glifosato/AAD-1 (v3), tanto si se rotan las especies de cultivo como si no. Asimismo, los componentes para el control de gramíneas y dicotiledóneas de este sistema son independientes el uno del otro, lo que permite a un experto en técnicas de control de malas hierbas decidir cuál es la proporción de herbicida AOPP y auxínico más eficaz y rentable económicamente. Por ejemplo, si en el momento de la aplicación del herbicida predominan las latifolias, se puede aplicar un tratamiento con 560 a 1120 g e.a./ha de 2,4-D, sin ningún herbicida más. Así se reducirían las aplicaciones innecesarias de herbicida, proporcionando flexibilidad para reducir los costes de producción y la carga ambiental de pesticidas, al tiempo que se reduciría la presión selectiva innecesaria que puede acabar generando resistencia a los herbicidas entre las malas hierbas. La mayor tolerancia del maíz y de otras monocotiledóneas a los herbicidas auxínicos fenoxi fomentará el uso de tales herbicidas en cultivo sin las restricciones impuestas por el estadio de crecimiento o el riesgo de encamado, fenómenos como la inhibición del desenrollamiento de las hojas, encamado, fragilidad de la raspa provocada por reguladores del crecimiento en el maíz, o la deformación de las raíces fúlcreas.

Los expertos en la materia también reconocerán ahora que el ejemplo anterior puede ser aplicable a cualquier cultivo de monocotiledónea que quedara protegido por el gen AAD-1 (v3) de los daños causados por cualquier herbicida AOPP. Un experto en las técnicas de control de malas hierbas reconocerá que la transformación con AAD-1 (v3) posibilita el uso de varios herbicidas auxínicos fenoxi comerciales, solos o en combinación con cualquier

herbicida AOPP comercial. Las dosis específicas de otros herbicidas representativos de estas familias químicas se pueden calcular con las etiquetas de los herbicidas compiladas en el manual CPR (*Crop Protection Reference*) o una compilación similar o con cualquier referencia de protección de cultivos comercial o académica como la *Crop Protection Guide* de Agrilience (2003). Todos los herbicidas alternativos que puedan ser utilizados en HTC gracias al AAD-1 (v3), ya sea en aplicaciones de un solo herbicida, en mezcla de tanque o secuenciales, se consideran dentro del ámbito de la presente invención.

Ejemplo 21 - AAD-1 (v3) apilado con un carácter de tolerancia al glifosato en cualquier cultivo

La gran mayoría de hectáreas de algodón, colza y soja sembradas en Norteamérica contienen un carácter de tolerancia al glifosato (GT), y la adopción del maíz GT crece día a día. Otros cultivos GT (por ejemplo trigo, arroz, remolacha azucarera y césped) se encuentran en fase de desarrollo pero no han sido comercializados hasta la fecha. Muchas otras especies resistentes al glifosato se encuentran en fase experimental o de desarrollo (por ejemplo alfalfa, caña de azúcar, girasol, remolacha, guisantes, zanahoria, pepino, lechuga, cebolla, fresa, tomate y tabaco; especies forestales como el chopo y el árbol de ámbar; y especies de horticultura ornamental como tagetes, petunias y begonias; isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005 en el web). Los cultivos GTC son herramientas valiosas por la amplísima variedad de malas hierbas que permiten controlar y por la comodidad y rentabilidad económica que ofrecen. No obstante, el actual uso del glifosato como un tratamiento básico ordinario está seleccionando malas hierbas resistentes a él. Es más, las malezas en que el glifosato resulta de forma natural menos eficaz están desplazando a las especies predominantes en los campos donde sólo se aplican programas herbicidas a base de glifosato. El apilamiento del AAD-1 (v3) con un carácter GT, ya sea mediante cruzamiento convencional o conjuntamente con un evento de transformación novedoso, mejoraría el control de las malas hierbas, la sensibilidad y la capacidad para manejar los cambios de la flora arvense y la aparición de resistencia a herbicidas. Tal y como se ha señalado en ejemplos precedentes, la transformación de los cultivos con AAD-1 (v3) posibilita la aplicación selectiva de herbicidas AOPP en los cultivos de monocotiledóneas, ofrece un mayor margen de seguridad a los cultivos de monocotiledóneas frente a los herbicidas auxínicos fenoxi y, por último, permite la aplicación selectiva de los herbicidas auxínicos fenoxi en los cultivos de dicotiledóneas. Se pueden imaginar diversas opciones para mejorar el control de las malas hierbas mediante el apilamiento del AAD-1 (v3) y de un carácter GTC en una especie cultivada de monocotiledónea o dicotiledónea:

- a) El glifosato se puede aplicar en postemergencia a una dosis ordinaria (420 a 2160 g e.a./ha, preferiblemente 560 a 840 g e.a./ha) para el control de la mayoría de malas hierbas gramíneas y latifolias. Para el control de las malas hierbas resistentes al glifosato como *Conyza canadensis* o de malas hierbas que resultan de por sí difíciles de controlar con él (por ejemplo, *Commelina* spp), se puede aplicar 2,4-D a 280-2240 g e.a./ha (preferiblemente 560-1120 g e.a./ha) de manera secuencial, en mezcla en tanque, o en premezcla con glifosato para lograr un control eficaz.
- b) El glifosato se puede aplicar en postemergencia a una dosis ordinaria (420 a 2160 g e.a./ha, preferiblemente 560 a 840 g e.a./ha) para el control de la mayoría de malas hierbas gramíneas y latifolias. Para el control de las malas hierbas resistentes al glifosato como *Lolium rigidum* o *Eleusine indica*, se puede aplicar quizalofop a 10-200 g e.a./ha (preferiblemente 20-100 g e.a./ha) de manera secuencial, en mezcla en tanque o en premezcla con glifosato para lograr un control eficaz.
- c) Actualmente, las dosis de glifosato usadas en los GTC oscilan en general entre 560 a 2240 g e.a./ha por aplicación. El glifosato es mucho más eficaz contra las especies de gramíneas que contra las latifolias. El apilamiento de los caracteres AAD-1 (v3) + GT permitiría la administración del glifosato en dosis graminicidas eficaces (105-840 g e.a./ha, y preferiblemente 210-420 g e.a./ha). El 2,4-D (a 280-2240 g e.a./ha, y preferiblemente 560-1120 g e.a./ha) se podría aplicar entonces de manera secuencial, mezclado en tanque o como premezcla con dosis de glifosato eficaces contra las gramíneas para conseguir el necesario control de las malas hierbas latifolias. Un herbicida AOPP como el quizalofop a 10-200 g e.a./ha (preferiblemente a 20-100 g e.a./ha y más preferiblemente a 20-35 g e.a./ha), podría conseguir un control más sólido de las gramíneas y/o retrasar el desarrollo de gramíneas resistentes al glifosato. La baja dosis de glifosato también sería beneficiosa para el control de las malas hierbas latifolias, aunque el control primario radicaría en el 2,4-D.

Un experto en la materia de control de malas hierbas reconocerá que la transformación de cultivos con AAD-1 (v3) permitirá el uso de uno o varios herbicidas auxínicos fenoxi comerciales, solos o en combinación con uno o varios herbicidas AOPP comerciales (secuencial o independientemente). Las dosis específicas de otros herbicidas representativos de estas familias químicas se pueden calcular con las etiquetas de los herbicidas compiladas en el manual CPR (*Crop Protection Reference*) o una compilación similar o con cualquier referencia de protección de cultivos comercial o académica como la *Crop Protection Guide* de Agrilience (2003). Todos los herbicidas alternativos que puedan ser utilizados en HTC gracias al AAD-1 (v3), ya sea en aplicaciones de un solo herbicida, en mezcla de tanque o secuenciales, se consideran dentro del ámbito de la presente invención.

Ejemplo 22 - AAD-1 (v3) apilado con un carácter de tolerancia al glufosinato en cualquier cultivo

La tolerancia al glufosinato (PAT o bar) ya está presente en varias especies cultivadas en Norteamérica en forma de

marcador seleccionable de un carácter agronómico como proteínas de resistencia a insectos o específicamente como un carácter de HTC. Entre tales cultivos se encuentran, entre otros, la canola, el maíz y el algodón tolerantes al glufosinato. Otros cultivos tolerantes al glufosinato (por ejemplo arroz, remolacha azucarera, soja y césped) se encuentran en fase de desarrollo pero no han sido comercializados hasta la fecha. El glufosinato, al igual que el glifosato, es un herbicida de amplio espectro para gramíneas y hoja ancha, dotado de una relativa selectividad. El mecanismo de acción del glufosinato difiere del del glifosato. Actúa con rapidez, pues provoca la desecación y la necrosis en las hojas tratadas entre 24 y 48 horas después de la aplicación, lo que supone una ventaja para lograr un rápido control de las malas hierbas. Sin embargo, ello también limita la translocación del glufosinato a los tejidos meristemáticos de la planta, lo que se traduce en un control menos eficiente, tal y como evidencia el rendimiento relativo de ambos compuestos en muchas especies (Agrilience, 2003).

El apilamiento del AAD-1 (v3) con un carácter de tolerancia al glufosinato, ya sea mediante cruzamiento convencional o conjuntamente con un evento de transformación novedoso, mejoraría la eficacia y la flexibilidad en el control de las malas hierbas, la sensibilidad y la capacidad para manejar los cambios de la flora arvense y la aparición de resistencia a herbicidas. Tal y como se ha señalado en ejemplos precedentes, la transformación de los cultivos con AAD-1 (v3) posibilita la aplicación selectiva de herbicidas AOPP en los cultivos de monocotiledóneas, ofrece un mayor margen de seguridad a los cultivos de monocotiledóneas frente a los herbicidas auxínicos fenoxi y, por último, permite la aplicación selectiva de los herbicidas auxínicos fenoxi en los cultivos de dicotiledóneas. Se pueden imaginar diversas opciones para mejorar el control de las malas hierbas mediante el apilamiento del AAD-1 (v3) y de un carácter de tolerancia al glufosinato en una especie cultivada de monocotiledónea o dicotiledónea:

- a) El glufosinato se puede aplicar en postemergencia a una dosis ordinaria (200 a 1700 g e.a./ha, preferiblemente 350 a 500 g e.a./ha) para el control de la mayoría de malas hierbas gramíneas y latifolias. Hasta la fecha no se ha confirmado la existencia de malas hierbas resistentes al glufosinato, pero son más las especies de malezas que de forma natural son tolerantes a él que en el caso del glifosato.
- i) Las malas hierbas gramíneas que son tolerantes naturales (por ejemplo *Echinochloa* spp. o *Sorghum* spp.) se pueden controlar con su mezcla en tanque con quizalofop a 10-200 g e.a./ha (preferiblemente 20-100 g e.a./ha).
- ii) Las malas hierbas latifolia que son tolerantes naturales (por ejemplo, *Cirsium arvensis* y *Apocynum cannabinum*) se pueden controlar con la mezcla en tanque de 2,4-D a 280-2240 g e.a./ha, y preferiblemente a 560-2240 g e.a./ha, para el control eficaz de estas especies perennes de difícil control y reforzar el control de las latifolias anuales.
- b) Una triple combinación de glufosinato (200-500 g e.a./ha) + 2,4-D (280-1120 g e.a./ha) + quizalofop (10-100 g e.a./ha), por ejemplo, proporcionaría un espectro de control solapado más sólido. Además, el solapamiento del espectro proporciona un mecanismo adicional para el manejo o el retraso en la aparición de malas hierbas resistentes a herbicidas.

Un experto en la materia de control de malas hierbas reconocerá que la transformación con AAD-1 (v3) posibilita el uso de varios herbicidas auxínicos fenoxi comerciales, solos o en combinación con cualquier herbicida AOPP comercial. Las dosis específicas de otros herbicidas representativos de estas familias químicas se pueden calcular con las etiquetas de los herbicidas compiladas en el manual CPR (*Crop Protection Reference*) o una compilación o manual similar, con las etiquetas compiladas en línea (por ejemplo cdms.net/manuf/manuf.asp) o con cualquier referencia de protección de cultivos comercial o académica como la *Crop Protection Guide* de Agrilience (2003). Todos los herbicidas alternativos que puedan ser utilizados en HTC gracias al AAD-1 (v3), ya sea en aplicaciones de un solo herbicida, en mezcla de tanque o secuenciales, están comprendidos en el alcance de la presente invención.

Ejemplo 23 - AAD-1 (v3) apilado con un carácter AHAS en cualquier cultivo

La tolerancia a los herbicidas de imidazolinona (AHAS y otros) ya está presente en varias especies cultivadas en Norteamérica como, por ejemplo, maíz, arroz y trigo. Otros cultivos tolerantes a las imidazolinonas (por ejemplo algodón y remolacha azucarera) se encuentran en fase de desarrollo pero no han sido comercializados hasta la fecha. Muchos herbicidas de imidazolinona (por ejemplo imazamox, imazetapir, imazaquin e imazapic) se utilizan de forma selectiva en varios cultivos convencionales. La incorporación de caracteres de tolerancia a las imidazolinonas como AHAS y similares ha posibilitado el uso de imazetapir, imazamox y del no selectivo imazapir. Los HTC tolerantes a las imidazolinonas disponibles hasta la fecha tienen la ventaja de no ser transgénicos. Esta familia química también ejerce una sustancial actividad residual en el suelo, lo que permite prolongar el control de las malas hierbas más allá del momento de la aplicación, a diferencia de los sistemas basados en el glifosato o el glufosinato. No obstante, el espectro de malas hierbas controlado por los herbicidas de imidazolinona no es tan extenso como el del glifosato (Agrilience, 2003). Asimismo, las imidazolinonas poseen un mecanismo de acción (inhibición de la acetolactato sintasa, ALS) contra el cual muchas especies arvenses han generado resistencia (Heap, 2004). El apilamiento del AAD-1 (v3) con un carácter de tolerancia a las imidazolinonas, ya sea mediante cruzamiento convencional o conjuntamente con un evento de transformación novedoso, mejoraría la eficacia y la flexibilidad del control de las malas hierbas, la capacidad para manejar los cambios de la flora arvense y la aparición de resistencia a herbicidas. Tal y como se ha señalado en ejemplos precedentes, la transformación de los cultivos con AAD-1 (v3)

posibilita la aplicación selectiva de herbicidas AOPP en los cultivos de monocotiledóneas, ofrece un mayor margen de seguridad a los cultivos de monocotiledóneas frente a los herbicidas auxínicos fenoxi y, por último, permite la aplicación selectiva de los herbicidas auxínicos fenoxi en los cultivos de dicotiledóneas. Se pueden imaginar diversas opciones para mejorar el control de las malas hierbas mediante el apilamiento del AAD-1 (v3) y de un carácter de tolerancia a las imidazolinonas en una especie cultivada de monocotiledónea o dicotiledónea:

- a) Imazetapir puede aplicarse en postemergencia a una dosis estándar (35 a 280 g e.a./ha, preferiblemente 70-140 g e.a./ha) para el control de numerosas malas hierbas gramíneas y latifolias.
- i) Las malas hierbas latifolias resistentes a los inhibidores de ALS como *Amaranthus rudis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album* (entre otras, Heap, 2004) pueden ser controladas mediante la mezcla en tanque de 2,4-D a 280-2240 g e.a./ha, y preferiblemente a 560-1120 g e.a./ha.
- ii) Las malas hierbas latifolias que toleran de forma natural las imidazolinonas, como *Ipomoea* spp., también pueden ser controladas mediante la mezcla en tanque de 2,4-D a 280-2240 g e.a./ha, y preferiblemente a 560-1120 g e.a./ha.
- iii) Las malas hierbas gramíneas que son resistentes a los inhibidores de ALS como *Sorghum halepense* y *Lolium* spp., pueden ser controladas mediante la mezcla en tanque de quizalofop a 10-200 g e.a./ha (preferiblemente a 20-100 g e.a./ha).
- iv) Las malas hierbas gramíneas que son tolerantes naturales (por ejemplo *Agropiron repens*) también pueden ser controladas mediante la mezcla en tanque de quizalofop a 10-200 g e.a./ha (preferiblemente a 20-100 g e.a./ha).
- b) Una triple combinación de imazetapir (35 a 280 g e.a./ha, preferiblemente 70-140 g e.a./ha) + 2,4-D (280-1120 g e.a./ha) + quizalofop (10-100 g e.a./ha), por ejemplo, puede proporcionar un espectro de control solapado más sólido. Además, el solapamiento del espectro proporciona un mecanismo adicional para el manejo o el retraso en la aparición de malas hierbas resistentes a herbicidas.

Un experto en la materia de control de malas hierbas reconocerá que la transformación con AAD-1 (v3) y su apilamiento con cualquier carácter de tolerancia a imidazolinona mediante cruzamiento convencional o ingeniería genética permiten el uso de varios herbicidas de imidazolinona, herbicidas auxínicos fenoxi o herbicidas AOPP comerciales, solos o en múltiples combinaciones. Las dosis específicas de otros herbicidas representativos de estas familias químicas se pueden calcular con las etiquetas de los herbicidas compiladas en el manual CPR (*Crop Protection Reference*) o una compilación o manual similar, con las etiquetas compiladas en línea (por ejemplo cdms.net/manuf/manuf.asp) o con cualquier referencia de protección de cultivos comercial o académica como la *Crop Protection Guide* de Agrilience (2003). Todos los herbicidas alternativos que puedan ser utilizados en HTC gracias al AAD-1 (v3), ya sea en aplicaciones de un solo herbicida, en mezcla de tanque o secuenciales, se consideran comprendidos en el alcance de la presente invención.

Ejemplo 24 - AAD-1 (v3) en arroz

24.1 - Descripción de los medios

Los medios de cultivo empleados se ajustaron a un pH 5,8 con KOH 1 M y se solidificaron con Phytigel 2,5 g/l (Sigma). Los callos embriogénicos se cultivaron en placas de Petri de 100 × 20 mm que contenían 40 ml de medio semisólido. Las plántulas de arroz se cultivaron en 50 ml de medio en cajas Magenta. Las suspensiones celulares se mantuvieron en matraces de Erlenmeyer de 125 ml, con 35 ml de medio líquido agitado a 125 rpm. La inducción y el mantenimiento de los cultivos embriogénicos tuvo lugar a oscuras y a 25-26° C, y la regeneración de las plantas y el cultivo de las plantas enteras se realizó con un fotoperiodo de 16 h (Zhang *et al.* 1996).

La inducción y el mantenimiento del callo embriogénico se efectuaron en medio basal NB del modo descrito con anterioridad (Li *et al.* 1993), pero modificado para contener glutamina 500 mg/l. Los cultivos en suspensión se iniciaron y mantuvieron en medio líquido SZ (Zhang *et al.* 1998) con la adición de sacarosa 30 g/l en lugar de maltosa. El medio osmótico (NBO) consistió en medio NB al que se añadió manitol y sorbitol, ambos en una concentración de 0,256 M. Los callos resistentes a higromicina B se seleccionaron con medio NB complementado con higromicina B 50 mg/l durante 3-4 semanas. La prerregeneración se efectuó en un medio (PRH50) elaborado con 6-bencilaminopurina (BAP) 2 mg/l, ácido α -naftalenacético (NAA) 1 mg/l, ácido abscísico (ABA) 5 mg/l e higromicina B 50 mg/l durante 1 semana. La regeneración de las plántulas se llevó a cabo en medio de regeneración (RNH50), consistente en medio NB sin 2,4-D, complementado con BAP 3 mg/l, NAA 0,5 mg/l e higromicina B 50 mg/l hasta que se regeneran los brotes. Estos se transfirieron a medio de enraizamiento con sales basales de Murashige y Skoog y vitaminas B5 de Gamborg diluidas a la mitad, complementado con sacarosa 50 mg/l e higromicina B (1/2MSH50).

24.2 - Desarrollo del cultivo de tejido.

Las semillas maduras desecadas de *Oryza sativa* L. *japonica* cv. Taipei 309 se esterilizaron del modo descrito por

Zhang *et al.* 1996. Los tejidos embriogénicos se indujeron cultivando semillas de arroz maduras y estériles en medio NB a oscuras. El callo primario de aproximadamente 1 mm de diámetro se extrajo del escutelo y con él se inició la suspensión celular en medio líquido SZ. A continuación, las suspensiones se mantuvieron del modo descrito por Zhang 1995. Los tejidos embriogénicos contenidos en la suspensión se extrajeron del cultivo líquido 3-5 días después del subcultivo anterior y se colocaron en medios osmóticos NBO hasta formar un círculo de unos 2,5 cm de diámetro en una placa de Petri, cultivándose durante 4 h antes del bombardeo. Entre 16 y 20 h después del bombardeo, los tejidos se transfirieron del medio NBO a medio de selección NBH50 con higromicina B, asegurándose de que la superficie bombardeada permaneciera orientada hacia arriba, y se incubaron a oscuras durante 14-17 días. Los callos recién formados se separaron de los explantes originales bombardeados y se colocaron cerca sobre el mismo medio. Al cabo de otros 8-12 días, se seleccionaron visualmente los callos opacos y relativamente compactos y se trasladaron a medio de prerregeneración PRH50 durante 7 días a oscuras. El callo en crecimiento, entonces más compacto y opaco, pasó a cultivarse en el medio de regeneración RNH50 durante 14-21 días con un fotoperiodo de 16 h. Los brotes regenerados se transfirieron a cajas Magenta que contenían medio ½ MSH50. Las plantas regeneradas de un mismo explante se consideran hermanas y son tratadas como una línea vegetal independiente. Las plantas se consideraron portadoras del gen *hph* si producían raíces gruesas y blancas y crecían con vigor en medio ½ MSH50. Una vez las plántulas alcanzaron la parte superior de las cajas Magenta, se trasplantaron a suelo en una maceta de 6 cm con humedad del 100% durante una semana, y después se trasladaron a una cámara de crecimiento con un periodo de luz de 14 h a 30°C y en oscuridad a 21°C durante 2-3 semanas antes de trasplantarlas en macetas de 13 cm en el invernadero. Las semillas se recogieron y se secaron a 37°C durante una semana antes de conservarlas a 4°C.

24.3 - Bombardeo con microproyectiles

Los bombardeos se llevaron a cabo con el sistema Biolistic PDS-1000/He™ (Bio-Rad, Laboratories, Inc.). Tres miligramos de partículas de oro de 1,0 micrómetro de diámetro se lavaron una vez con etanol al 100%, dos veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en 50 µl de agua en un tubo Eppendorf siliconado. A la suspensión de oro se le añadieron cinco microgramos de ADN plasmídico que representaba un cociente molar 1:6 de pDOW3303 (vector portador de *Hpt*) a pDAB3403, 20 µl de espermidina (0,1 M) y 50 µl de cloruro cálcico (2,5 M). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, se sedimentó a 10.000 rpm durante 10 s, después se resuspendió en 60 µl de etanol 100% frío y a continuación se introdujeron 8-9 µl de la misma en cada película circular de plástico (*macrocarrier*). Las muestras de tejidos se bombardearon a 1.100 psi y un vacío de 27 pulgadas de Hg, como describen Zhang *et al.* (1996).

24.4 - Análisis de la tolerancia

Las plántulas de arroz en estadio de 3-5 hojas se pulverizaron con una solución al 0,3% (v/v) de DuPont™ Assure® II que contenía aceite vegetal concentrado Agridex al 1% (v/v) con un pulverizador de perilla DeVilbiss (atomizador de vidrio modelo 15-RD). Esta concentración corresponde aproximadamente a 140 g e.a./ha. Las plantas se pulverizaron bajo una campana extractora de vapores a una distancia de 8-12 pulgadas con 6 chorros dirigidos de tal modo que la planta entera quedó cubierta con una fracción igual de herbicida. Cada chorro suministra aproximadamente 100 µl de solución a la plántula. Una vez tratadas, las plántulas se dejaron secar durante una hora antes de sacarlas de la campana extractora. La evaluación de la sensibilidad o la resistencia se efectuó 10-14 días después del tratamiento (DAT) y los resultados se muestran en la Tabla 35 a continuación.

Tabla 35.	
Nombre de la muestra	140 g ae/ha quizalofop
Control	Muerto
63-1A	Sin daños
63-1F	Sin daños
63-4B	Sin daños
63-4D	Sin daños
63-6C	Muerto

24.5 - Recolección del tejido, aislamiento y cuantificación del ADN

Se depositó tejido fresco en tubos y se liofilizó a 4°C durante 2 días. Una vez completamente seco, se colocó una perla de tungsteno (Valenite) en el tubo y las muestras de tejido fueron sometidas durante 1 minuto a molturación en

seco con un molino de perlas Kelco. A continuación, se procedió a aislar el ADN con un procedimiento DNeasy ordinario (Qiagen, DNeasy 69109). Después, una alícuota del ADN extraído se tiñó con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se visualizó en el fluorímetro (BioTek) con patrones conocidos para obtener la concentración en ng/μl.

5 24.6 - Análisis con transferencia Southern

El análisis con transferencia Southern se efectuó con el ADN total obtenido con el kit DNeasy de Qiagen. Un total de 2 μg de ADN se sometieron a una digestión hasta el día siguiente con HindIII para el pDAB3403 a fin de obtener los datos de integración. De manera similar, un total de 2 μg de ADN fueron sometidos a una digestión hasta el día siguiente con MfeI para obtener los datos de la PTU. Acabada la digestión, se procesó una alícuota de ~100 ng en un gel al 1% para comprobar que la digestión era completa. Después de esta comprobación las muestras se procesaron en un gel grande de agarosa al 0,85% hasta el día siguiente a 40 voltios. Acto seguido, el gel se desnaturalizó con NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. El gel se neutralizó seguidamente con Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M y pH 7,5 durante 30 minutos. Acto seguido, se preparó un aparato de gel con SSC 20x para transferir por gravedad el gel a una membrana de nilón (Millipore INYC00010), dejándolo hasta el día siguiente. Acabada la transferencia, la membrana se expuso a luz UV en presencia de un entrelazador (stratagene UV stratalinker 1800) a 1.200x100 microjulios. Después la membrana se lavó con SDS 0,1%, SSC 0,1 durante 45 minutos. Finalizado el lavado de 45 minutos, la membrana fue horneada durante 3 horas a 80°C y se conservó a 4°C hasta la hibridación. El molde de hibridación se preparó con la PCR de la región codificante mediante el plásmido pDAB3404. Como molde se emplearon en total 100 ng de ADN total. Se usaron 20 mM de cada cebador con el kit Takara Ex Taq PCR Polymerase (Mirus TAKRR001A). Los cebadores utilizados para el fragmento Southern fragment PCR AAD-1 fueron (Directo-ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEC ID nº 31) y (Inverso-GGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEC ID nº 32). La reacción de PCR se llevó a cabo con un termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo las muestras 94° C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 45 segundos seguidos por 72°C durante 10 minutos.

El producto se inyectó en un gel de agarosa al 1%, se recortó y después se extrajo el gel con el procedimiento de extracción de Qiagen (28706). La membrana se sometió entonces a una etapa de prehibridación a 60°C durante 1 hora en tampón Perfect Hyb (Sigma H7033). Con el procedimiento Prime it RmT dCTP-labeling rxn (Stratagene 300392) se procedió al revelado con una sonda de ³²P (Perkin Elmer). La sonda sobrante se lavó con columnas ProbeQuant G50 (Amersham 27-5335-01). Se usaron 2 millones de CPM por ml de tampón Perfect Hyb para hibridar las membranas de transferencia hasta el día siguiente. Finalizada la hibridación las membranas se sometieron a dos lavados de 20 minutos a 65°C con SDS 0,1%, SSC 0,1. Finalmente, las membranas se expusieron a una pantalla de imagen de fósforo durante toda la noche y se procesaron en un escáner Storm (Molecular Devices). Los resultados se resumen en la Tabla 36.

Tabla 36. Resultados de la transferencia Southern.		
Evento	Datos de integración del Southern	Datos de PTU del Southern
	Número of bandas	Tamaño esperado 3049bp
63-1 A	8	sí, 7 bandas distintas
63-1 F	5	sí, 9 bandas distintas
63-4 A	20	sí, 20 bandas distintas
63-4 D	20	sí, 19 bandas distintas
63-6 C	2	ADN insuficiente para ambos cortes

Las plantas 63-1 A y 63-1 F no pertenecen al mismo evento; las plantas 63-4 A y 63-4 D son del mismo evento. Estos eventos tienen PTU del tamaño esperado, pero son muy complejos. Estos datos de PTU obtenidos en la transferencia Southern concuerdan con los datos de expresión y los datos de la pulverización. La muestra 63-6 C no contaba con suficiente ADN para realizar las transferencias Southern de integración y de PTU.

24.7 - Datos de la transferencia Western

La preparación de la muestra y las condiciones de análisis corresponden a las descritas previamente. Cinco líneas de arroz transgénico y una línea de control no transgénica fueron analizadas para detectar la expresión de la AAD-1 con ELISA y transferencia Western. La AAD-1 se detectó en cuatro líneas (63-1A, 63-1F, 63-4B y 63-4D) pero no así en la línea 63-1C en la planta control. Los niveles de expresión oscilaron entre 15,6 y 183 ppm de proteína soluble

total. Se presenta un resumen de los resultados en la Tabla 37.

Tabla 37.

Línea	Nombre de la muestra	TSP (µg/mL)	ELISA		Western
			[AAD1] (ng/mL)	Expresión (ppm)	
1	Control	6719,58	0,00	0,00	-
2	63-1A	8311,87	351,17	42,25	±
3	63-1F	11453,31	2092,35	182,69	++
4	63-4B	13835,09	216,00	15,61	+
5	36-4D	13656,49	717,05	52,51	++
6	63-6C	5343,63	0,00	0.00	-
7	Patrón de AAD1 (0,5 µg/ml)				+++
8	Patrón de AAD1 (5,0 µg/ml)				+++++

Ejemplo 25 - Procedimientos de transformación de hierba de césped

- 5 La transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens* de la agróstide estolonífera, consistente en sustituir el gen "bar" por el AAD-1 (v3), puede conseguirse mediante un callo embriogénico obtenido a partir de semillas (cv. Penn-A-4), tal y como se describe de forma general a continuación. Véase "Efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated turfgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation" (Luo et. al., 2004).

- 10 El callo se infecta con una cepa de *A. tumefaciens* (LBA4404) portadora de un vector superbinario que contiene un gen *bar* resistente a herbicida controlado por un promotor de ubiquitina de arroz. La eficiencia total de la transformación estable oscila entre el 18% y el 45%. Los análisis con transferencia Southern y genéticos confirmaron la integración del transgén en el genoma de la agróstide estolonífera así como su transmisión normal y su expresión estable en la generación T₁. Todos los eventos de transformaciones independientes contenían entre una y tres copias del transgén, y la mayoría (60-65%) portaban una sola copia del gen foráneo sin reordenamientos aparentes.

15 25.1 - Preparación de las semillas para la inducción del callo embriogénico

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

25.2 - Inducción del callo embriogénico

- 25 Las placas de cultivo con los explantes de semillas preparados se mantuvieron a oscuras y temperatura ambiente durante 6 semanas. Los callos embriogénicos se seleccionaron visualmente y se cultivaron en medio inductor de callo fresco a oscuras y temperatura ambiente durante 1 semana antes del cocultivo.

25.3 - Infección y cocultivo con *Agrobacterium*

- 30 Un día antes de la infección con *Agrobacterium*, el callo embriogénico se dividió en trozos de 1 a 2 mm y se colocó en medio inductor de callo que contenía acetosiringona 100 µM. A continuación, a cada trozo de callo se le aplicó una alícuota de 10 µl de suspensión de *Agrobacterium* (LBA4404) (D.O.= 1,0 a 660 nm), seguida de 3 días de cocultivo a oscuras y 25°C.

25.4 - Etapa de reposo y control de *Agrobacterium*

Para la fase de tratamiento con antibiótico, el callo se transfirió y se cultivó durante 2 semanas en un medio inductor de callo con cefotaxima 125 mg/l y carbenicilina 250 mg/l para suprimir el crecimiento bacteriano.

25.5 - Selección e identificación de las colonias potencialmente transgénicas

Después, para la selección, el callo se introdujo en medio inductor de callo dotado de cefotaxima 250 mg/l y fosfotricina (PPT) 10 mg/l durante 8 semanas. Tanto el tratamiento antibiótico como el proceso de selección entero se realizaron a temperatura ambiente y a oscuras. El intervalo de subcultivo durante la selección fue normalmente de 3 semanas.

5 25.6 - Regeneración de plantas transgénicas

Para la regeneración de la planta, los eventos de callos que proliferan en presencia de PPT (resistentes) se colocan primero en medio de regeneración (medio basal MS, sacarosa 30 g/l, mioinositol 100 mg/l, BAP 1 mg/l y Phytigel 2 g/l) complementado con cefotaxima, PPT o higromicina. Estos callos se mantuvieron a oscuras y a temperatura ambiente durante 1 semana y después se emplazaron bajo luz durante 2-3 semanas para el desarrollo de los brotes. No hubo plantas albinas a raíz de la selección con PPT (el uso de higromicina como agente de selección provoca la aparición de muchas plantas albinas).

25.7 - Inducción de raíces y traslado al invernadero

Los pequeños brotes se separaron y se transfirieron a medio de regeneración sin hormonas que contenía PPT y cefotaxima para estimular el enraizamiento al tiempo que se mantenía la presión de selección y se erradicaba cualquier célula superviviente de *Agrobacterium*. Las plántulas con raíces bien desarrolladas (3-5 semanas) se trasladaron a suelo y se cultivaron en invernadero o en el campo.

25.8 - Vernalización y polinización cruzada de las plantas transgénicas

Las plantas transgénicas permanecieron al aire libre en un vivero con medidas de contención (3-6 meses) hasta el solsticio de invierno en diciembre. Las plantas vernalizadas se trasladaron entonces al invernadero y se mantuvieron a 25°C bajo un fotoperíodo de 16/8 h y rodeadas de plantas naturales no transgénicas que las aislaron físicamente de otras fuentes de polen. Las plantas comenzaron a florecer 3-4 semanas después de trasladarlas de nuevo al invernadero. Se fecundaron con el polen de las plantas naturales circundantes. Las semillas recogidas de cada planta transgénica se hicieron germinar en suelo a 25°C, y las plantas T1 se cultivaron en el invernadero para ser analizadas posteriormente.

25.9 - Otras gramíneas diana

Otras gramíneas que pueden ser blanco de la transformación con AAD-1 de acuerdo con la presente invención son: espiguilla (*Poa annua*), pasto bahía, grama de Bermuda, cerillos, bromo, agróstide común (*Agrostis capillaries*), cañamazo, alpiste, zacate amargo, ciempiés, cañuela roja encespigante (*Festuca rubra commutata*), garranchuelo, agróstide estolonífera (*Agrostis stolonifera*), rabillo de zorra (*Koeleria macrantha*), gramalote, festucas, *Festolium*, cañuela de oveja (*Festuca ovina*), navajita pelillo, avenilla, cañota, amor de hortelano, mezclas (equinas, pastos, etc.), gramíneas autóctonas, dactilo, ballico (*Lolium perenne*), agróstide blanca, cebadilla, ballico perenne y ballico de Italia, cañuela roja semirreptante (*Festuca rubra trichophylla*), cañuela (*Poa pratensis*), cintillo, cañuela roja reptante (*Festuca rubra rubra*), pasto del Sudán, pasto varilla, cañuela alta (*Festuca arundinacea*), fleo, aira de césped (*Deschampsia caespitosa*), céspedes diversos, grama y hierba Manila.

Ejemplo 26 - AAD-1 (v3) en colza

26.1 - Transformación de la colza

El gen AAD-1 (v3) que confiere resistencia frente al 2,4-D se usó para transformar plantas de *Brassica napus* var. *Nexera** 710 con *Agrobacterium*. El constructo portador del gen AAD-1 (v3) estaba controlado por un promotor del CsVMV y el gen *Pat* por el promotor AtUbi10.

La superficie de las semillas se esterilizó con lejía comercial al 10% y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. A continuación, se colocaron en medio basal MS diluido a la mitad (Murashige y Skoog, 1962) y se mantuvieron en un régimen de crecimiento a 25°C, con un fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad.

De las plántulas de 5-7 días de edad se cortaron segmentos de hipocótilo (3-5 mm) y se colocaron en medio inductor de callo K1D1 (medio MS con cinetina 1 mg/l y 2,4-D 1 mg/l) durante 3 días como pretratamiento. Los segmentos se transfirieron a continuación a una placa de Petri, donde fueron tratados con las cepas de *Agrobacterium* Z7075 o LBA4404 portadoras del pDAB721. *Agrobacterium* se había cultivado hasta el día siguiente a 28° C en oscuridad con un agitador a 150 rpm y después se resuspendió en el medio de cultivo.

Finalizados los 30 min de tratamiento de los segmentos de hipocótilo con *Agrobacterium*, se volvieron a depositar en medio inductor de callo durante 3 días. Después del cocultivo, los segmentos se colocaron en K1D1TC (medio inductor de callo con carbenicilina 250 mg/l y Timentin 300 mg/l) durante una semana para la recuperación. Otra alternativa consistió en colocar directamente los segmentos en medio de selección K1D1H1 (el medio anterior pero con Herbiace 1 mg/l). La carbenicilina y el Timentin fueron los antibióticos utilizados para matar a *Agrobacterium*. El agente de selección Herbiace permitió el crecimiento de las células transformadas.

Las muestras de callo de 35 eventos independientes se analizaron con PCR. Las 35 muestras arrojaron un resultado

positivo para la presencia de *AAD-1* (v3), mientras que los controles no transformados dieron negativo (apartado del ensayo de PCR). En diez muestras de callo se confirmó la expresión de la proteína *AAD-1* con un ELISA (apartado de análisis de la proteína).

- 5 Los segmentos de hipocótilo transformados en callo se depositaron a continuación en medio de regeneración de brotes B3Z1H1 (medio MS, bencilaminopurina 3 mg/l, zeatina 1 mg/l, MES 0,5 g/l [ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico], nitrato de plata 5 mg/l, Herbiace 1 mg/l, carbenicilina y Timentin). Al cabo de 3 semanas, los brotes comenzaron a regenerarse. Los segmentos de hipocótilo junto con los brotes se transfirieron a medio B3Z1H3 (medio MS, bencilaminopurina 3 mg/l, zeatina 1 mg/l, MES 0,5 g/l [ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico], nitrato de plata 5 mg/l, Herbiace 3 mg/l, carbenicilina y Timentin) durante 3 semanas más.
- 10 Los brotes se separaron de los segmentos de hipocótilo y se transfirieron a medio de elongación de brotes MESH10 (MS, MES 0,5 g/l, Herbiace 10 mg/l, carbenicilina, Timentin) durante 2-4 semanas. Para inducir el enraizamiento, los brotes alargados se cultivaron en MSI.1 (MS con ácido indolbutírico 0,1 mg/l). Una vez las plantas mostraron un sistema radicular bien desarrollado, se plantaron en suelo. Las plantas se cultivaron en condiciones ambientales controladas en una cámara Conviron durante 1-2 semanas antes del traslado al invernadero.
- 15 Las plantas T_0 transformadas se autopolinizaron en el invernadero para obtener las semillas T_1 . Las plantas T_0 y la progenie T_1 fueron pulverizadas con un intervalo de concentraciones de herbicida para averiguar el nivel de protección conferida por el gen *AAD-1* (v3).

26.2 - "Análisis molecular": Materiales de colza y métodos

- 20 **26.2.1 - Recolección del tejido, aislamiento y cuantificación del ADN.** Se colocó tejido fresco en tubos y se liofilizó a 4° C durante 2 días. Una vez completamente seco, se introdujo una perla de tungsteno (Valenite) en el tubo y las muestras de tejido se sometieron durante 1 minuto a molturación en seco en un molino de perlas Kelco. A continuación se procedió a aislar el ADN con el procedimiento DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). Una alícuota del ADN extraído se tiñó con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se leyó en el fluorímetro (BioTek) con patrones conocidos para obtener la concentración en ng/μl.
- 25 **26.2.2 - Reacción en cadena de la polimerasa.** Un total de 100 ng de ADN total se usaron como molde. 20 mM de cada cebador se usaron con el kit Takara Ex Taq PCR Polymerase kit (Mirus TAKRR001A). Los cebadores utilizados para la PCR de la región codificante del *AAD-1* (v3) fueron (Directo-ATGGCTCATG CTGCCCTCAGCC) (SEC ID nº 27) y (Inverso-CGGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEC ID nº 28). La reacción de PCR se llevó a cabo con un termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94° C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, y 72°C durante 2 minutos seguidos por 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron con electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con EtBr. Treinta y cinco muestras de 35 plantas con eventos de *AAD-1* (v3) dieron positivo. Tres muestras de control negativo dieron negativo.
- 30

26.3 - ELISA

- 35 El ELISA descrito en el apartado anterior detectó la proteína *AAD-1* en 10 eventos distintos de transformación de colza. Los niveles de expresión oscilaron entre 150 y más de 1.000 ppm de proteína soluble total (TSP). Tres muestras diferentes de callos sin transformar se analizaron en paralelo sin que se detectara una señal sustancial, lo cual indica que los anticuerpos utilizados en el ensayo presentaban una ínfima reactividad cruzada con la matriz celular de colza. Un resumen de los resultados se presenta en la Tabla 38.

40

Tabla 38. Expresión de la <i>AAD-1</i> en callos de colza.					
nº de muestra	Peso (mg)	[TSP] (μg/mL)	[<i>AAD1</i>] (ng/mL)	Expresión (ppm TSP)	PCR de <i>AAD1</i>
1	114	757,02	119,36	157,67	+
2	55	839,79	131,84	156,99	
3	53	724,41	202,12	279,01	
4	52	629,01	284,89	452,92	+
5	55	521,75	175,88	337,08	+
6	61	707,69	74,24	153,71	+
7	51	642,02	559,11	1026,73	

Tabla 38. Expresión de la AAD-1 en callos de colza.					
nº de muestra	Peso (mg)	[TSP] (µg/mL)	[AAD1] (ng/mL)	Expresión (ppm TSP)	PCR de AAD1
8	65	707,69	270,73	382,56	+
9	51	642,02	197,90	308,25	+
10	51	1417,42	220,63	156,66	+
Control 1	53	2424,67	18,67	7,70	-
Control 2	61	2549,60	35,00	13,73	-
Control 3	59	2374,41	22,79	9,60	-

Referencias bibliográficas

- Adang, M. J., M. J. Stayer, T. A. Rocheleau, J. Leighton, R. F. Barker, and D. V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36:289-300.
- Agrilience Crop Protection Guide. 2003. Agrilience, LLC. St Paul, Minn. 588 p.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein databasesearch programs. *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- An, G., B. D. Watson, S. Stachel, M. P. Gordon, E. W. Nester. 1985. New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4:277-284.
- Armstrong C. L., C. E. Green, R. L. Phillips. 1991. Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genet Coop News Lett* 65:92-93.
- Beltz, G. A., K. A. Jacobs, T. H. Eickbush, P. T. Cherbas, and F. C. Kafatos. 1983 *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100:266-285
- Birch R. G. and T. Franks. 1991. Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:453-469.
- CDMS. Crop Data Management Systems Labels and MSDS. Online. Internet. Mar. 13, 2004. Available at net/manuf/manuf.asp.
- Chee P. P., K. A. Fober, J. L. Slightom. 1989. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 91:1212-1218.
- Cheng M., J. E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C. M. Hironaka, D. R. Duncan, T. W. Conner, and Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115: 971-980.
- Chu C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu, F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18:659-668.
- Clemente T. E., B. J. LaVallee, A. R. Howe, D. Conner-Ward, R. J. Rozman, P. E. Hunter, D. L. Broyles, D. S. Kasten, M. A. Hinchee. 2000. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci* 40: 797-803.
- CPR: Crop Protection Reference. 2003 Chemical and Pharmaceutical Press, New York, N.Y. 2429 p.
- Devine, M. D. 2005. Why are there not more herbicide-tolerant crops? *Pest Manag. Sci.* 61:312-317.
- Dietrich, Gabriele Elfriede (1998) Imidazolinone resistant AHAS mutants. U.S. Pat. No. 5,731,180.
- Didierjean L, L. Gondet, R. Perkins, S. M. Lau, H. Schaller, D. P. O'Keefe, D. Werck-Reichhart. 2002. Engineering Herbicide Metabolism in Tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a Cytochrome P450 Enzyme from Jerusalem Artichoke. *Plant Physiol* 2002, 130:179-189.

- Ditta, G. S. Stranfield, D. Corbin, and D. R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium leililoti*. PNAS 77:7347-7351.
- Edwards, R. A., L. H. Keller, and D. M. Schifferli. 1998. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. Gene 207:149-157.
- 5 Falco S. C., T. Guida, M. Locke, J. Mauvais, C. Sanders, R. T. Ward, P. Webber. 1995. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. Bio/Technology 13:577-582.
- Finer J. and M. McMullen. 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. In Vitro Cell. Dev. Biol. 27P:175-182.
- 10 Fraley, R. T., D. G. Rogers, and R. B. Horsch. 1986. Genetic transformation in higher plants. Crit. Rev. Plant Sci. 4:1-46.
- Frame B. R., P. R. Drayton, S. V. Bagnall, C. J. Lewnau, W. P. Bullock, H. M. Wilson, J. M. Dunwell, J. A. Thompson, and K. Wang. 1994. Production of fertile maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. Plant J. 6:941-948.
- 15 Fukumori, F., and R. P. Hausinger. 1993. Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase. J. Biol. Chem. 268: 24311-24317.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspensions of cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari, and J. A. Hoch. 1983. Cloning structural gene sacB, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 153:1424-1431.
- 20 Gianessi, L. R. 2005 Economic and herbicide use impacts of glyphosate-resistant crops. Pest. Manag. Sci. 61:241-245.
- Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Mar. 18, 2005. Available at weedscience.com.
- 25 Hiei Y., T. Komari, and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Mol. Biol. 35:205-218.
- Hiei, Y., T. Komari (1997) Method for Transforming Monocotyledons. U.S. Pat. No. 5,591,616.
- Hinchee M. A. W., D. V. Conner-Ward, C. A. Newell, R. E. McDonnell, S. J. Sato, C. S. Gasser, D. A. Fischhoff, D. B. Re, R. T. Fraley, R. B. Horsch. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Bio/Technology 6:915-922.
- 30 Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. 1989. Microbiol. Rev. 53:242-255.
- Hoekema, A. 1985. In: *The Binary Plant Vector System*, Offset-drukkerij Kanters B. V., Alblasterdam, Chapter 5.
- 35 Hogan, D. A.; S. R. Smith, E. A. Saari, J. McCracken, R. P. Hausinger. 2000. Site-directed mutagenesis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/ α -ketoglutarate dioxygenase. Identification of residues involved in metallocenter formation and substrate binding. J. Biol. Chem. 275:12400-12409.
- Holsters, M., D. De Waele, A. Depicker, E. Messens, M. Van Montagu, and J. Schell. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 163:181-187.
- Horsch, R., J. Fry, N. Hoffman, J. Neidermeyer, S. Rogers, and R. Fraley. 1988. In Plant Molecular Biology Manual, S. Gelvin *et al.*, eds., Kluwer Academic Publishers, Boston
- 40 Horvath, M., G. Ditzelmüller, M. Lodl, and F. Streichsbier. 1990. Isolation and characterization of a 2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid-degrading soil bacterium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33:213-216.
- Jefferson, R. A. M. Bevan, and T. Kavanagh. 1987. The use of *Escherichia coli* β -glucuronidase gene as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants. Biochem. Soc. Trans. 15: 17-19.
- 45 Karlin, S. and S. F. Altschul. 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. PNAS 87:2264-2268.
- Karlin, S. and S. F. Altschul. 1993. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. PNAS 90:5873-5877

- Keller, G. H., and M. M. Manak. 1987. DNA Probes. Stockton Press, New York, N.Y., pp. 169-170.
- Kohler, H. P. E. 1999. *Sphingobium herbicidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. J. Ind Microbiol and Biotech. 23:336-340.
- 5 Li L, Qu R, Kochko A de, Fauquet C M, Beachy R N (1993) An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Rep 12:250-255
- Linsmaier, E. M. and F. Skoog (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18:100-127.
- Lorraine-Colwill, D. F., S. B. Powles, T. R. Hoawkes, P. H. Hollingshead, S. A. J. Arner, and C. Preston. 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. Pestic. Biochem. Physiol. 74:62-73.
- 10 Luo, H., Q. Hu, K. Nelson, C. Longo, A. P. Kausch, J. M. Chandless, J. K. Wipff and C. R. Fricker. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. Plant Cell Reports 22: 645-652.
- 15 Lyon, B. R., D. J. Llewellyn, J. L. Huppatz, E. S. Dennis, and W. J. Peacock. 1989. Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Plant Mol. Bio. 13:533-540.
- Lyon, B. R., Y. L. Cousins, D. J. Llewellyn, and E. S. Dennis. 1993. Cotton plants transformed with a bacterial degradation gene are protected from accidental spray drift damage by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Transgenic Res. 2: 166-169.
- 20 Maniatis, T., E. F. Fritsch, J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Martin, J. R. and W. W. Witt. 2002. Response of glyphosate tolerant and susceptible biotypes of horseweed (*Conyza canadensis*) to foliar applied herbicides. Proc. North Cent. Weed Sci. Soc. 57:185.
- Martinell B. J., L. S. Julson, C. A. Emler, H. Yong, D. E. McCabe, E. J. Williams. 2002. Soybean *Agrobacterium* transformation method. U.S. Patent Application No. 6384301
- 25 McCabe D. E., W. F. Swain, B. J. Martinell, P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/Technology 6:923-926.
- Miller S. D., P. W. Stahlman, P. Westra, G. W. Wicks, R. G. Wilson, J. M. Tichota. 2003. Risks of weed spectrum shifts and herbicide resistance in glyphosate-resistant cropping systems. Proc. West. Soc. Weed Sci. 56:61-62.
- 30 Muller R, S. Jorks, S. Kleinsteuber, W. Babel. 1999. *Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. Microbiol. Res. 154:241-246.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- 35 Murphy G. P., T. E. Dutt, R. F. Montgomery, T. S. Willard, G. A. Elmore. 2002. Control of horseweed with glyphosate. Proc. North Cent. Weed Sci. Soc. 57:194.
- Ng, C. H., R. Wickneswari, S. Salmigah, Y. T. Teng, and B. S. Ismail. 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. Weed Res. 43:108-115.
- Olhoft P. M. and D. A. Somers. 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 706-711
- 40 Olhoft, P. M., L. E. Flagel, C. M. Donovan, and D. A. Somers. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. Planta 216:723-735
- Padgett S. R., K. H. Kolacz, X. Delannay, D. B. Re, B. J. LaVallee, C. N. Tinius, W. K. Rhodes, Y. I. Otero, G. F. Barry, D. A. Eichholtz, V. M. Peschke, D. L. Nida, N. B. Taylor, and G. M. Kishore. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Sci. 1995; 35:1451-1461.
- 45 Parrott W. A., J. N. Ali, M. J. Adang, M. A. Bailey, H. R. Boerma, and C. N. Stewart, Jr. 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. In Vitro Cell. Dev. Biol. 30P:144-149.
- Popelka, J. C. and F. Altpeter 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereale* L) Mol. Breed. 11:203-211

- Saari, R. E., D. A. Hogan, and R. P. Hausinger. 1999. Stereospecific degradation of the pheonxypropionate herbicide dichlorprop. *J. Mol. Catal. B: Enz.* 6:421-428.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sick Cell Anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2000. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schenk, R. U. and A. C. Hildebrandt (1972) Methods and techniques for induction and growth of monocotyledenous and dicotyledenous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
- Sfiligoj, E. 2004. Spreading resistance. *Crop Life*. March issue.
- Simarmata, M., J. E. Kaufmann, and D. Penner. 2003. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 51:678-682.
- Singh R. J., T. M. Klein, C. J. Mauvais, S. Knowlton, T. Hymowitz, C. M. Kostow. Cytological characterization of transgenic soybean. *Theor. Appl. Genet.* 1998; 96:319-324.
- Smejkal, C. W., T. Vallaey, S. K. Burton, and H. M. Lappin-Scott. 2001. Substrate specificity of chlorophenoxyalkanoic acid-degrading bacteria is not dependent upon phylogenetically related *tfdA* gene types. *Biol. Fertil. Sols* 33:507-513.
- Streber, W. and L. Willmitzer. 1989. Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. *Bio/Technology* 7:811-816.
- Streber, W. R., K. N. Timmis, and M. H. Zenk. 2000. Microorganisms and plasmids for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) monooxygenase formation and process for the production of these plasmids and strains. U.S. Pat. No. 6,153,401.
- Streber, W. R., K. N. Timmis, and M. H. Zenk. 1987. Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenylacetic monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J. Bacteriol.* 169:2950-2955.
- Suggs, S. V., T. Miyake, E. H. Kawashima, M. J. Johnson, K. Itakura, and R. B. Wallace. 1981. *ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes*, D. D. Brown [ed.], Academic Press, New York, 23:683-693.
- Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, W. Mingbo, S. Thornton, and R. Bretell. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11:1369-1376.
- Weigel, D. and J. Glazebrook. 2002. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 358 pp.
- Weising, K., J. Schell, and G. Kahl. 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477.
- Welter, M. E., D. S. Clayton, M. A. miler, and J. F. Petolino. 1995. Morphotypes of friable embryogenic maize callus. *Plant Cell Rep.* 14:725-729.
- Westendorf A., D. Benndorf, R. Muller, W. Babel. 2002. The two enantiospecific dichlorprop/ α -ketoglutarate-dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1-protein and sequence data of RdpA and SdpA. *Microbiol. Res.* 157:317-22.
- Westendorf, A., R. H. Muller, and W. Babel. 2003. Purification and characterization of the enantiospecific dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1 initiating the degradation of phenoxypropionates and phenoxyacetate herbicides. *Acta Biotechnol.* 23: 3-17.
- WSSA. 2002. *Herbicide Handbook* (8th ed). Weed Science Society of America. Lawrence, K S 492 pp.
- Zeng P, D. Vadnais, Z. Zhang, and J. Polacco. 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Rep.* 22: 478-482.
- Zhang S (1995) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. *Plant Cell Rep* 15:68-71
- Zhang S, Chen L, Qu R, Marmey P, Beachy R N, Fauquet C M (1996) Efficient plant regeneration from indica (group

1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. Plant Cell Rep 15:465-469.

Zhang S, Song W, Chen L, Ruan D, Taylor N, Ronald P, Beachy R N, Fauquet C M (1998) Transgenic elite Indica rice varieties, resistant to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Mol Breed 4:551-558.

5 Zhang, Z., A. Xing, P. E. Staswick, and T. E. Clemente. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture 56:37-46.

Zhao, Z. Y., T. Cai, L. Tagliani, M. Miller, N. Wang, H. Pang, M. Rudert, S. Schroeder, D. Hondred, J. Seltzer, and D. Pierce. 2000. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation, Plant Mol. Biol. 44:789-798.

10 Zipper, C., M. Bunk, A. Zehnder, H. Kohler. 1998. Enantioselective uptake and degradation of the chiral herbicide dichlorprop [(RS)-2-(2,4-dichlorophenoxy)propanoic acid] by *Sphingobium herbicidovorans* MH. J. Bact. 13:3368-3374

Listado de secuencias

<110> Dow AgroSciences LLC

<120> NUEVOS GENES DE RESISTENCIA A HERBICIDAS

<130> DAS-115XC1

15 <150> US 60/567,052

<151> 2004-04-30

<160> 32

<170> Patentln version 3.2

<210> 1

20 <211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo utilizado para amplificar el gen rdpA/AAD-1 (v1)

25 <400> 1

tctagaagga gatataccat gcatgctgca ctgtccccc tctcccagcg 50

<210> 2

<211> 38

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso utilizado para amplificar el gen rdpA/AAD-1 (v1)

<400> 2

ctcgagttac tagcgcgccg ggcgcacgcc accgaccg 38

35 <210> 3

<211> 915

<212> ADN

<213> *Sphingobium herbicidovorans*

<220>

<221> misc_feature D
 <222> (1)..(18)
 <223> Conector del cebador
 <220>

5 <221> misc_feature
 <222> (907)..(915)
 <223> Conector del cebador
 <400> 3

tctagaagga gatataccat gcatgctgca ctgtccccc tctcccagcg ctttgagcgc 60
 10 atcgcggtcc agcgcgtgac cggcgctcctg ggcgcgcgaga tcaccggcgt cgacctgcgc 120
 gagccgctcg acgacagcac ctggaacgaa atcctcgacg cgttcacac ttaccaggtc 180
 atctattttc ccggccaggc gatcaccaac gaacagcaca tcgccttcag ccggcgcttc 240
 ggccccgtcg atcccgtgcc cctgctcaag agcatcgaag ggtatccaga ggtgcagatg 300
 atccgccgcg aagccaacga aagcgggcgt gtgatcggtg aygactggca caccgacagc 360
 15 accttctctg acgcaccgcc ggccgcgcgtg gtgatgcgcg cgatcgacgt gcccgagcat 420
 ggcggcgcaca ccggttttct gagcatgtac accgcgtggg agacgctgtc gccaccatg 480
 caggccacca tcgaagggtt gaacgtagtg cacagcgcca cgcgtgtgtt cggctcgctc 540
 taccaggccc agaaccggcg cttcagcaac accagcgtca aggtgatgga cgtcgacgcg 600
 ggcgaccgtg aaaccgtgca cccctcgttg gtgaccatc cgggcagcgg ccgcaagggc 660
 20 ctgtacgtga accaggtcta ttgccagcgc atcgagggca tgaccgatgc cgaaagcaaa 720
 ccgctgctgc agttcctgta cgagcatgcg acacggttcg atttcacctg ccgcgtgcgc 780
 tggaagaagg accaggtcct ggtctgggac aacctgtgca cgatgcaccg ggccgtaccc 840
 gactacgcgg gcaagttccg ctacctgacg cgcaccacgg tcggtggcgt gcgcccggcg 900
 cgctagtaac tcgag 915

25 <210> 4
 <211> 897
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

30 <223> AAD-1 (v2) secuencia primaria
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) . . (2)
 <223> conector del cebador

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (891)..(897)

ES 2 389 843 T3

<223> conector del cebador

<400> 4

ccatggctgc tgcactgtcc cccctctccc agcgctttga gcgcatcgcg gtccagccgc 60

tgaccggcgt cctgggcgcc gagatcacccg gcgtcgacct gcgcgagccg ctcgacgaca 120

5 gcacctggaa cgaaatcctc gacgcgttcc acacttacca ggtcatctat tttcccgcc 180

aggcgatcac caacgaacag cacatcgctt tcagccggcg cttcgcccc gtcgatcccc 240

tgcccctgct caagagcatc gaagggtatc cagaggtgca gatgatccgc cggaagcca 300

acgaaagcgg gcgtgtgac ggtgatgact ggacacccga cagcaccttc ctggacgcac 360

cgccggccgc cgtggtgatg cgcgcgatcg acgtgccga gcatggcggc gacaccggtt 420

10 tttctgagcat gtacaccgcg tgggagacgc tgtcgccac catgcaggcc accatcgaag 480

ggttgaacgt agtgcacagc gccacgcgtg tgttcggctc gctctaccag gccagaacc 540

ggcgcttcag caacaccagc gtcaagggtga tggacgtcga cgcgggcgac cgtgaaaccg 600

tgcacccctt ggtggtgacc catccgggca gcggtgcaa gggcctgtac gtgaaccagg 660

tctattgcca gcgcatcgag ggcatgaccg atgccgaaag caaacgctg ctgcagttcc 720

15 tgtacagca tgcgacacgg ttcgatttca cctgccgcgt gcgctggaag aaggaccagg 780

tcctggtctg ggacaacctg tgacgatgc accgggccgt acccgactac gcgggcaagt 840

tccgtacct gacgcgcacc acggtcgggt gcgtgcgccc ggcgcgctag tgagctc 897

<210> 5

<211> 919

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AAD-1 (v3) secuencia primaria

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> conector del cebador

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (6)..(8)

<223> codón de alanina adicional (GCT)

<220>

<221> misc_feature

<222> (894)..(919)

35 <223> conector del cebador

<400> 5

ccatggctca tgctgccctc agccctctct cccaacgctt tgagagaata gctgtccagc 60

ES 2 389 843 T3

cactcactgg tgtccttggt gctgagatca ctggagtgga cttgagggaa ccacttgatg 120
 acagcacctg gaatgagata ttggatgcct tccacactta ccaagtcac tactttcctg 180
 gccaaagcaat caccaatgag cagcacattg cattctcaag aaggtttgga ccagttgatc 240
 cagtgcctct tctcaagagc attgaaggct atccagaggt tcagatgatc cgcagagaag 300
5 ccaatgagtc tggaagggtg attggtgatg actggcacac agactccact ttccttgatg 360
 cacctccagc tgctgttggt atgagggcca tagatgttcc tgagcatggc ggagacactg 420
 ggttcctttc aatgtacaca gcttgggaga ccttgtctcc aaccatgcaa gccaccatcg 480
 aagggctcaa cgttgtgcac tctgccacac gtgtgttcgg ttcctctac caagcacaga 540
 accgtcgctt cagcaacacc tcagtcaagg tgatggatgt tgatgctggt gacagagaga 600
10 cagtccatcc cttggttggt actcatcctg gctctggaag gaaaggcctt tatgtgaatc 660
 aagtctactg tcagagaatt gagggcatga cagatgcaga atcaaagcca ttgcttcagt 720
 tcctctatga gcatgccacc agatttgact tcacttgccg tgtgaggtgg aagaaagacc 780
 aagtccttgt ctgggacaac ttgtgcacca tgcaccgtgc tgttcctgac tatgctggca 840
 agttcagata cttgactcgc accacagttg gtggagttag gcctgccgcg tgagtagtta 900
15 gcttaatcac ctagagctc 919
 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
20 <220>
 <223> cebador 5' rdpA(ncoI)
 <400> 6
 cccatggctg ctgcactgtc cccctctcc 30
 <210> 7
25 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador 3'saci
30 <400> 7
 gagctcacta gcgcgccggg cgcacgccac cga 33
 <210> 8
 <211> 36
 <212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 5' cebador BstEII/ Del NotI

ES 2 389 843 T3

<400> 8

tggtggtgac ccatccgggc agcggctgca agggcc 36

<210> 9

<211> 295

5 <212> PRT

<213> Sphingobium herbicidovorans

<400> 9

Met	His	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Glu	Arg	Ile	Ala
1				5					10					15	

ES 2 389 843 T3

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

ES 2 389 843 T3

```

<210> 10
<211> 295
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> AAD-1 v2 traducción
<220>
<221> MIS C_FEATURE
<222> (2)..(2)
10 <223? Diferente de v1
<220>
<221> MIS C_FEATURE
<222> (212)..(212)
<223> Diferente de v1
15 <400> 10
Met Ala Ala Ala Leu Ser Pro Leu Ser Gln Arg Phe Glu Arg Ile Ala
1 5 10 15
Val Gln Pro Leu Thr Gly Val Leu Gly Ala Glu Ile Thr Gly Val Asp
20 25 30
Leu Arg Glu Pro Leu Asp Asp Ser Thr Trp Asn Glu Ile Leu Asp Ala
35 40 45
Phe His Thr Tyr Gln Val Ile Tyr Phe Pro Gly Gln Ala Ile Thr Asn
50 55 60
Glu Gln His Ile Ala Phe Ser Arg Arg Phe Gly Pro Val Asp Pro Val
65 70 75 80
Pro Leu Leu Lys Ser Ile Glu Gly Tyr Pro Glu Val Gln Met Ile Arg
85 90 95
Arg Glu Ala Asn Glu Ser Gly Arg Val Ile Gly Asp Asp Trp His Thr
100 105 110

```

ES 2 389 843 T3

Asp Ser Thr Phe Leu Asp Ala Pro Pro Ala Ala Val Val Met Arg Ala
 115 120 125
 Ile Asp Val Pro Glu His Gly Gly Asp Thr Gly Phe Leu Ser Met Tyr
 130 135 140
 Thr Ala Trp Glu Thr Leu Ser Pro Thr Met Gln Ala Thr Ile Glu Gly
 145 150 155 160
 Leu Asn Val Val His Ser Ala Thr Arg Val Phe Gly Ser Leu Tyr Gln
 165 170 175
 Ala Gln Asn Arg Arg Phe Ser Asn Thr Ser Val Lys Val Met Asp Val
 180 185 190
 Asp Ala Gly Asp Arg Glu Thr Val His Pro Leu Val Val Thr His Pro
 195 200 205
 Gly Ser Gly Cys Lys Gly Leu Tyr Val Asn Gln Val Tyr Cys Gln Arg
 210 215 220
 Ile Glu Gly Met Thr Asp Ala Glu Ser Lys Pro Leu Leu Gln Phe Leu
 225 230 235 240
 Tyr Glu His Ala Thr Arg Phe Asp Phe Thr Cys Arg Val Arg Trp Lys
 245 250 255
 Lys Asp Gln Val Leu Val Trp Asp Asn Leu Cys Thr Met His Arg Ala
 260 265 270
 Val Pro Asp Tyr Ala Gly Lys Phe Arg Tyr Leu Thr Arg Thr Thr Val
 275 280 285
 Gly Gly Val Arg Pro Ala Arg
 290 295

<210> 11

<211> 296

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> AAD-1 v3 traducción

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (2)..(3)

<223> Diferente de VI

<400> 11

ES 2 389 843 T3

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

ES 2 389 843 T3

Leu Tyr Glu His Ala Thr Arg Phe Asp Phe Thr Cys Arg Val Arg Trp
245 250 255

Lys Lys Asp Gln Val Leu Val Trp Asp Asn Leu Cys Thr Met His Arg
260 265 270

Ala Val Pro Asp Tyr Ala Gly Lys Phe Arg Tyr Leu Thr Arg Thr Thr
275 280 285

Val Gly Gly Val Arg Pro Ala Arg
290 295

<210> 12

<211> 888

<212> ADN

5 <213> Bradyrhizobium japonicum USDA 110

<400> 12

atgacgatcg ccatccggca gcttcagacg cattttgtcg gccaggtttc cggcctcgat 60
ttgcgaaagc cgctcacgcc gggcgaggcc cgcgaggtcg agtccgccat ggacaaatac 120
gcggtgctcg ttttccacga ccaggacatc accgacgagc agcagatggc tttcgcgctg 180
10 aacttcggcc agcgcgagga cgcgcgcggc ggacaggtca ccaaggagaa ggactaccgg 240
ctgcaatccg gcttgaacga cgtctccaat ctgcgcaagg acggcaagcc gctggccaag 300
gacagccgca cgcacctgtt caatctcggc aactgcctct ggactocga cagctcgttc 360
cgtcccattc ccgcaaaatt ctgctgctg tcggcgcgcg tggatgaacc gacgggcggc 420
aacaccgaat tcgcggacat cgcgcgcgcc tatgacgcgc tcgacgacga gaccaaggcc 480
15 gaaatcgagg acctcgtctg cgagcactcg ctgatgtatt cgcgcggctc gctcggcttc 540
accgagtaca ccgacgaaga gaagcagatg ttcaagccgg tcctgcaacg cctcgtgcgc 600
acccatccgg tccaccgccg caagtcgctg tatctctcgt cgcacgccgg caagatcgcc 660
agcatgagcg tgccggaggg gcggtgctg ttgcgcgac tcaacgagca cgcgacgcag 720
ccggaattcg tctacgtcca caaatggaag ctgcatgacc tcgtgatgtg ggacaaccgc 780
20 cagaccatgc accgcgtccg ccgtacgac cagtcccagc ccgcgcgacat gcgccgcgcg 840
acggtggcgg ggacggagcc gacggtgcag cagcaggcgg cggagtag 888

<210> 13

<211> 289

<212> PRT

25 <213> Bradyrhizobium japonicum USDA 110

<400> 13

ES 2 389 843 T3

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

ES 2 389 843 T3

Pro Glu Phe Val Tyr Val His Lys Trp Lys Leu His Asp Leu Val Met
245 250 255

Trp Asp Asn Arg Gln Thr Met His Arg Val Arg Arg Tyr Asp Gln Ser
260 265 270

Gln Pro Arg Asp Met Arg Arg Ala Thr Val Ala Gly Thr Glu Pro Thr
275 280 285

Val

<210> 14

<211> 34

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> brjap 5' (spel)

<400> 14

actagtaaca aagaaggaga tataccatga cgat 34

10 $\langle 210 \rangle$ 15

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> br jap 3' (xhol)

<400> 15

ttctcgagct atcactccgc cgcctgctgc tgc 33

<210> 16

<211> 17

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cebador directo M13

<400> 16

25 gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 17

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador inverso M13

ES 2 389 843 T3

<400> 17
caggaacag ctatgac 17

<210> 18

<211> 32

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> NcoI de Brady

<400> 18

10 tataccacat gtcgatgcc atccggcagc tt 32

<210> 19

<211> .33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> SacI de Brady

<400> 19

gagctcctat cactccgccg cctgctgctg cac 33

<210> 20

20 <211> 525

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 20

Met Ala Gln Val Ser Arg Val His Asn Leu Ala Gln Ser Thr Gln Ile
1 5 10 15

Phe Gly His Ser Ser Asn Ser Asn Lys Leu Lys Ser Val Asn Ser Val
20 25 30

Ser Leu Arg Pro Arg Leu Trp Gly Ala Ser Lys Ser Arg Ile Pro Met
35 40 45

His Lys Asn Gly Ser Phe Met Gly Asn Phe Asn Val Gly Lys Gly Asn
50 55 60

Ser Gly Val Phe Lys Val Ser Ala Ser Val Ala Ala Ala Glu Lys Pro
65 70 75 80

Ser Thr Ser Pro Glu Ile Val Leu Glu Pro Ile Lys Asp Phe Ser Gly
85 90 95

Thr Ile Thr Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
100 105 110

ES 2 389 843 T3

Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Tyr
 115 120 125

Ser Glu Asp Ile His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 130 135 140

Arg Val Glu Asp Asp Lys Thr Thr Lys Gln Ala Ile Val Glu Gly Cys
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Phe Pro Thr Ser Lys Glu Ser Lys Asp Glu Ile Asn Leu
 165 170 175

Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val
 180 185 190

Val Ala Ala Gly Gly Asn Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg
 195 200 205

Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Ala Gly Leu Lys Gln Leu
 210 215 220

Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg
 225 230 235 240

Val Asn Gly Lys Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly
 245 250 255

Ser Val Ser Ser Gln Tyr Leu Thr Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu
 260 265 270

Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Val Asp Lys Leu Ile Ser Val
 275 280 285

Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Ser
 290 295 300

Val Glu His Ser Gly Asn Trp Asp Arg Phe Leu Val His Gly Gly Gln
 305 310 315 320

Lys Tyr Lys Ser Pro Gly Asn Ala Phe Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser
 325 330 335

Ala Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Ile Thr
 340 345 350

ES 2 389 843 T3

Val Asn Gly Cys Gly Thr Ser Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala
355 360 365

Glu Val Leu Glu Lys Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Ser Glu Asn Ser
370 375 380

Val Thr Val Ser Gly Pro Pro Arg Asp Phe Ser Gly Arg Lys Val Leu
385 390 395 400

Arg Gly Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr
405 410 415

Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asn Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp
420 425 430

Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys
435 440 445

Thr Glu Leu Arg Lys Leu Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr
450 455 460

Cys Val Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr
465 470 475 480

Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Gly
485 490 495

Asp Val Pro Val Thr Ile Lys Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe
500 505 510

Pro Asp Tyr Phe Glu Val Leu Glu Arg Leu Thr Lys His
515 520 525

<210> 21

<211> 525

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína EPSPS de soja con dos mutaciones: la treonina 183 se convierte en isoleucina y la prolina 187 se convierte en serina

<400> 21

Met Ala Gln Val Ser Arg Val His Asn Leu Ala Gln Ser Thr Gln Ile
1 5 10 15

Phe Gly His Ser Ser Asn Ser Asn Lys Leu Lys Ser Val Asn Ser Val
20 25 30

ES 2 389 843 T3

Ser Leu Arg Pro Arg Leu Trp Gly Ala Ser Lys Ser Arg Ile Pro Met
35 40 45

His Lys Asn Gly Ser Phe Met Gly Asn Phe Asn Val Gly Lys Gly Asn
50 55 60

Ser Gly Val Phe Lys Val Ser Ala Ser Val Ala Ala Ala Glu Lys Pro
65 70 75 80

Ser Thr Ser Pro Glu Ile Val Leu Glu Pro Ile Lys Asp Phe Ser Gly
85 90 95

Thr Ile Thr Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
100 105 110

Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Tyr
115 120 125

Ser Glu Asp Ile His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
130 135 140

Arg Val Glu Asp Asp Lys Thr Thr Lys Gln Ala Ile Val Glu Gly Cys
145 150 155 160

Gly Gly Leu Phe Pro Thr Ser Lys Glu Ser Lys Asp Glu Ile Asn Leu
165 170 175

Phe Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala Val
180 185 190

Val Ala Ala Gly Gly Asn Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg
195 200 205

Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Ala Gly Leu Lys Gln Leu
210 215 220

Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg
225 230 235 240

Val Asn Gly Lys Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly
245 250 255

Ser Val Ser Ser Gln Tyr Leu Thr Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu
260 265 270

ES 2 389 843 T3

Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Val Asp Lys Leu Ile Ser Val
275 280 285

Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Ser
290 295 300

Val Glu His Ser Gly Asn Trp Asp Arg Phe Leu Val His Gly Gly Gln
305 310 315 320

Lys Tyr Lys Ser Pro Gly Asn Ala Phe Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser
325 330 335

Ala Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Ile Thr
340 345 350

Val Asn Gly Cys Gly Thr Ser Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala
355 360 365

Glu Val Leu Glu Lys Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Ser Glu Asn Ser
370 375 380

Val Thr Val Ser Gly Pro Pro Arg Asp Phe Ser Gly Arg Lys Val Leu
385 390 395 400

Arg Gly Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr
405 410 415

Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asn Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp
420 425 430

Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys
435 440 445

Thr Glu Leu Arg Lys Leu Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr
450 455 460

Cys Val Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr
465 470 475 480

Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Gly
485 490 495

Asp Val Pro Val Thr Ile Lys Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe
500 505 510

Pro Asp Tyr Phe Glu Val Leu Glu Arg Leu Thr Lys His
515 520 525

<210> 22

<211> 1604

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN adaptada a la soja que codifica la EPSPS con dos mutaciones mostrada en la SEC ID N.º 21, con secuencia añadida

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (1) . . (1575)

<223> Secuencia codificante de la secuencia de ADN adaptada a la soja que codifica la proteína EPSPS de la SEC ID N.º 21

<220>

10 <221> misc_feature .

<222> (1576) . . (1578)

<223> Codón terminador de la traducción TGA

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (1579)..(1604)

<223> Secuencia incluida para introducir codones de terminación de la traducción en los seis marcos abiertos de lectura, y para introducir una diana para la enzima de restricción SacI para las operaciones de clonación

<400> 22

20 atggetcaag tctcccggtg tcacaatctt gctcagtcaa cccaaatctt tggacattca 60
agcaactcaa acaaactgaa gtctgtgaat tctgtctcac ttgccccacg cctttgggga 120
gcatccaaga gtcgcatacc aatgcacaag aatgggagtt tcatgggcaa ctccaatggt 180
gggaaaggca attctggtgt cttcaaagtt tcagcttctg ttgcagccgc agagaaaccc 240
agcacttccc ctgagattgt tcttgaaccc attaaggact tcagtggaaac aatcactctg 300

25 cctggatcaa agagtctttc aaacagaata cttctcttgg cagctctgag tgaaggaaacc 360
actgtagttg acaacctttt gtactctgaa gatattcatt acatgttggg tgctctcaga 420
actcttgggt tgagagttga agatgacaag accacaaaac aagccatagt tgaaggatgt 480
ggtgggttgt ttccaacaag caaagaatcc aaagatgaga tcaacttggt tcttggcaat 540
gctggaattg caatgagaag cctcactgct gcagtagttg cagctggtgg gaatgcaagt 600

30 tatgtccttg atggtgtccc cagaatgagg gaaaggccca tcggtgacct tgtggctggc 660
ctgaaacagc ttggagcaga tgttgattgc ttcttgggca caaactgccc tccagtgaga 720
gtgaatggga agggagggtt gcctgggtga aaggtcaaac tgagtggatc agtctcttcc 780
cagtatctga ctgccttgct catggctgcc cctctggcct tgggtgatgt ggagattgaa 840
atagtggaca agttgatttc tgttccatat gtggaaatga ccctcaaact catggagagg 900

35 tttggagttt ctgttgaaca ttctggcaac tgggatcggt tccttgtaca tggaggtcag 960
aagtacaaaa gccctggcaa tgcctttggt gaaggggatg caagctctgc ttcctatctc 1020
ttggctgggg ctgccatcac tgggtgggacc atcacfcgtga atggctgtgg cacctcatcc 1080

ES 2 389 843 T3

cttcaagggtg atgtaaagtt tgcagaggtc ttggagaaaa tgggtgccaa ggtcacctgg 1140
 tctgagaaca gtgtaactgt gtctggacct cccagagact tcagtggcag aaagggttctc 1200
 cgtggaattg atgtgaacat gaacaagatg ccagatgtgg ccatgaccct cgctgttgta 1260
 gccctgtttg caaatggacc aactgcaatc cgtgatgttg cttcatggag ggtgaaggag 1320
5 acagagagga tgattgccat ttgcacagaa ctccgcaaac ttggtgcaac agtgaagag 1380
 ggaccagatt actgtgtgat aaccccacct gagaagctca atgtgacagc cattgacacc 1440
 tatgatgacc acagaatggc aatggctttc tcccttgctg cctgtggtga tgtgcctgtg 1500
 actatcaaag accctgggtg cacaaggaag acatttccag actactttga agttttggag 1560
 aggttgacaa agcactgagt agttagctta atcacctaga gctc 1604

10 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

15 <223> Cebador Pat 5-3
 <400> 23
 agataccctt ggttggttgc 20
 <210> 24
 <211> 20

20 <212> AND
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Pat 3-3
 <400> 24

25 cagatggatc gtttgaagg • 20
 <210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador directo AAD-1 PTU
 <400> 25
 ataatgccag cctgttaaac gcc 23
 <210> 26

35 <211> 23
 <212> AND
 <213> Secuencia artificial

ES 2 389 843 T3

<220>
 <223> Cebador inverso AAD-1 PTU
 <400> 26
 ctcaagcata tgaatgacct cga 23
 5 <210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Cebador directo utilizado para la PCR de la región codificante del AAD-1
 (RdpAcodF)
 <400> 27
 atggctcatg ctgccctcag cc 22
 <210> 28
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso utilizado para la PCR de la región codificante del AAD-1
 20 (RdpAcodR)
 <400> 28
 cgggcaggcc taactccacc aa 22
 <210> 29
 <211> 932
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> AAD-2 v2 con nucleótidos optimizados para vegetales
 <400> 29
 30 ccatggctac catagcaatc agacagctcc agaccactt tgtgggtcaa gtttctggat 60
 tggacctcag aaagccactc actcctggag aagccagaga agttgaatca gctatggaca 120
 agtacgcagt tcttgtcttc catgaccaag acatcacaga tgagcaacag atggcctttg 180
 ccctcaactt tggtcagagg gaggatgcac gtggtggcac tgtcaccaaa gagaaggatt 240
 accgtcttca gtctggcctc aatgatgttt ccaacttggg caaagatgga aagccacttg 300
 35 ccaaggacag cgcaccccat ttgttcaacc ttggaaactg cttgtggcat tctgactcca 360
 gcttcagacc aatcccagcc aagttcagcc tcctttctgc tcgtgttgtg aacccaactg 420
 'gtgggaacac tgagtttgct gacatgagag ctgcctatga tgctcttgac gatgaaacca 480

ES 2 389 843 T3

aagctgagat tgaggacctt gtgtgtgagc actctctcat gtactcaagg ggctcacttg 540
gcttcactga gtacacagat gaagagaagc aaatgttcaa gcccgtcttg cagcgcttgg 600
tccgcacaca ccctgtgcac cgtcgcaaat cactctacct ctccagccat gccggaaaga 660
ttgccagcat gtccgtccct gaaggaggc tccttttgag ggatttgaat gaacatgcta 720
5 ctcagcctga gttcgtctat gttcacaaat ggaagttgca tgatcttgtg atgtgggaca 780
ataggcaaac catgcacaga gtgaggagat atgaccagtc ccaacccaga gacatgcgcc 840
gtgcaacagt tgctgggacc gagcccacag tgcaacagca agcagcagag tgagtagtta 900
gcttaatcac ctagagctcg gtcaccagat ct 932

<210> 30

10 <211> 296

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína AAD-2 v2 traducida

15 <400> 30

Met Ala Thr Ile Ala Ile Arg Gln Leu Gln Thr His Phe Val Gly Gln
1 5 10 15

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

Glu Val Glu Ser Ala Met Asp Lys Tyr Ala Val Leu Val Phe His Asp
35 40 45

Gln Asp Ile Thr Asp Glu Gln Gln Met Ala Phe Ala Leu Asn Phe Gly
50 55 60

Gln Arg Glu Asp Ala Arg Gly Gly Thr Val Thr Lys Glu Lys Asp Tyr
65 70 75 80

Arg Leu Gln Ser Gly Leu Asn Asp Val Ser Asn Leu Gly Lys Asp Gly
85 90 95

Lys Pro Leu Ala Lys Asp Ser Arg Thr His Leu Phe Asn Leu Gly Asn
100 105 110

Cys Leu Trp His Ser Asp Ser Ser Phe Arg Pro Ile Pro Ala Lys Phe
115 120 125

ES 2 389 843 T3

Ser Leu Leu Ser Ala Arg Val Val Asn Pro Thr Gly Gly Asn Thr Glu
130 135 140

Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Asp Glu Thr Lys
145 150 155 160

Ala Glu Ile Glu Asp Leu Val Cys Glu His Ser Leu Met Tyr Ser Arg
165 170 175

Gly Ser Leu Gly Phe Thr Glu Tyr Thr Asp Glu Glu Lys Gln Met Phe
180 185 190

Lys Pro Val Leu Gln Arg Leu Val Arg Thr His Pro Val His Arg Arg
195 200 205

Lys Ser Leu Tyr Leu Ser Ser His Ala Gly Lys Ile Ala Ser Met Ser
210 215 220

Val Pro Glu Gly Arg Leu Leu Leu Arg Asp Leu Asn Glu His Ala Thr
225 230 235 240

Gln Pro Glu Phe Val Tyr Val His Lys Trp Lys Leu His Asp Leu Val
245 250 255

Met Trp Asp Asn Arg Gln Thr Met His Arg Val Arg Arg Tyr Asp Gln
260 265 270

Ser Gln Pro Arg Asp Met Arg Arg Ala Thr Val Ala Gly Thr Glu Pro
275 280 285

Thr Val Gln Gln Gln Ala Ala Glu
290 295

<210> 31

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo para la PCR del fragmento de Southern de AAD-1

<400> 31

atggctcatg ctgccctcag cc 22

10 <210> 32

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador directo para la PCR del fragmento de Southern de AAD-1

ES 2 389 843 T3

<400> 32

gggcaggcct aactccacca a 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Célula vegetal transgénica que comprende un polinucleótido que codifica una proteína AAD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 9 o una variante de la SEC ID nº 9 en la que dicha variante presenta actividad ariloxialcanoato dioxigenasa, por lo menos una delección de aminoácido o una sustitución conservada, y una identidad de secuencia de por lo menos 95% con la SEC ID nº 9.
2. Célula según la reivindicación 1, en la que dicha célula vegetal es seleccionada de entre el grupo constituido por células de dicotiledóneas y células de monocotiledóneas.
- 10 3. Célula según la reivindicación 2, en la que dicha célula vegetal es dicotiledónea y seleccionada de entre el grupo constituido por una célula de algodón, una célula de tabaco, una célula de colza, una célula de soja y una célula de *Arabidopsis*.
4. Célula según la reivindicación 2, en la que dicha célula vegetal es una célula de monocotiledónea seleccionada de entre el grupo constituido por una célula de arroz y una célula de maíz.
- 15 5. Planta transgénica que comprende una pluralidad de células según la reivindicación 1, en la que la expresión de dicho polinucleótido convierte a dichas células en tolerantes a un herbicida ariloxialcanoato.
6. Planta según la reivindicación 5, en la que dicho herbicida es un herbicida auxínico fenoxi o ariloxifenoxipropionato.
- 20 7. Planta según la reivindicación 5 ó 6, en la que la planta es asimismo resistente a uno o más herbicidas seleccionados de entre el grupo constituido por glifosato, imidazolinonas, glufosinato, sulfonilureas, bromoxinilo y dicamba.
8. Planta según la reivindicación 5, en la que dicho herbicida es seleccionado de entre el grupo constituido por ácido 2,4-diclorofenoxiacético, MCPA, diclorprop, mecoprop, fluazifop, haloxifop, diclofop, quizalofop, fenoxaprop, metamifop, cihalofop y clodinofof.
- 25 9. Planta según la reivindicación 5, en la que la expresión de dicho polinucleótido convierte a dicha planta en resistente tanto a un herbicida auxínico fenoxi como a un herbicida ariloxifenoxipropionato.
10. Planta según la reivindicación 5, en la que dicha planta comprende además un segundo gen de resistencia a herbicida.
11. Planta según la reivindicación 10, en la que dicho segundo gen de resistencia a herbicida convierte a dicha planta en resistente al glifosato.
- 30 12. Planta según la reivindicación 10, en la que dicho herbicida ariloxialcanoato es el 2,4-D y dicho segundo gen de resistencia a herbicida convierte a dicha planta en resistente al glifosato.
13. Planta según la reivindicación 5, en la que dicha planta comprende además un gen de resistencia a insectos derivado de un organismo seleccionado de entre el grupo constituido por *Bacillus thuringiensis*, *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*.
- 35 14. Planta según la reivindicación 5, en la que dicha planta comprende además un gen para unas características agronómicas seleccionadas de entre el grupo constituido por resistencia a hongos, tolerancia al estrés, rendimiento aumentado, perfil de aceite mejorado, calidad de fibra mejorada, resistencia a virus, maduración retardada, tolerancia al frío y tolerancia a sal.
- 40 15. Planta según la reivindicación 10, en la que dicho segundo gen de resistencia a herbicida convierte a dicha planta en resistente a un herbicida seleccionado de entre el grupo constituido por glifosato, glufosinato, inhibidores de ALS, inhibidores de 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (HPPD) e inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa (PPO).
- 45 16. Método para controlar por lo menos una mala hierba en un campo, en el que dicho campo contiene por lo menos una planta según la reivindicación 5, en el que dicho método comprende la aplicación a por lo menos una parte de dicho campo de un primer herbicida seleccionado de entre el grupo constituido por un herbicida auxínico fenoxi y un herbicida ariloxifenoxipropionato.
17. Método según la reivindicación 16, en el que dicho herbicida es un R-enantiómero de una auxina fenoxi quiral o una auxina fenoxi aquiral.
- 50 18. Método según la reivindicación 17, en el que dicho herbicida es seleccionado de entre el grupo constituido por R-diclorprop, R-mecoprop, 2,4-D y MCPA.

19. Método según la reivindicación 16, en el que dicho primer herbicida es un ariloxifenoxipropionato y dicha planta es una monocotiledónea.
20. Método según la reivindicación 19, en el que dicha monocotiledónea es seleccionada de entre el grupo constituido por maíz, arroz, trigo, cebada, centeno, césped, avena, sorgo y gramíneas forrajeras.
- 5 21. Método según la reivindicación 16, en el que dicho primer herbicida es una auxina fenoxi y dicha planta es una dicotiledónea.
22. Método según la reivindicación 21, en el que dicha dicotiledónea es seleccionada de entre el grupo constituido por algodón, tabaco, colza y soja.
23. Método según la reivindicación 22, en el que dicho método comprende la aplicación de un segundo herbicida.
- 10 24. Método según la reivindicación 23, en el que dicho primer herbicida y dicho segundo herbicida se aplican de manera secuencial o simultánea.
25. Método según la reivindicación 23, en el que dicho primer herbicida es una auxina fenoxi y el segundo herbicida es un ariloxifenoxipropionato.
- 15 26. Método según la reivindicación 16, en el que dicho método es utilizado para tratar o prevenir las malas hierbas resistentes a herbicidas.
27. Método según la reivindicación 16, en el que dicha planta es resistente al glifosato.
28. Método según la reivindicación 17, en el que dicho R-enantiómero es un componente de una mezcla racémica.
29. Método según la reivindicación 23, en el que dicha planta comprende además un segundo gen de resistencia a herbicida que convierte a dicha planta en resistente a dicho segundo herbicida.
- 20 30. Método según la reivindicación 29, en el que dicho segundo gen es seleccionado de entre el grupo constituido por una AHAS modificada (acetohidroxiácido sintasa), SurA, SurB, Csr1, Csr1-1, Csr1-2, una EPSPS modificada (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa), GOX, GAT, PAT (fosfinotricina-N-acetiltransferasa), bar y una enzima degradadora de dicamba.
- 25 31. Método según la reivindicación 29, en que dicho segundo herbicida es seleccionado de entre el grupo constituido por glifosato, glufosinato, dicamba, inhibidores de acetolactato sintasa, inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa e inhibidores de hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa.
32. Método según la reivindicación 31, en el que dicho segundo herbicida es un inhibidor de acetolactato sintasa seleccionado de entre el grupo constituido por imidazolinonas, sulfonilureas y herbicidas triazolopirimidínicos.
- 30 33. Método según la reivindicación 32, en el que dicho segundo herbicida es una imidazolinona seleccionada de entre el grupo constituido por imazamox, imazetapir, imazaquin e imazapic.
34. Método según la reivindicación 29, en el que dicho primer herbicida es una auxina fenoxi y dicho segundo herbicida es seleccionado de entre el grupo constituido por glifosato y glufosinato.
35. Método según la reivindicación 34, en el que dicha auxina fenoxi es el 2,4-D y dicho segundo herbicida es el glifosato.
- 35 36. Método según la reivindicación 29, en el que dicho primer herbicida es un ariloxifenoxipropionato y dicho segundo herbicida es el glifosato.
37. Método según la reivindicación 36, en el que dicho primer herbicida es seleccionado de entre el grupo constituido por quizalofop, haloxifop y cihalofop.
- 40 38. Método según la reivindicación 32, en el que dicho segundo herbicida es una sulfonilurea seleccionada de entre el grupo constituido por amidosulfurón, bensulfurón, clorimurón, clorsulfurón, cinosulfurón, flupirsulfurón, foramsulfurón, halosulfurón, nicosulfurón, primisulfurón, prosulfurón, rimsulfurón, sulfometurón, sulfosulfurón, tifensulfurón, triasulfurón, trifloxisulfurón y triflusulfurón.
39. Método según la reivindicación 29, en el que dicho método comprende además la aplicación de un tercer herbicida.
- 45 40. Método según la reivindicación 39, en el que dichos herbicidas son 2,4-D; quizalofop; y glufosinato.
41. Método para controlar malas hierbas en un campo, en el que dicho método comprende la aplicación de un primer herbicida a dicho campo y la siembra de una semilla en dicho campo en un periodo de 14 días de la aplicación de dicho primer herbicida, y en el que dicha semilla comprende una célula según la reivindicación 1, y en el que dicho

primer herbicida es seleccionado de entre el grupo constituido por un auxínico fenoxi y un ariloxifenoxipropionato.

42. Método según la reivindicación 41, en el que dicho primer herbicida es un ácido, una sal inorgánica, una sal orgánica, un éster, un isómero R-enantioespecífico o un componente de una mezcla racémica.

5 43. Método según la reivindicación 41, en el que dicha semilla comprende un segundo gen que convierte a dicha planta en resistente a un segundo herbicida, y dicho método comprende además la aplicación de dicho segundo herbicida a dicho campo antes de dicha siembra.

44. Método según la reivindicación 43, en el que dicho segundo herbicida es seleccionado de entre el grupo constituido por glifosato, gramoxona y glufosinato.

10 45. Método para controlar por lo menos una mala hierba en un campo, en el que dicho campo contiene por lo menos una planta según la reivindicación 5, en el que dicho método comprende la aplicación a por lo menos una parte de dicho campo de un primer herbicida que es el 2,4-D, en el que dicha planta comprende además un segundo gen de resistencia a herbicida que convierte a dicha planta en resistente al glifosato.

46. Semilla que comprende una célula vegetal según la reivindicación 1.

15 47. Planta desarrollada a partir de la semilla según la reivindicación 46, en la que dicha planta comprende una célula vegetal transgénica según la reivindicación 1.

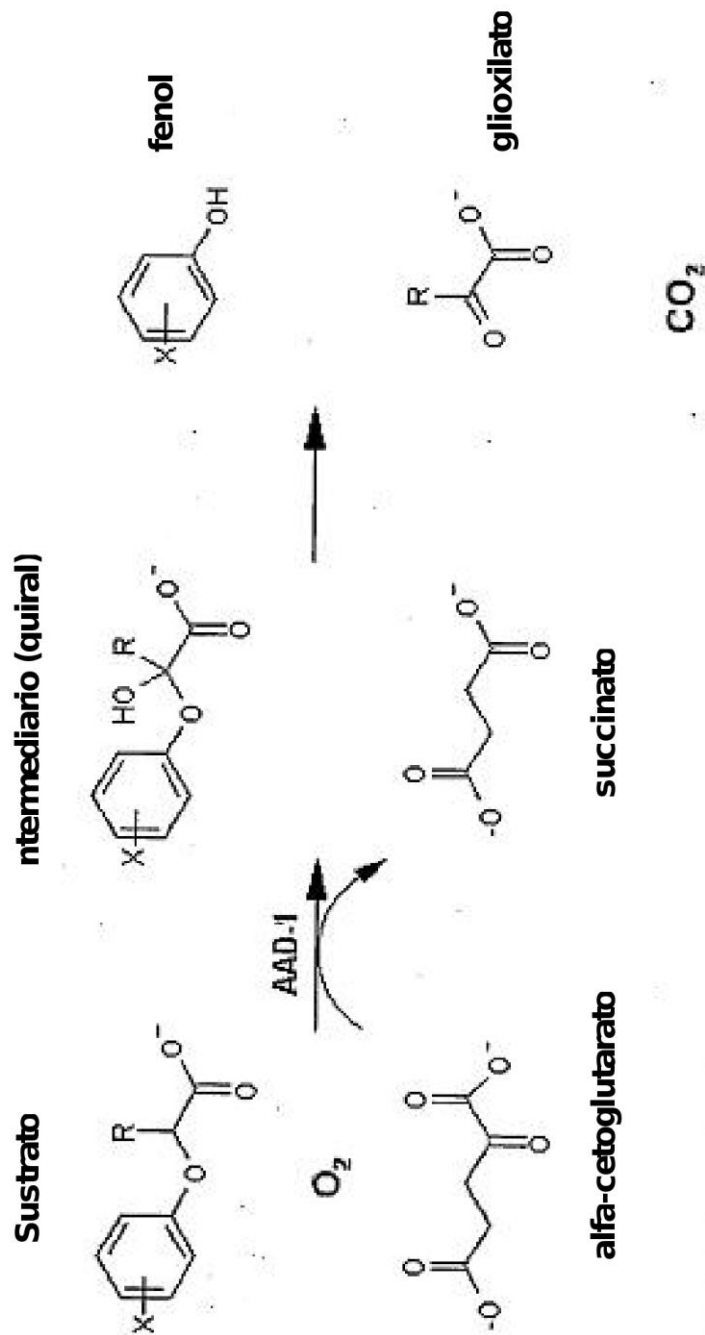
48. Parte, progenie o propágulo asexual de la planta según la reivindicación 5, en los que dicha parte, progenie o propágulo asexual comprenden una pluralidad de células según la reivindicación 1, en los que la expresión de dicho polinucleótido convierte a dichas células en tolerantes a un herbicida ariloxialcanoato.

20 49. Método para controlar las malas hierbas resistentes al glifosato en un campo de plantas de cultivo tolerantes al glifosato, en el que dichas plantas comprenden una célula vegetal transgénica según la reivindicación 1, y dicho método comprende la aplicación de un herbicida ariloxialcanoato a por lo menos una parte de dicho campo.

50. Método según la reivindicación 49, en el que dicho herbicida es una auxina fenoxi o un ariloxifenoxipropionato.

51. Método según la reivindicación 50, en el que dicho herbicida auxínico fenoxi es 2,4-D.

52. Método según la reivindicación 49, en el que dichas plantas son dicotiledóneas o monocotiledóneas.



- Adición de O_2 es estereoespecífica
- Descomposición del intermediario a fenol + glioxilato es espontánea

Fig. 1

Ensayo en placa con Arabidopsis Efecto sobre el alargamiento de las raíces provocado por la solución de reacción a base de 2,4-D + extracto de AAD-1 (v1)

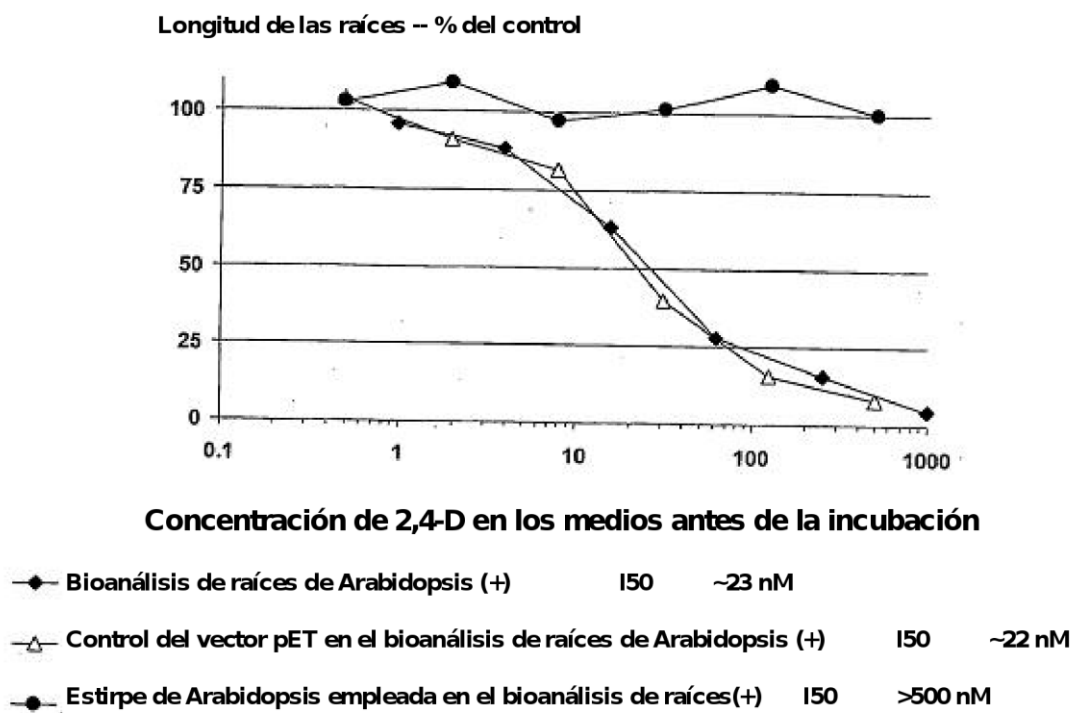


Fig. 2

Efecto sobre raíces + brotes de agróstide estolonífera provocado por la solución de reacción a base de haloxifop + extracto de AAD-1 (v1)

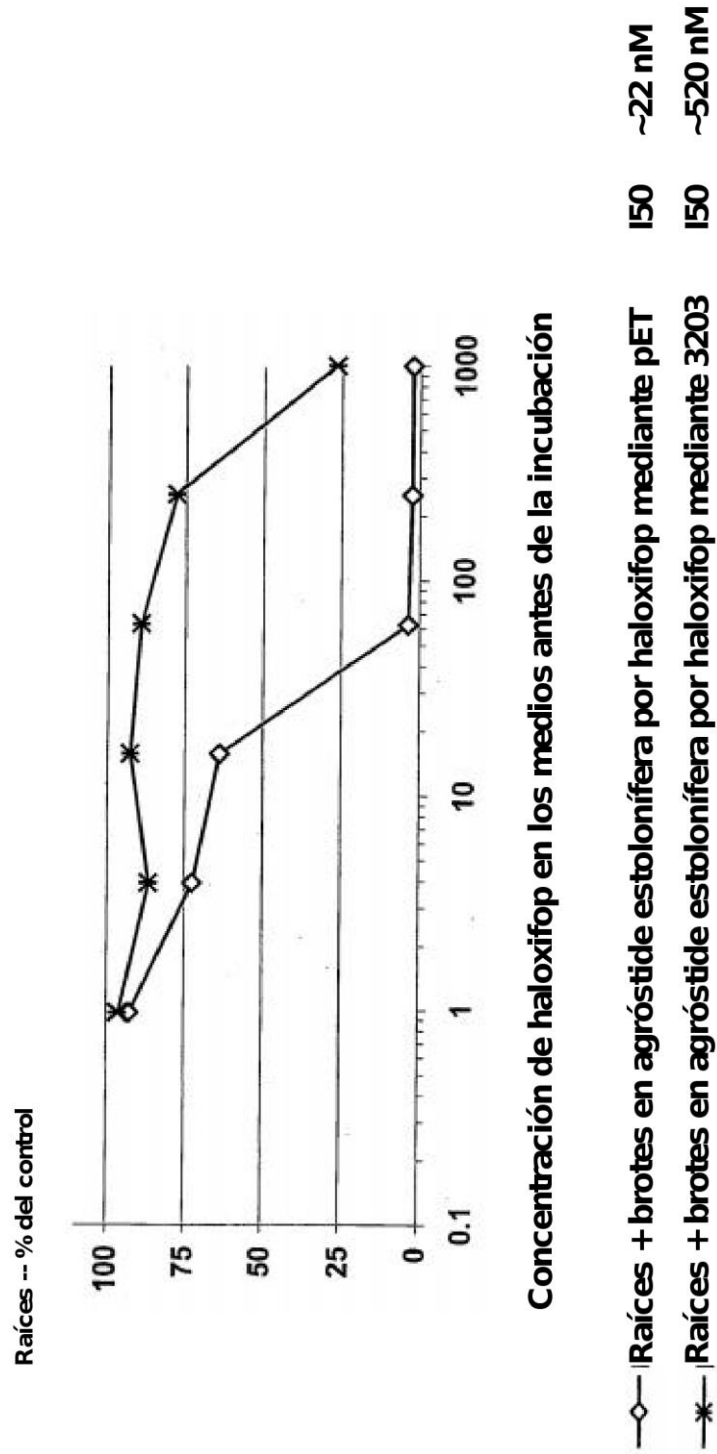
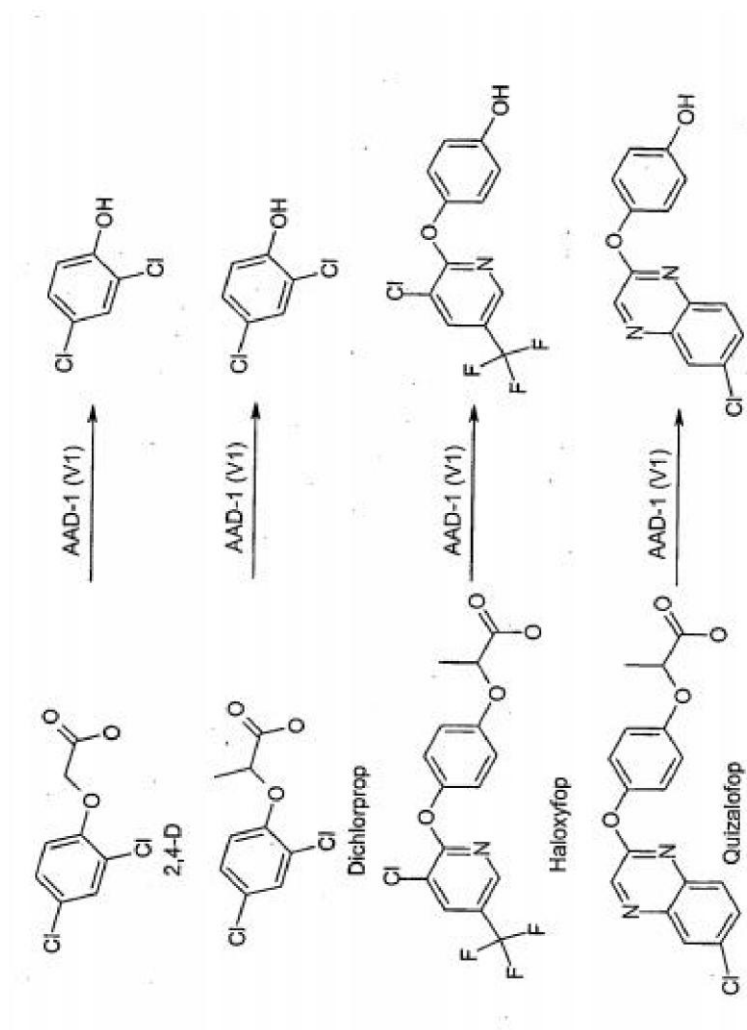


Fig. 3

**Fig. 4**

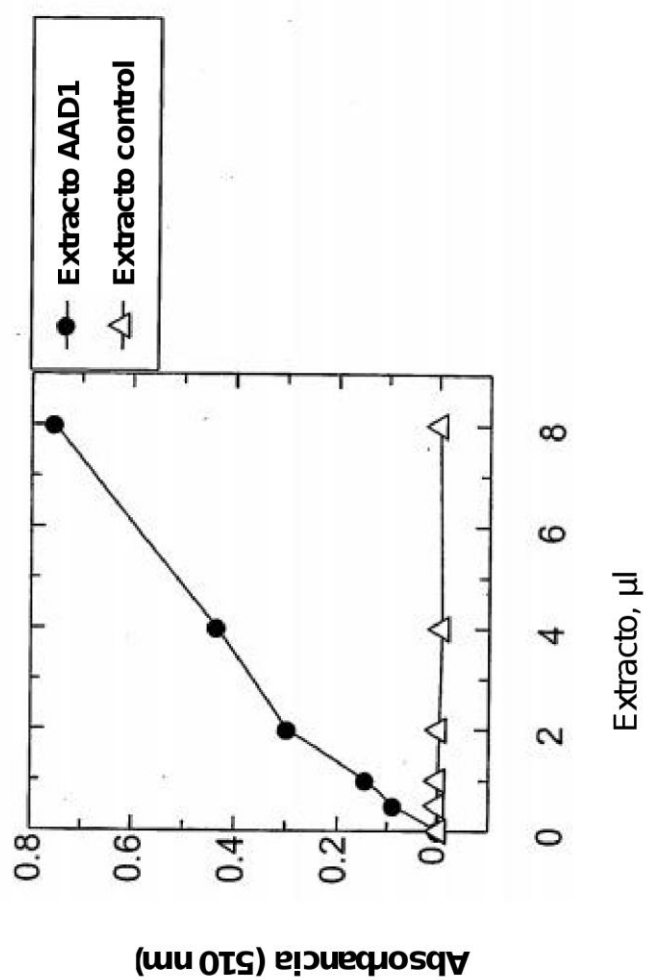
**Fig. 5**

Fig. 6A

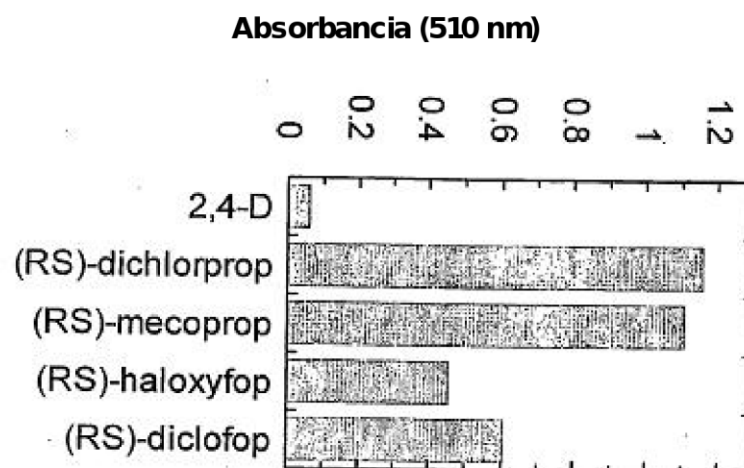
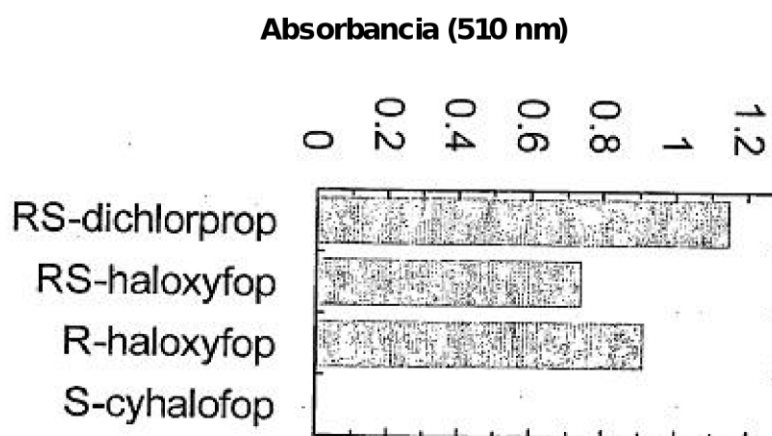
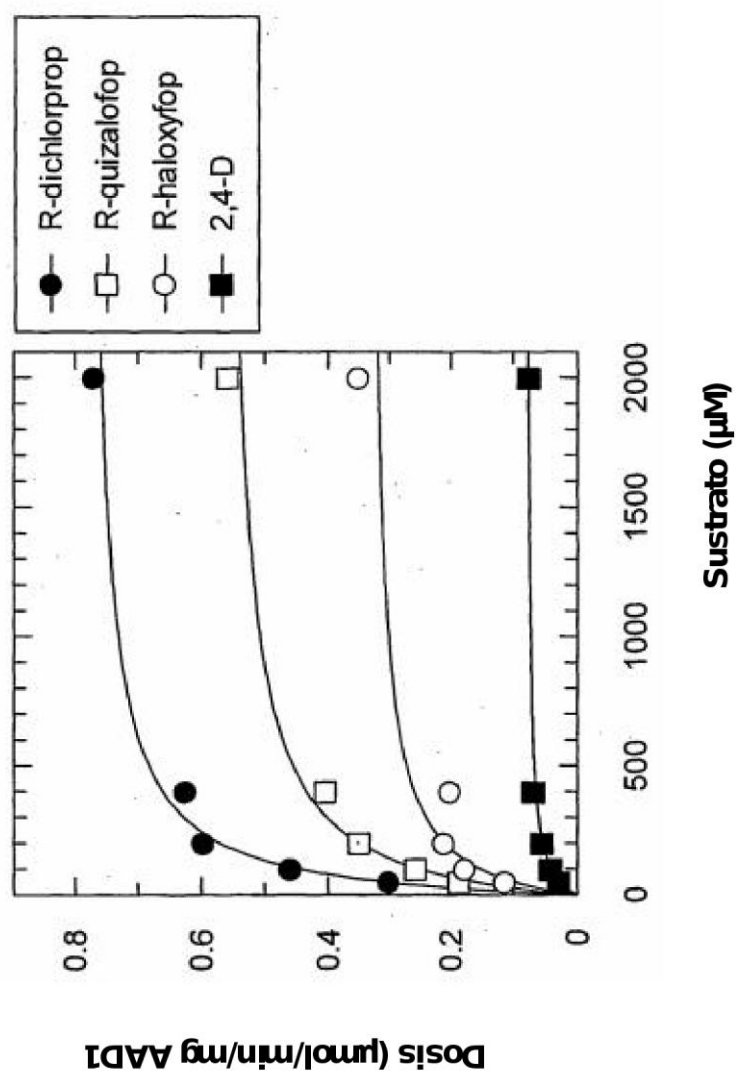
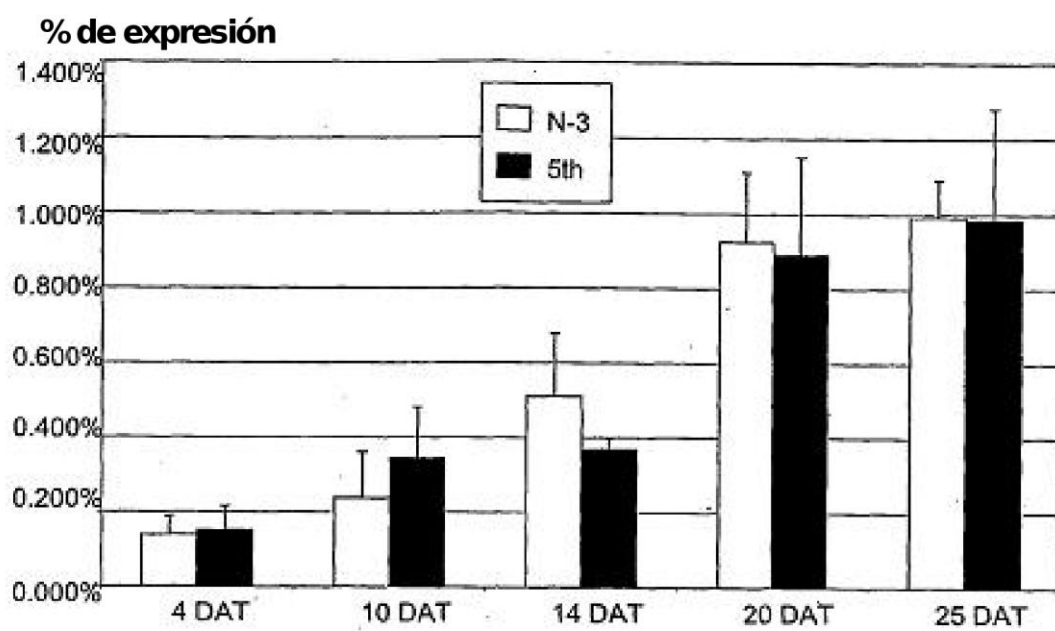
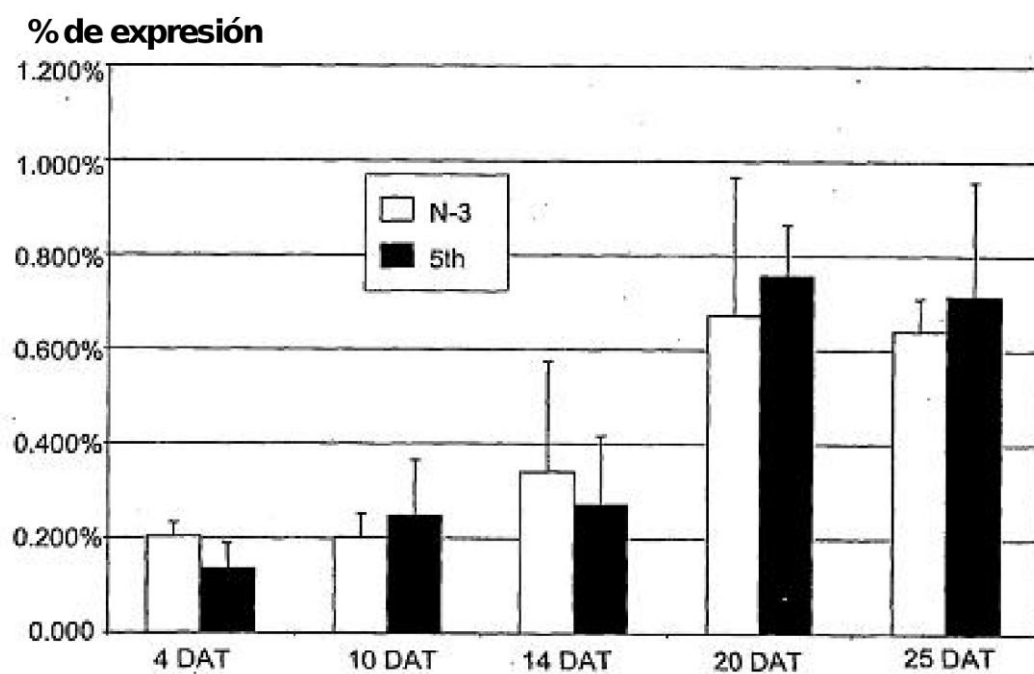


Fig. 6B



**Fig. 7**

**Fig. 8A****Fig. 8B**

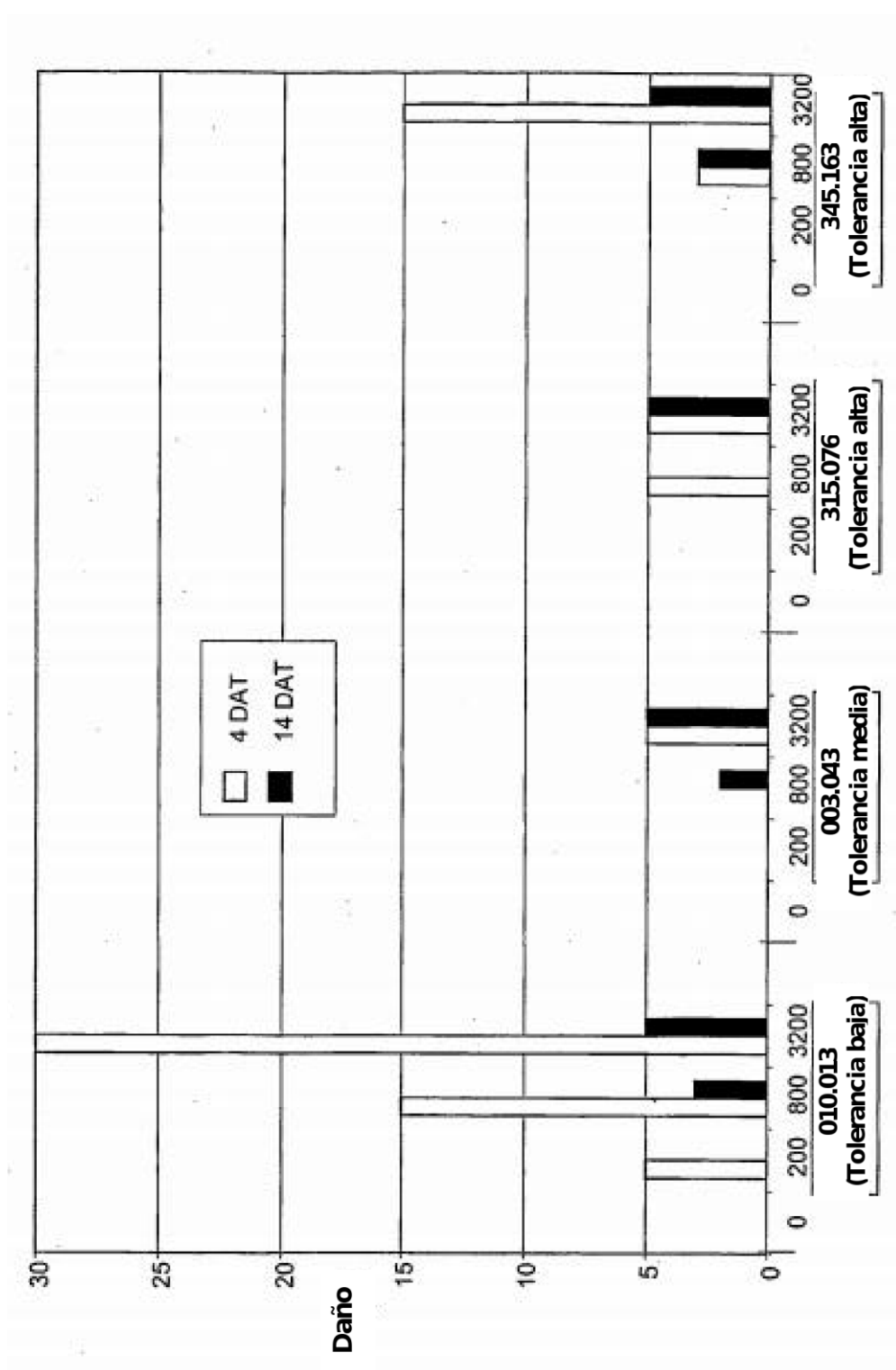


Fig. 9A

Respuesta a dosis 4 DAT

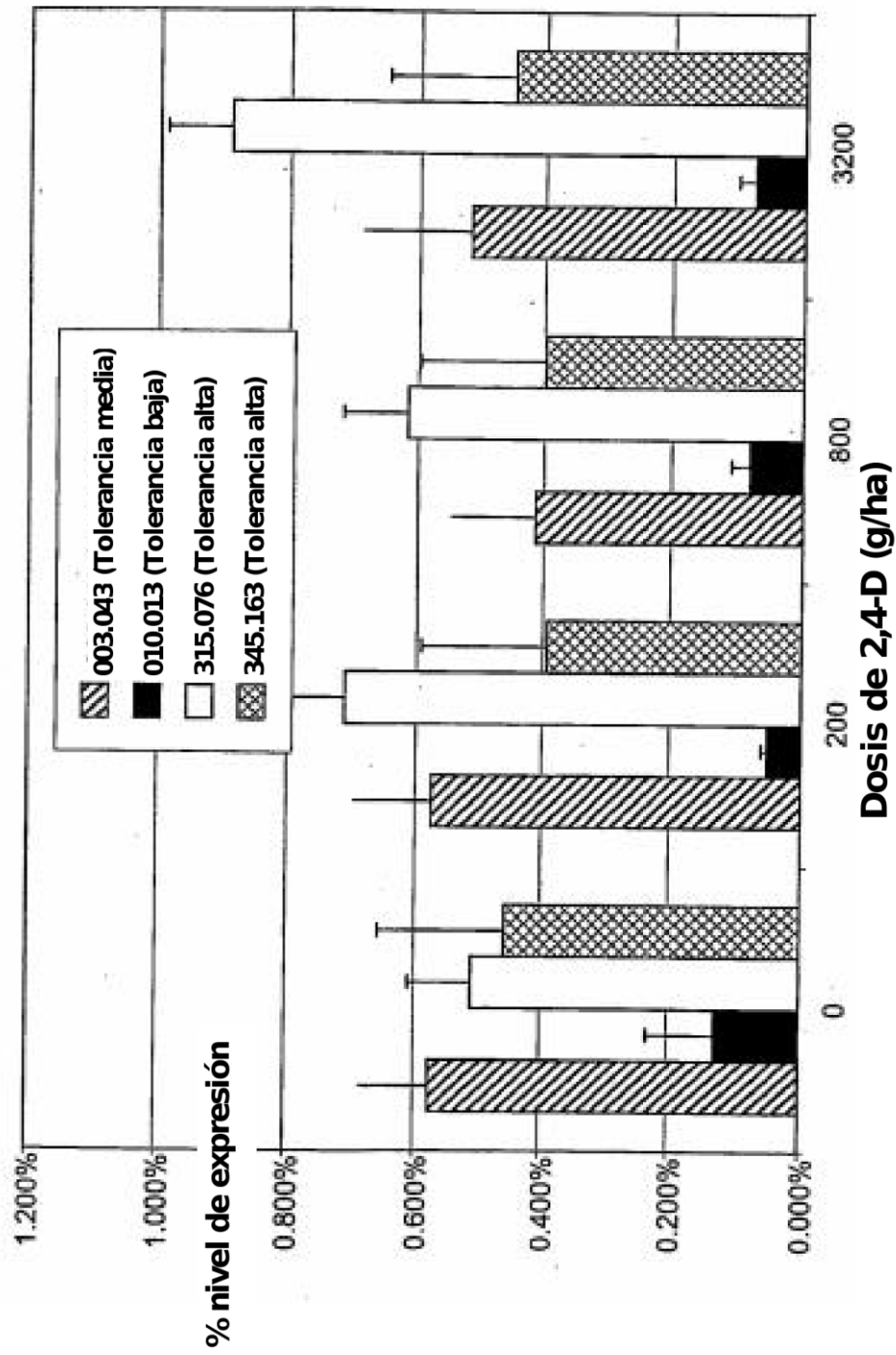


Fig. 9B

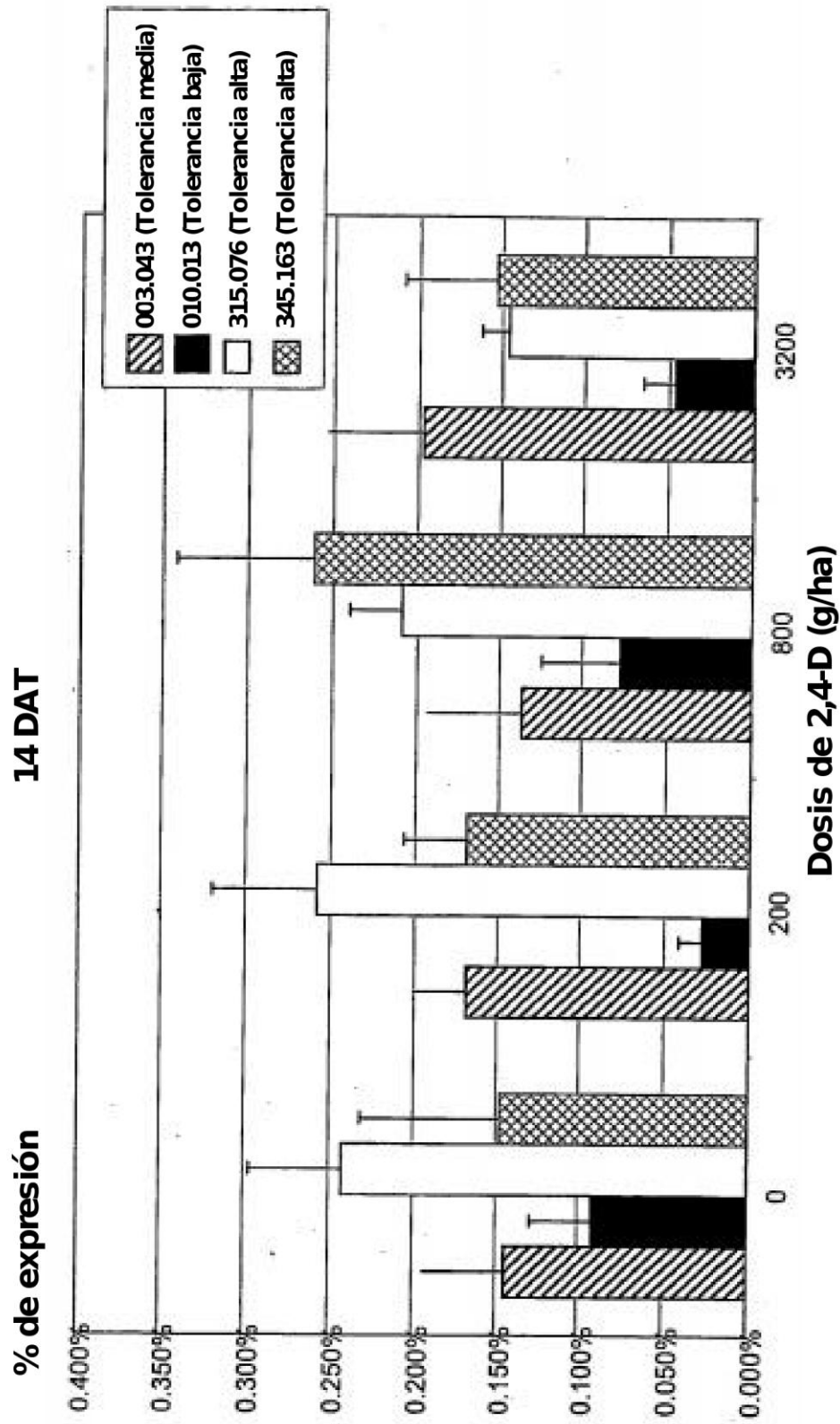
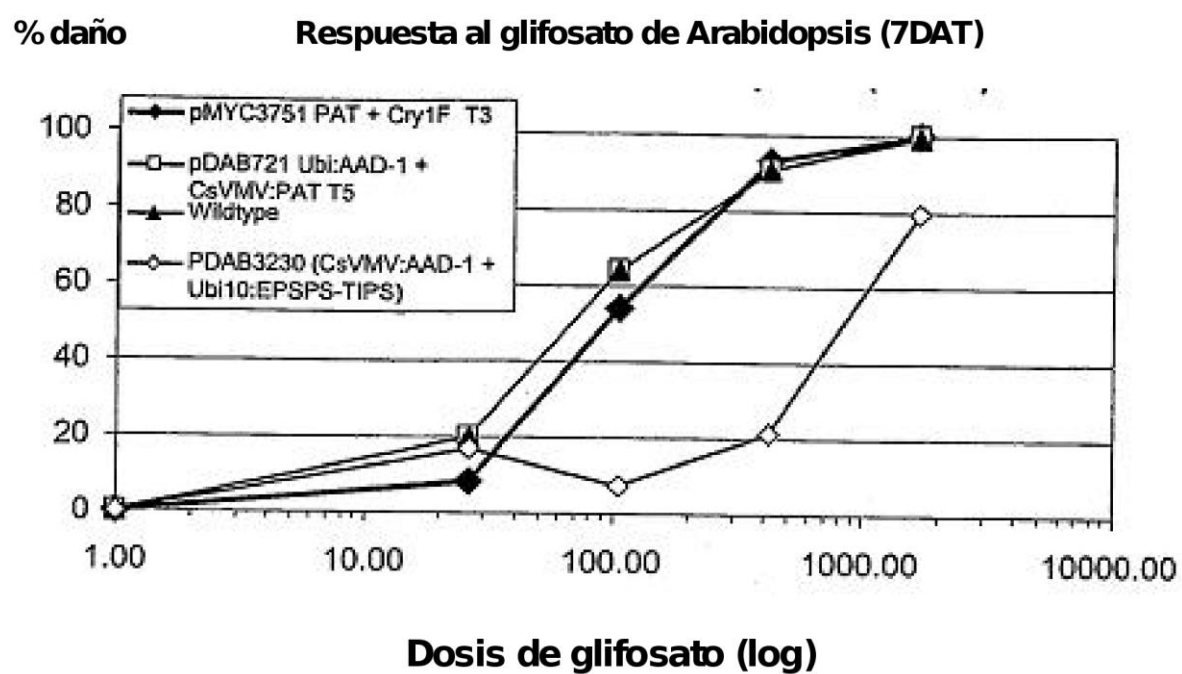
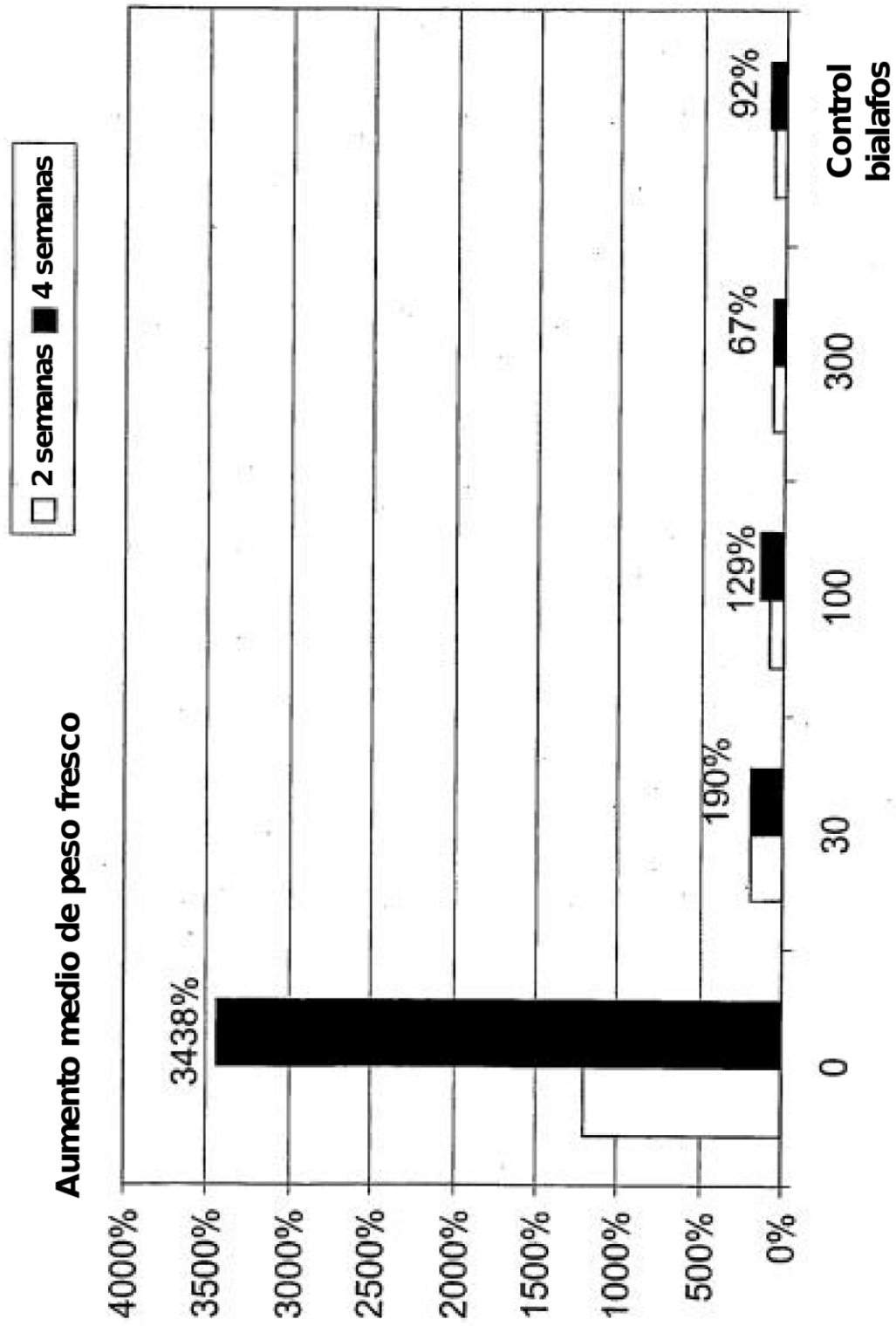
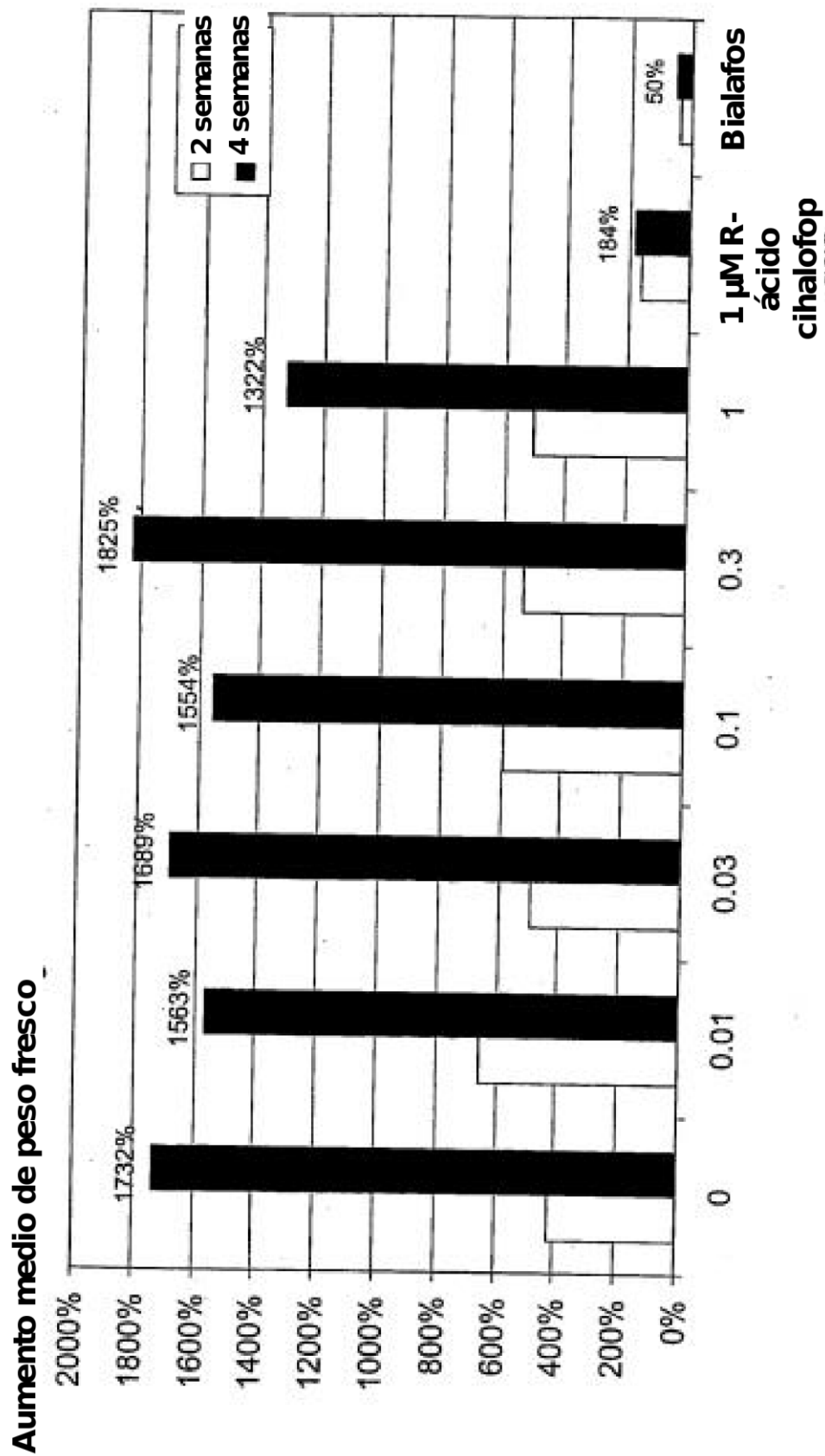


Fig. 9C

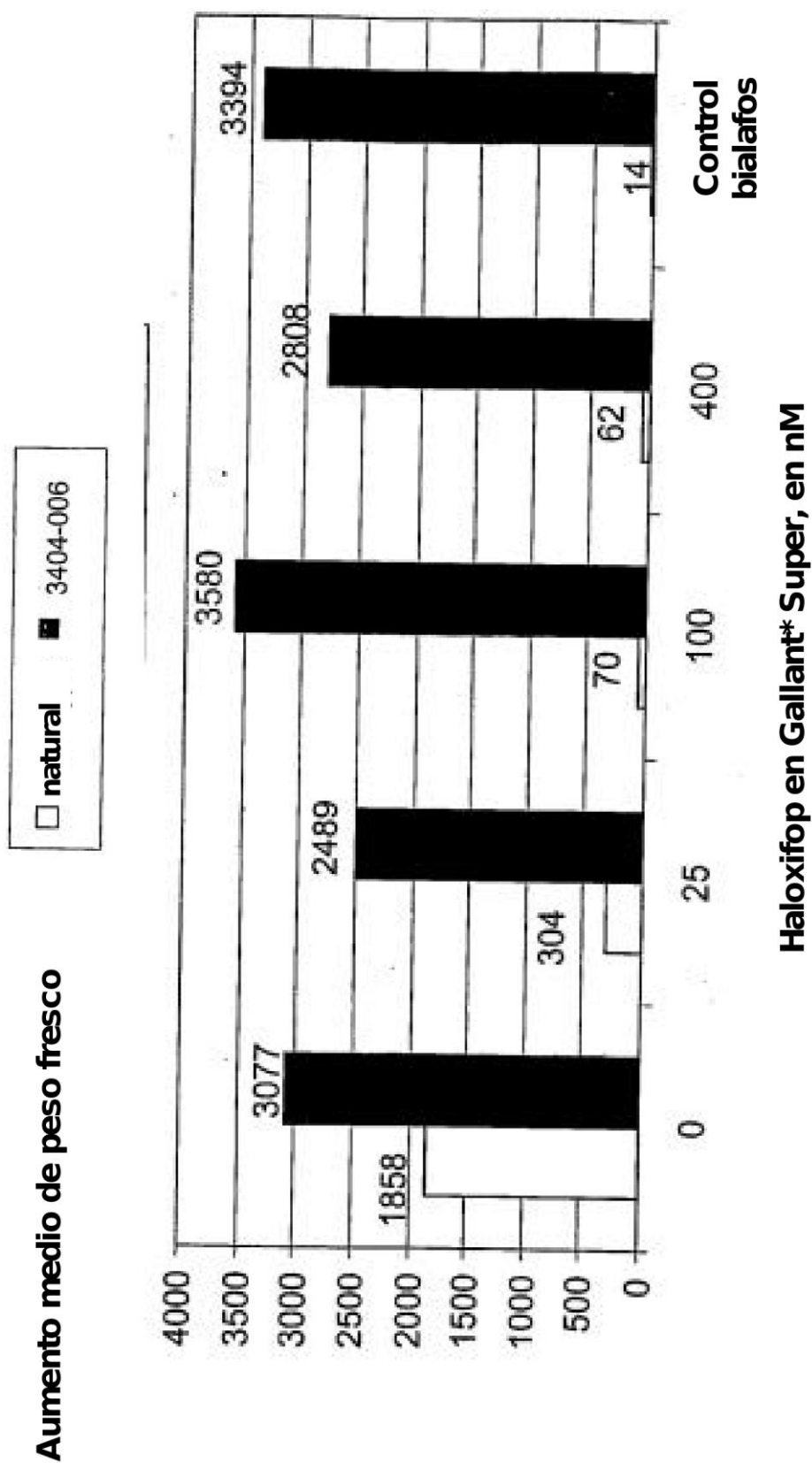
**Fig. 10**



[Ácido haloxifop] en nM
Fig. 11



[Cihalofof-phenol] en nM
Fig. 12

**Fig. 13**

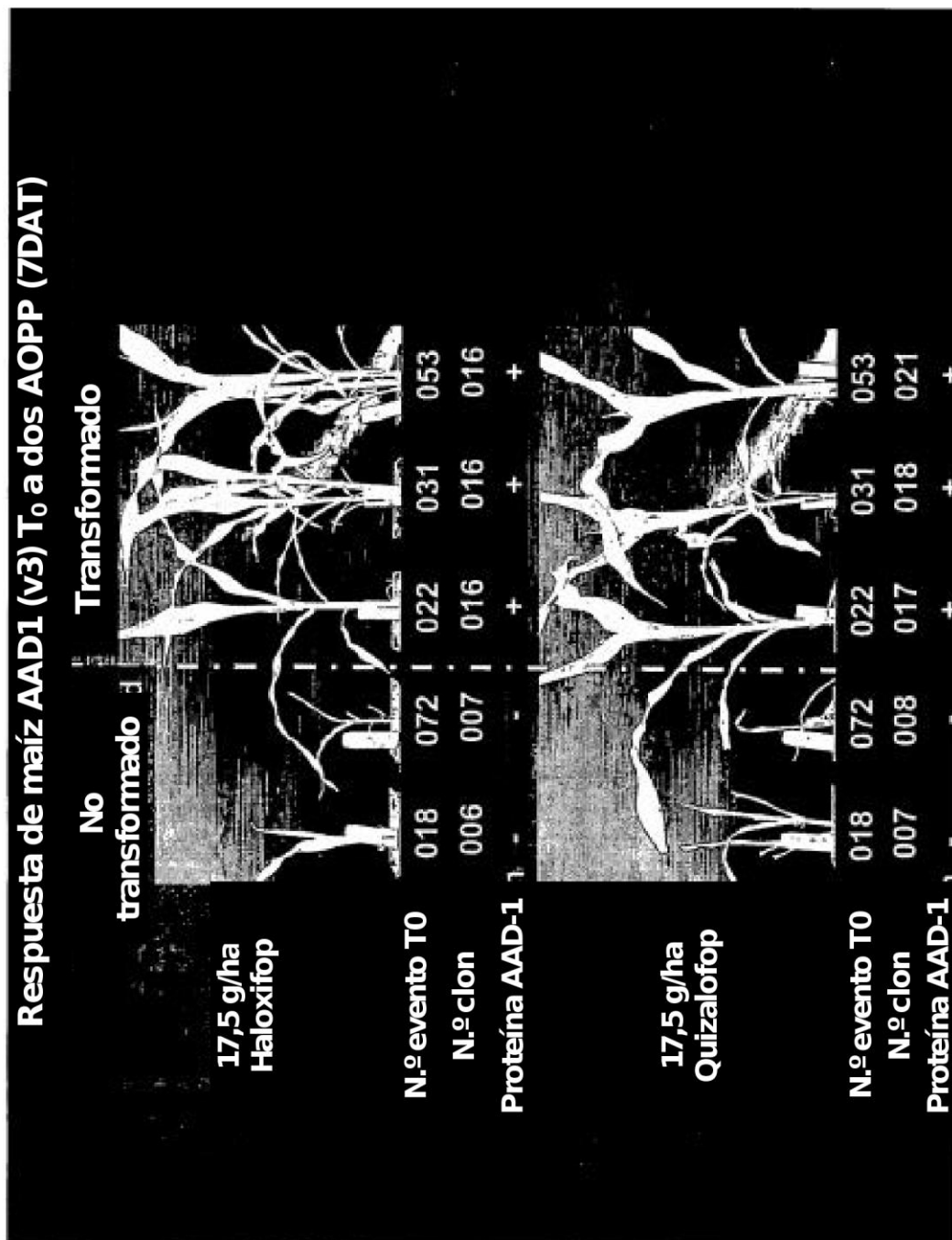


Fig. 14

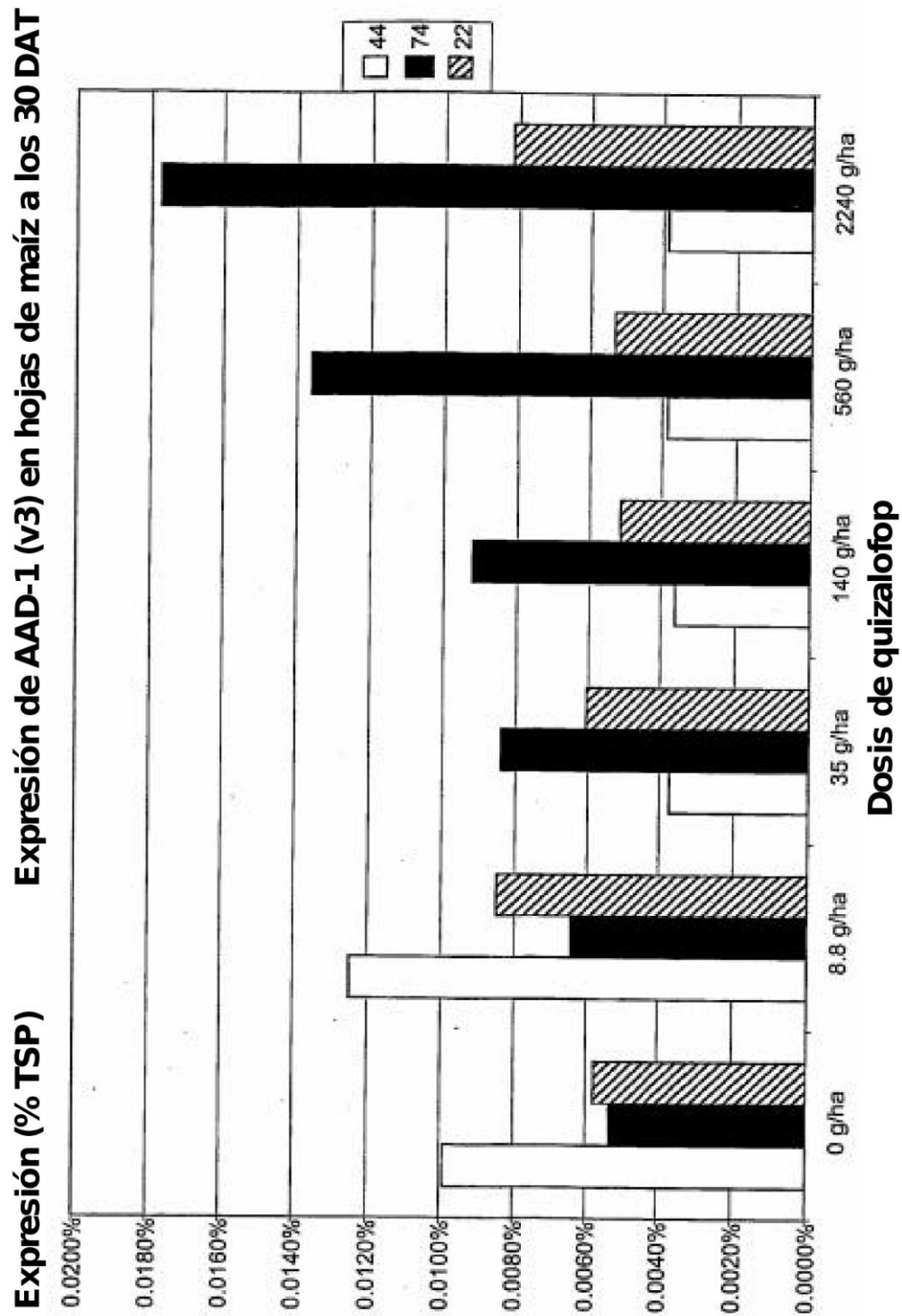
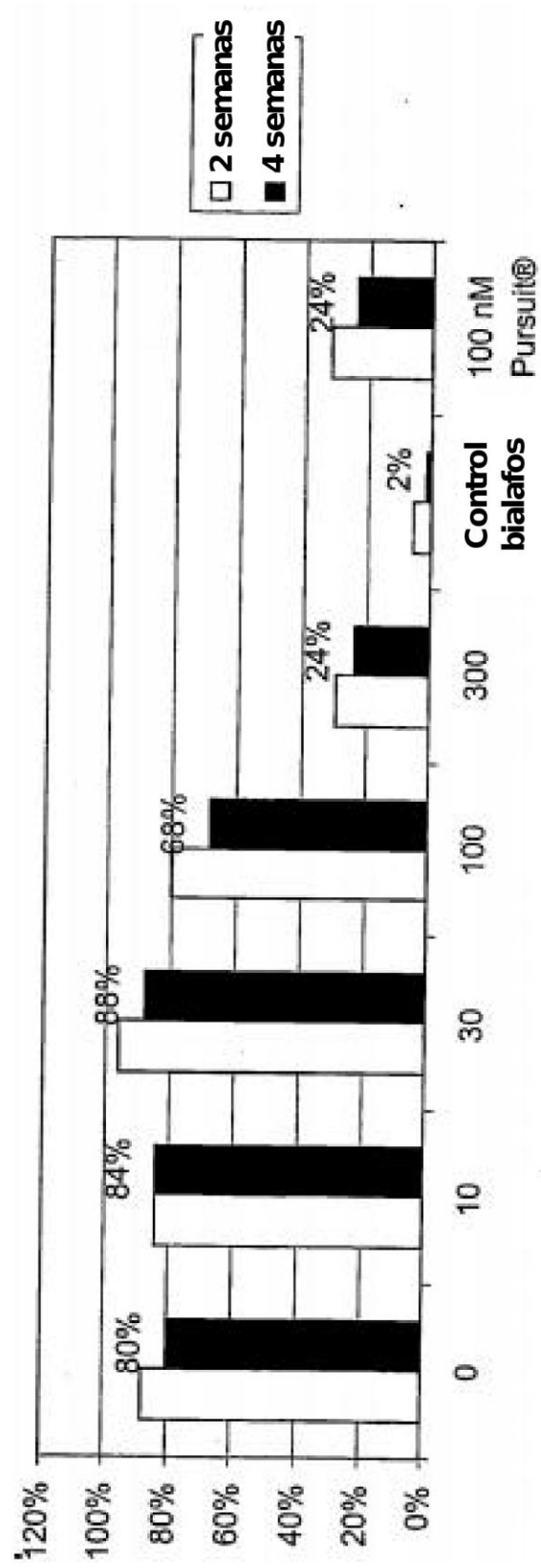


Fig. 15



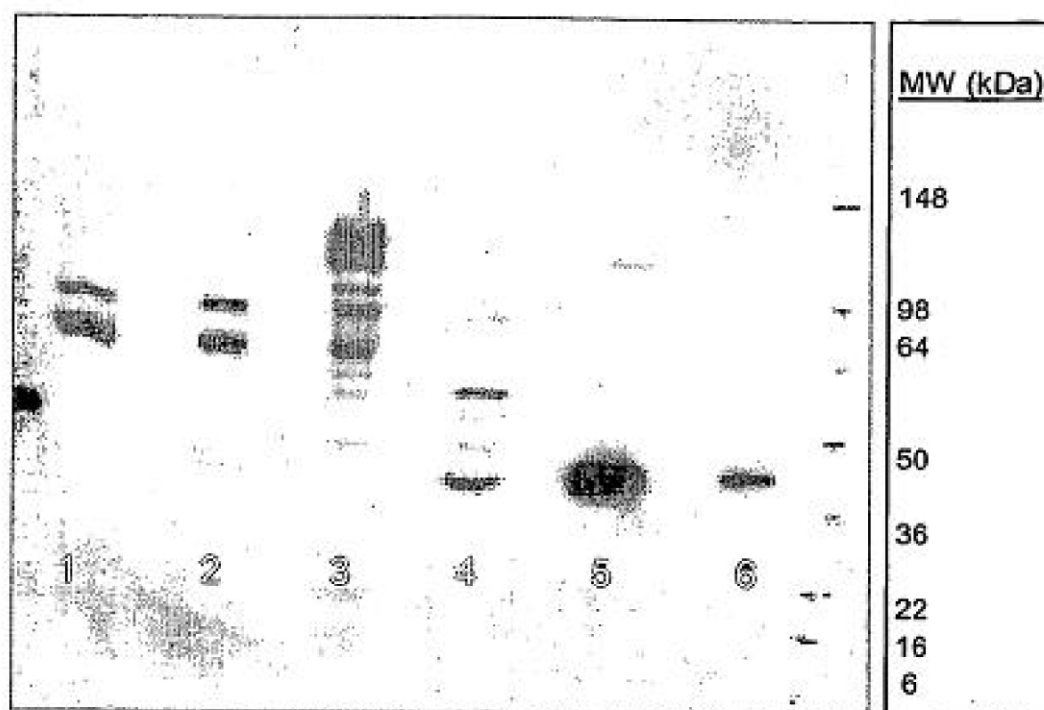
Fig. 16

% Callo embriónico, formación



[Ácido R-cis-chalofop] en nM

Fig. 17



Western	
Línea	
1	Callo N° 1
2	Callo N° 2
3	Negativo
4	Maíz AAD1
5	Patrón 5 µg/ml
6	Patrón 0,5 µg/ml

Fig. 18

Dosis relativa

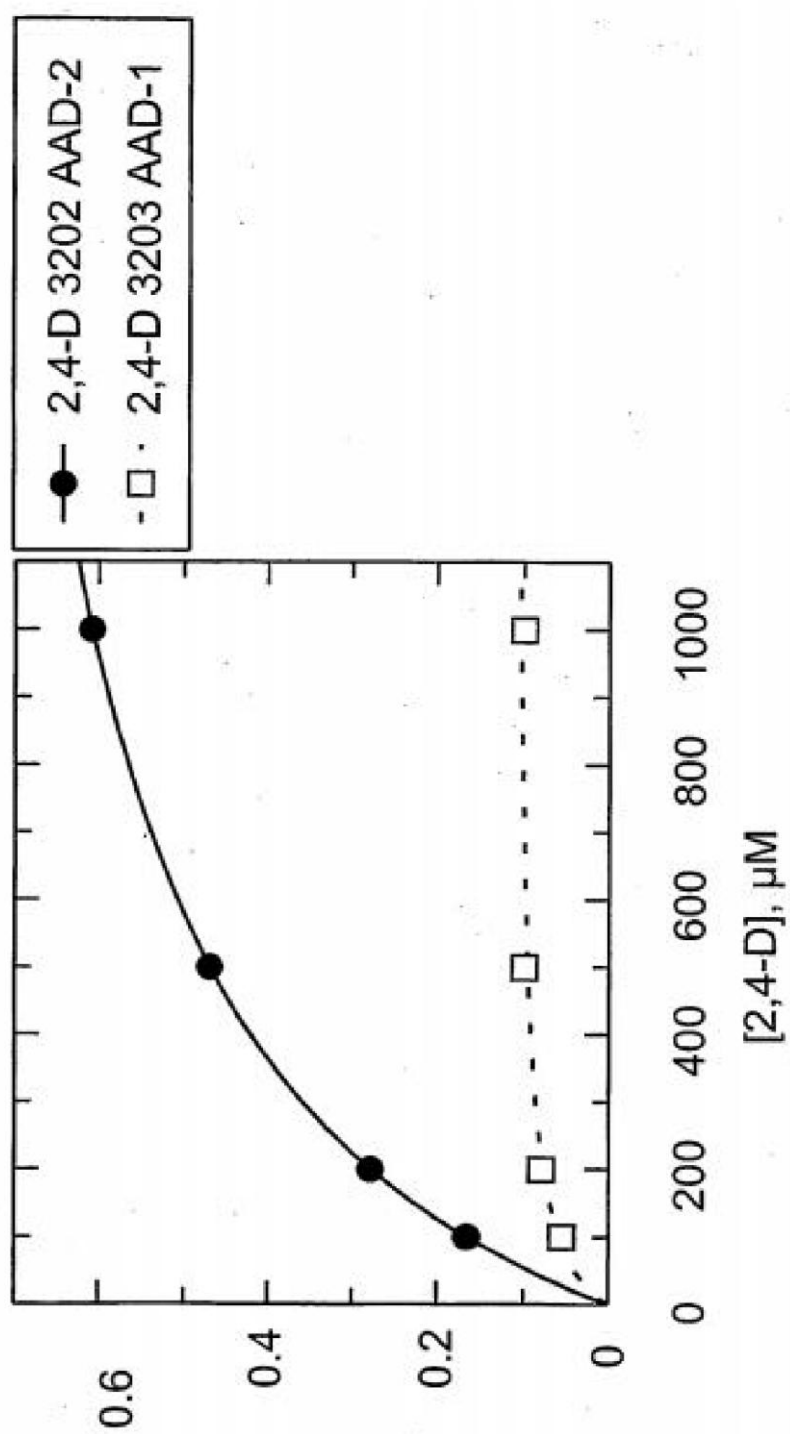
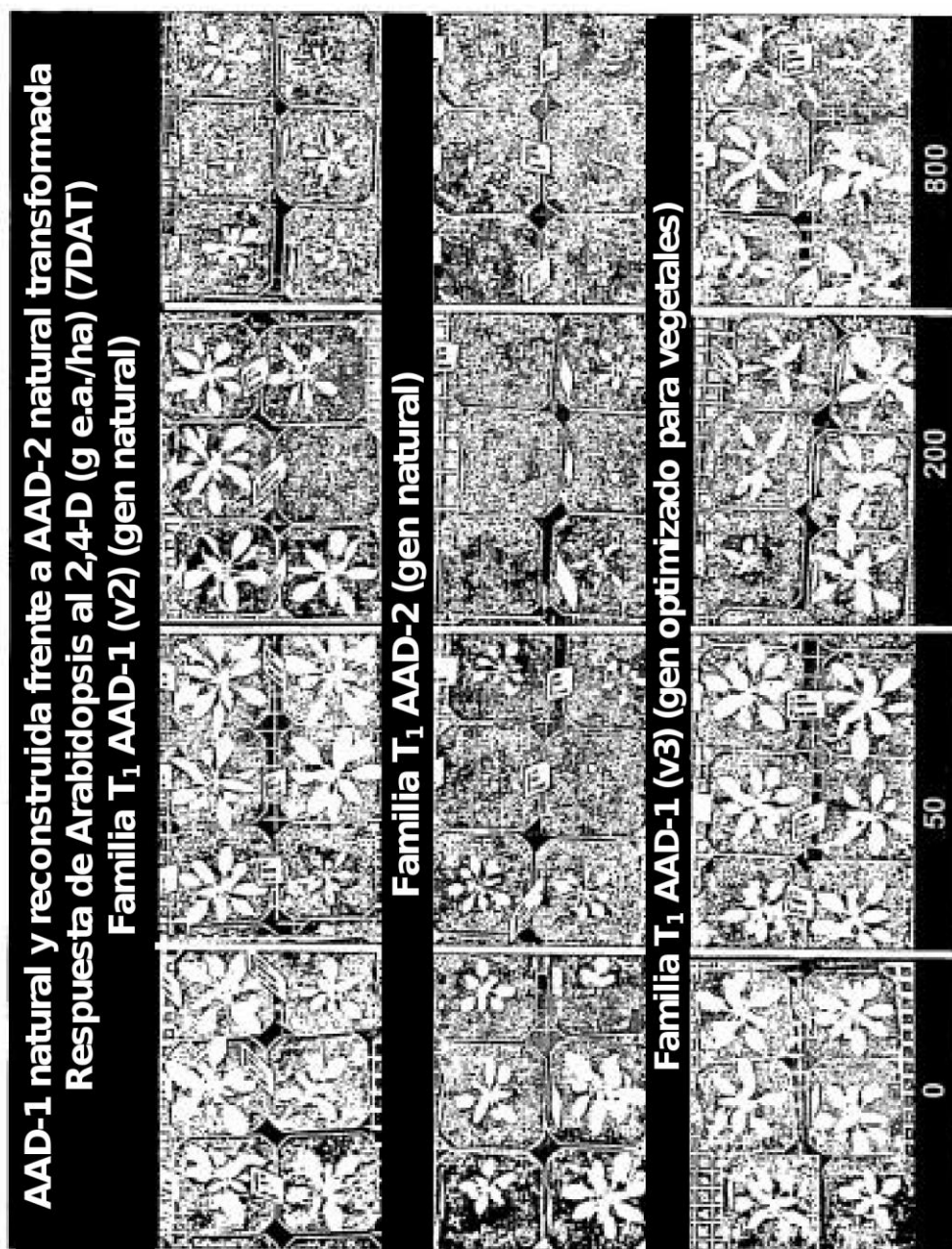


Fig. 19

**Fig. 20**

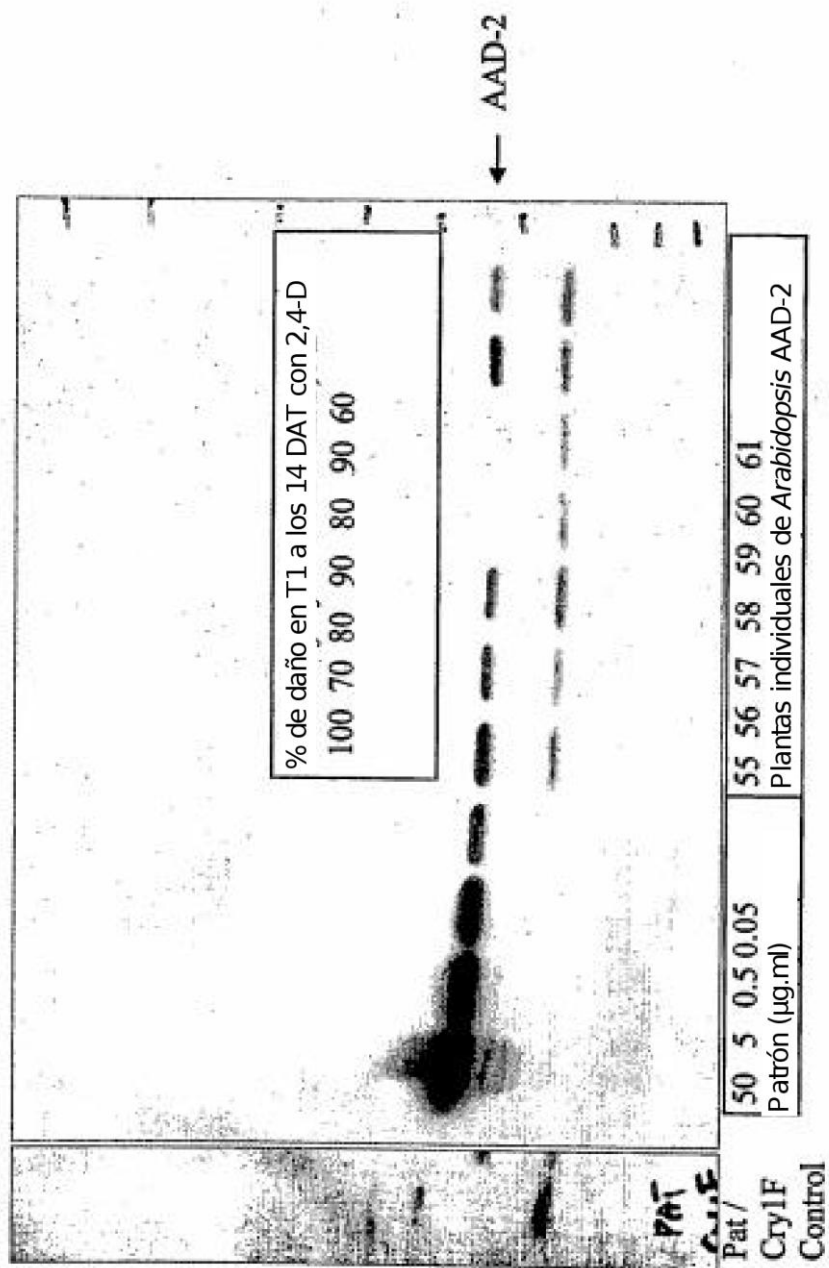


Fig. 21

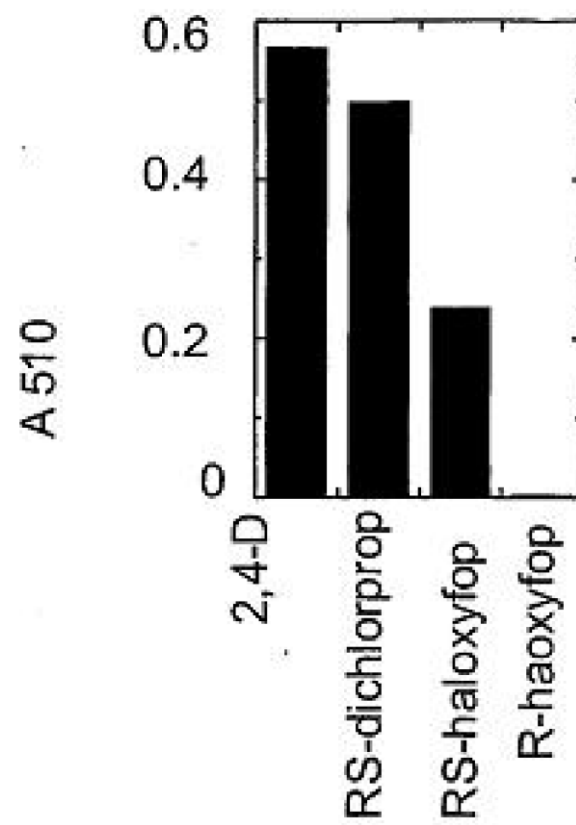


Fig. 22