

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 956 861**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2015** **E 20211532 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2023** **EP 3837970**

54 Título: **Genes de tolerancia a herbicidas y procedimientos para uso de los mismos**

30 Prioridad:

15.10.2014 US 201462064343 P

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

29.12.2023

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ELLIS, CHRISTINE M.;
EVDOKIMOV, ARTEM G.;
FENG, PAUL C.C.;
FU, XIAORAN;
LARUE, CLAYTON T.;
NAGEOTTE, JEFFREY R.;
READ, ANDREW C.;
SHI, LEI y
WOLLACOTT, ANDREW M.

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 956 861 T3

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

DESCRIPCIÓN

Genes de tolerancia a herbicidas y procedimientos para uso de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención en general se refiere al campo de biotecnología. Más específicamente, la invención se refiere a moléculas de ADN recombinante que codifican enzimas que degradan herbicidas. La invención también se refiere a plantas transgénicas, partes, semillas, células, y partes de plantas que contienen las moléculas de ADN recombinantes, así como también procedimientos para usar las mismas.

Descripción de la técnica relacionada

10 La producción agrícola a menudo utiliza rasgos transgénicos creados usando los procedimientos de biotecnología. Un gen heterólogo, también conocido como un transgen, se introduce en una planta para producir rasgos transgénicos. La expresión del transgen en la planta confiere un rasgo deseable, tal como tolerancia a herbicidas, en la planta. Ejemplos de rasgos de tolerancia a herbicidas transgénicos incluyen tolerancia a glifosato, tolerancia a glufosinato, y tolerancia a dicamba. Con el incremento de especies de malezas resistentes a los herbicidas más comúnmente usados, nuevos rasgos de tolerancia a herbicidas son necesarios en el campo. Los herbicidas de interés particular son los herbicidas de ariloxifenoxipropionato (AOPP), herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos. Los herbicidas de AOPP, herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos proporcionan control de un espectro de malezas resistentes a glifosato, de este modo haciendo un rasgo que confiere tolerancia a estos herbicidas particularmente útiles en un sistema de cultivo combinado con otro(s) rasgo(s) de tolerancia a herbicidas.

20 La cepa MH de *Sphingobium herbicidovorans* aislada a partir de una muestra de suelo degradante por dicloroprop se identificó por ser capaz de desdoblar el enlace éter de varios herbicidas de ácido fienoxialcanoico, utilizando este como su única fuente de energía y carbono para el crecimiento (HPE Kohler, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (1999) 23:336-340). El catabolismo de los herbicidas se lleva a cabo por dos diferentes dioxigenasas dependientes de alfa-cetoglutarato enantioselectivas, RdpA (R-dicloroprop dioxigenasa) y SdpA (S-dicloroprop dioxigenasa). (A Westendorf, *et al.*, Microbiological Research (2002) 157:317-322; Westendorf, *et al.*, Acta Biotechnologica (2003) 23(1):3-17). La RdpA ha sido aislada a partir de *Sphingobium herbicidovorans* (Accesos a GenBank AF516752 (ADN) y AAM90965 (proteína)) y *Delftia acidovorans* (Accesos a GenBank NG_036924 (ADN) y YP_009083283 (proteína)) (TA Mueller, *et al.*, Applied and Environmental Microbiology (2004) 70 (10):6066-6075.) Los genes RdpA y SdpA han sido usados para la transformación de plantas para conferir tolerancia a herbicidas a cultivos (TR Wright, *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, (2010) 107(47):20240-5). Mejorando la actividad de la enzima RdpA usando técnicas de ingeniería de la proteína para crear una proteína para uso en plantas transgénicas podría permitir índices superiores de aplicación de herbicidas, de este modo mejorando la seguridad de los cultivos transgénicos y mediciones del control de malezas.

Breve resumen de la invención

35 La invención proporciona un polipéptido que tiene un aminoácido de la SEQ ID NO: 51. En una realización, el polipéptido tiene actividad oxigenasa contra al menos un herbicida seleccionado del grupo que consiste en herbicidas AOPP, herbicidas de fenoxiácido y herbicidas de piridiniloxiácido.

40 La invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51. En una realización, la molécula de ADN recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 58. En otra realización, la molécula de ADN recombinante codifica un polipéptido con actividad de oxigenasa contra al menos un herbicida seleccionado a partir del grupo que consiste de herbicidas de AOPP, herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos. En otra realización, la molécula de ADN recombinante está operablemente ligada a un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal. En otra realización, la molécula de ADN recombinante está operablemente ligada a una molécula de ADN que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto que funciona para localizar un polipéptido operablemente ligado dentro de una célula.

45 La invención proporciona un constructo de ADN que comprende un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal operablemente ligada a una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la SEQ ID NO: 51. En una realización, la molécula de ADN recombinante está operablemente ligada a una molécula de ADN que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto que funciona para localizar un polipéptido operablemente ligado dentro de una célula. En otra realización, la molécula de ADN recombinante codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y la expresión del polipéptido en una planta transgénica confiere tolerancia al herbicida a la planta. En otra realización, el constructo de ADN está presente en el genoma de una planta transgénica.

55 La invención proporciona una planta transgénica, semilla, célula o parte de la planta que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51. En una realización, la planta transgénica, semilla, célula o parte de la planta comprende un rasgo transgénico para tolerancia con al menos un herbicida seleccionado a partir del grupo

que consiste de herbicidas de AOPP, herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos. En otra realización, la planta transgénica, semilla, célula o parte de la planta comprende un constructo de ADN de la invención. En otra realización, la planta transgénica, semilla, célula o parte de la planta comprende un polipéptido de la invención.

La invención proporciona un procedimiento para conferir tolerancia a los herbicidas a una planta, semilla, célula, o parte de la planta que comprende expresar en la planta, semilla, célula, o parte de la planta un polipéptido de la invención. En una realización, el procedimiento para conferir tolerancia al herbicida se usa con una planta transgénica, semilla, célula, o parte de la planta que comprende un rasgo transgénico que comprende una molécula de ADN recombinante de la invención. En una realización, el procedimiento para conferir tolerancia al herbicida se usa con un herbicida seleccionado a partir del grupo que consiste de herbicidas de AOPP, herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos.

La invención proporciona un procedimiento de transformación de una planta, que comprende introducir un constructo de ADN de la invención en una célula vegetal y regenerar una planta a partir de esta que comprende el constructo de ADN y es tolerante con al menos un herbicida seleccionado a partir del grupo que consiste de herbicidas de AOPP, herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos. En una realización, el procedimiento de transformación de una planta incluye cruzar la planta regenerada con la misma o con una segunda planta y recolectar la semilla de la cruce.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Plantas de maíz transgénicas de control y MON-HT55 (SEQ ID NO:11) (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerada útil para comprender la invención) después del tratamiento con quizalofop-P. La Figura 1A muestra las plantas de maíz de control y transgénicas ya sea no tratadas o tratadas con quizalofop-P 1X (0.08 lb ia/acre). La Figura 1B muestra las plantas de maíz de control híbrido F1 y la Figura 1C muestra las plantas de maíz transgénico MON-HT55 híbrido F1. Las plantas se hicieron crecer a temperaturas diurnas/nocturnas de (1) 20°C/20°C, (2) 28°C/20°C, o (3) 38°C/30°C previo a ser rociadas con 2X quizalofop-P.

Figura 2. Gráficas que muestran la actividad dependiente de la temperatura de proteínas diseñadas por ingeniería. La Figura 2A muestra la actividad de MON-HT55 (SEQ ID NO:11) (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerada útil para comprender la invención) y la enzima RdpA de tipo silvestre cuando se prueba con quizalofop-P como el sustrato. La Figura 2B muestra la actividad de MON-HT1 (SEQ ID NO:14), MON-HT2 (SEQ ID NO:18), MON-HT7 (SEQ ID NO:34), MON-HT8 (SEQ ID NO:37) y la RdpA de tipo silvestre cuando se prueba con quizalofop-P como el sustrato. La Figura 2C muestra la actividad de MON-HT1, MON-HT2, MON-HT7, MON-HT8 y la RdpA de tipo silvestre cuando se prueba con 2,4-D como el sustrato. Los datos son normalizados con la actividad de cada proteína a 25°C.

Figura 3. La secuencia de la proteína de RdpA de tipo silvestre (SEQ ID NO:60) (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerada útil para comprender la invención) con posiciones de aminoácido ejemplares útiles para las proteínas de caja diseñadas por ingeniería.

Figura 4. La clasificación de daño promedio después de la aplicación de quizalofop-P 2X (0.16 lb ia/acre) (4A, 4B, y 4C) o 4X 2,4-D (4 lb ae/acre) (4D y 4E) a plantas de maíz híbrido F1 (R1 homocigotos que expresan MON-HT x MON89034 endogámicos) que expresan MON-HT55 (SEQ ID NO:11), MON-HT1 (SEQ ID NO:14), MON-HT2 (SEQ ID NO:18), MON-HT3 (SEQ ID NO:22), MON-HT4 (SEQ ID NO:25), MON-HT7 (SEQ ID NO:34), o control híbrido F1 (NK603 x MON89034) (todas no abarcadas en el texto de las reivindicaciones pero considerados útiles para la comprensión de la invención). Los datos a partir de plantas aclimatadas a temperaturas diurnas y nocturnas ajustadas a 20°C (20°C/20°C) previo a la aplicación de quizalofop-P 2X (Figura 4A) o 4X 2,4-D (Figura 4D); la Figura 4B muestra datos a partir de plantas aclimatadas a temperatura diurna de 28°C y temperatura nocturna de 20°C (28°C/20°C) previo a la aplicación de quizalofop-P 2X; la Figura 4C muestra datos a partir de plantas aclimatadas a temperatura diurna de 38°C y temperatura nocturna de 30°C (38°C/30°C) previo a la aplicación de quizalofop-P 2X (Figura 4C) o 4X 2,4-D (Figura 4E).

Figura 5. 5A y 5B: Plantas de maíz transgénicas y de control que comprenden MON-HT2 (SEQ ID NO:20, que codifica la SEQ ID NO:18) (todas no abarcadas en el texto de las reivindicaciones pero considerados útiles para la comprensión de la invención) con un CTP con o sin un CTP donde las plantas reciben quizalofop-P a índices de 16X (1.28 lb ia/acre) aplicado a V2 seguido por V4 y las fotos tomadas 10 a 14 días después de la aplicación de quizalofop-P.

Figura 6A - Figura 6E. Alineación de secuencia múltiple de secuencias de proteína para RdpA de tipo silvestre de *S.herbicidovorans* (SEQ ID NO:60) y SEQ ID NO:1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, y 46-52 con la secuencia consenso (proporcionada como SEQ ID NO:61) proporcionada en el fondo de cada una de las Figuras 6A, 6B, 6C, 6D, 6E.

Breve descripción de las secuencias

Las **SEQ ID NO:1-3** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado de monocotiledónea MON-HT51. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)

- Las **SEQ ID NO:4-6** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado de monocotiledónea MON-HT52. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- 5 Las **SEQ ID NO:7-8** son la secuencia de aminoácido y secuencia de polinucleótido de codón bacteriano de MON-HT53. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- Las **SEQ ID NO:9-10** son la secuencia de aminoácido y secuencia de polinucleótido de codón bacteriano de MON-HT54. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- 10 Las **SEQ ID NO:11-13** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado de monocotiledónea MON-HT55. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- Las **SEQ ID NO:14-17** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, secuencia de polinucleótido de codón optimizado monocotiledónea, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado dicotiledónea de MON-HT1. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- 15 Las **SEQ ID NO:18-21** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, secuencia de polinucleótido de codón optimizado monocotiledónea, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado dicotiledónea de MON-HT2. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- Las **SEQ ID NO:22-24** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado de monocotiledónea MON-HT3. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- 20 Las **SEQ ID NO:25-27** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado de monocotiledónea MON-HT4. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- 25 Las **SEQ ID NO:28-30** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado de monocotiledónea MON-HT5. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- Las **SEQ ID NO:31-33** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado de monocotiledónea MON-HT6. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- 30 Las **SEQ ID NO:34-36** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado de monocotiledónea MON-HT7. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- Las **SEQ ID NO:37-39** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado de monocotiledónea MON-HT8. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- 35 Las **SEQ ID NO:40-42** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado de monocotiledónea MON-HT9. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- 40 Las **SEQ ID NO:43-45** son la secuencia de aminoácido, secuencia de polinucleótido de codón bacteriano, y secuencia de polinucleótido de codón optimizado de monocotiledónea MON-HT10. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- Las **SEQ ID NO:46-52** (todas las demás junto a SEQ ID NO 51 no están abarcadas por la redacción de las reivindicaciones) son la secuencia de aminoácidos de MON-HT11, MON-HT13, MON-HT14, MON-HT15, MON-HT16, (todo lo anterior no abarcado por la redacción de las reivindicaciones) MON-HT17, y MON-HT18. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- 45 Las **SEQ ID NO:53-59** son las secuencias de polinucleótido de codón optimizado de dicotiledónea de MON-HT11, MON-HT13, MON-HT14, MON-HT15, MON-HT16, (todo lo anterior no abarcado por la redacción de las reivindicaciones) MON-HT17, y MON-HT18. (no abarcado por la redacción de las reivindicaciones)
- La **SEQ ID NO:60** es la secuencia de aminoácido para RdpA de tipo silvestre de *Sphingobium herbicidovorans*. (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención)
- 50 La **SEQ ID NO:61** es la secuencia consenso de la Figura 6A - Figura 6E. (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención)

Descripción detallada

Las siguientes definiciones y procedimientos son proporcionados para definir mejor la invención y para guiar a aquellos de habilidad ordinaria en la técnica en la práctica de la invención. A menos que se indique de otro modo, los términos están siendo entendidos de conformidad con el empleo convencional por aquellos de habilidad normal en la técnica relevante.

La invención supera las limitaciones de la técnica anterior proporcionando proteínas diseñadas por ingeniería, novedosas, referidas en la presente como proteínas MON-HT, y las moléculas de ADN recombinante que las codifican así como también composiciones y procedimientos para usar estas. Las proteínas MON-HT son oxigenasas que pueden inactivar los herbicidas de ariloxifenoxipropionato (AOPP), herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos. Como se usa en la presente, inactivar un herbicida significa hacer que el herbicida no tenga más su actividad herbicida contra una planta. Las proteínas MON-HT presentan nueva selectividad de sustrato, cinéticas de enzima útiles, y estabilidad de enzima incrementada a temperatura elevada. La plantas transgénicas que expresan una proteína MON-HT mejoran la tolerancia a la aplicación de AOPP, herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos.

Proteínas Diseñadas por Ingeniería y Moléculas de ADN Recombinante

La invención proporciona proteínas diseñadas por ingeniería, novedosas y las moléculas de ADN recombinante que las codifican. Como se usa en la presente, el término "diseñado por ingeniería" se refiere a un ADN no natural, proteína u organismo que no podría normalmente ser encontrado en la naturaleza y es creado por intervención humana. Una "proteína diseñada por ingeniería" es una proteína cuya secuencia de polipéptido fue concebida y creada en el laboratorio usando una o más de las técnicas de ingeniería de proteína, tal como diseño de proteína usando mutagénesis de sitio dirigido y evolución dirigida usando mutagénesis aleatoria y barajado de ADN. Por ejemplo, una proteína diseñada por ingeniería puede tener una o más supresiones, inserciones, o sustituciones con relación a la secuencia codificante de la proteína de tipo silvestre y cada supresión, inserción, o sustitución puede consistir de uno o más aminoácidos. Ejemplos de proteínas diseñadas por ingeniería son proporcionadas en la presente como SEQ ID NO:1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, y 46-52 (todos junto a SEQ ID NO 51 no abarcados en la redacción de las reivindicaciones).

Proteínas diseñadas por ingeniería proporcionadas por la invención son enzimas que tienen actividad de oxigenasa. Como se usa en la presente, el término "actividad de oxigenasa" significa la capacidad para oxidar un sustrato transfiriendo el oxígeno a partir del oxígeno molecular al sustrato, co-producto, o un intermediario. La actividad de oxigenasa de las proteínas diseñadas por ingeniería proporcionadas por la invención pueden inactivar uno o más herbicidas de AOPP, herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos.

Como se usa en la presente, "tipo silvestre" significa que se origina naturalmente. Como se usa en la presente, una "molécula de ADN de tipo silvestre", "polipéptido de tipo silvestre", o una "proteína de tipo silvestre" es una molécula de ADN, polipéptido o proteína, que se origina naturalmente, es decir, una molécula de ADN, polipéptido o proteína pre-existente en la naturaleza. Una versión de tipo silvestre de un polipéptido, proteína, o molécula de ADN puede ser útil en comparación con una proteína o gen diseñado por ingeniería. Un ejemplo de una proteína de tipo silvestre útil para comparación con las proteínas diseñadas por ingeniería proporcionadas por la invención es la enzima RdPA de la cepa MH de *Sphingobium herbicidovorans*. Un ejemplo de una molécula de ADN de tipo silvestre útil para comparación con las moléculas de ADN recombinante proporcionadas por la invención es el gen RdPA de la cepa MH de *Sphingobium herbicidovorans*. Una versión de tipo silvestre de una proteína o molécula de ADN puede ser útil como un control en un experimento.

Como se usa en la presente, "control" significa un control experimental diseñado para propósitos de comparación. Por ejemplo, una planta de control en un análisis de planta transgénica es una planta del mismo tipo como la planta experimental (es decir, la planta a ser probada) pero no contiene el inserto transgénico, molécula de ADN recombinante, o constructo de ADN de la planta experimental. Un ejemplo de una planta de control útil para comparación con plantas de maíz transgénicas es el maíz no LH244 no transgénico (Patente Estadounidense No. 6,252,148) y con plantas de soya transgénicas es la soya A3555 no transgénica (Patente Estadounidense No. 7,700,846).

Como se usa en la presente, el término "recombinante" se refiere a un ADN no natural, polipéptido, o proteína que es el resultado de ingeniería genética y como tal podría no encontrarse normalmente en la naturaleza y es creado por intervención humana. Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que no se origina naturalmente y como tal es el resultado de la intervención humana, por ejemplo, una molécula de ADN que codifica una proteína diseñada por ingeniería. Otro ejemplo es una molécula de ADN comprendida de una combinación de al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí, tales como una proteína de ADN codificante de la proteína y un promotor heterólogo operablemente ligado. Un ejemplo de una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN que comprende al menos una secuencia seleccionada a partir de la SEQ ID NO:2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 42, 44, 45 y 53-59 (todas junto a SEQ ID NO 58 no incluidas en la redacción de las reivindicaciones). Un "polipéptido recombinante" o "proteína recombinante" es un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácido que no se origina

naturalmente y como tal es el resultado de la intervención humana, por ejemplo, una proteína diseñada por ingeniería.

El término “transgen” se refiere a una molécula de ADN incorporada artificialmente en el genoma de un organismo como un resultado de la intervención humana, tal como por procedimientos de transformación de plantas. Como se usa en la presente, el término “transgénico” significa que comprende un transgen, por ejemplo una “planta transgénica” se refiere a una planta que comprende un transgen en su genoma y un “rasgo transgénico” se refiere a una característica o fenotipo llevado o conferido por la presencia de un transgen incorporado en el genoma de la planta. Como un resultado de tal alteración genómica, la planta transgénica es algunas veces distintamente diferente de la planta de tipo silvestre relacionada y el rasgo transgénico es un rasgo que no se encuentran naturalmente en la planta de tipo silvestre. Plantas transgénicas de la invención comprenden las moléculas de ADN recombinante y proteínas diseñadas por ingeniería proporcionadas por la invención.

Como se usa en la presente, el término “heterólogo” se refiere a la relación entre dos o más cosas derivadas de diferentes fuentes y de este modo no asociadas normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína es heteróloga con respecto a un promotor operablemente ligado si tal combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Además, una molécula de ADN recombinante particular puede ser heteróloga con respecto a una célula u organismo en el cual es insertada cuando no podría ocurrir naturalmente en tal célula u organismo particular.

Como se usa en la presente, el término “molécula de ADN que codifica una proteína” o “molécula de ADN que codifica un polipéptido” se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótido que codifica una proteína o polipéptido. Una “secuencia codificante de proteína” o “secuencia codificante de polipéptido” significa una secuencia de ADN que codifica una proteína o polipéptido. Una “secuencia” significa un arreglo secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Los límites de una secuencia codificante de proteína o secuencia codificante de polipéptido son usualmente determinados por un codón de inicio de traducción en el término-5' y un codón de detención de traducción en el término-3'. Una molécula codificante de proteína o molécula codificante de polipéptido puede comprender una secuencia de ADN que codifica una proteína o secuencia de polipéptido. Como se usa en la presente, “expresión de transgen”, “que expresa un transgen”, “expresión de proteína”, “expresión de polipéptido”, “que expresa una proteína”, y “que expresa un polipéptido” significa la producción de una proteína o polipéptido a través del proceso de transcribir una molécula de ADN en el ARN mensajero (ARNm) y trasladar el ARNm en las cadenas de polipéptido, las cuales pueden ser finalmente plegadas en las proteínas. Una molécula de ADN que codifica una proteína o molécula de ADN que codifica un polipéptido pueden ser operablemente ligadas a un promotor heterólogo en un constructo de ADN para uso en la expresión de la proteína o polipéptido en una célula transformada con la molécula de ADN recombinante. Como se usa en la presente, “operablemente ligado” significa dos moléculas de ADN ligadas en una manera que así se puede afectar la función de la otra. Moléculas de ADN operablemente ligadas pueden ser parte de una molécula contigua única y pueden o no pueden ser adyacentes. Por ejemplo, un promotor es operablemente ligado con una molécula de ADN que codifica una proteína o molécula de ADN que codifica un polipéptido en un constructo de ADN donde las dos moléculas de ADN están así arregladas de manera que el promotor puede afectar la expresión del transgen.

Como se usa en la presente, un “constructo de DNA” es una molécula de ADN recombinante que comprende dos o más secuencias de ADN heterólogas. Los constructos de ADN son útiles para la expresión del transgen y pueden estar comprendidos en vectores y plásmidos. Los constructos de ADN pueden ser usados en vectores para el propósito de transformación, que es la introducción del ADN heterólogo en una célula hospedera, con el fin de producir plantas y células transgénicas, y como tal pueden estar contenidas en el ADN plásmido o ADN genómico de una planta transgénica, semilla, célula, o parte de la planta. Como se usa en la presente, un “vector” significa cualquier molécula de ADN recombinante que puede ser usada para el propósito de transformación de una planta. Moléculas de ADN recombinante como se exponen en el listado de secuencia, pueden, por ejemplo, ser insertadas en un vector como parte de un constructo que tiene la molécula de ADN recombinante operablemente ligada a un promotor que funciona en una planta para accionar la expresión de la proteína diseñada por ingeniería codificada por la molécula de ADN recombinante. Los procedimientos para la construcción de constructos y vectores de ADN son bien conocidos en la técnica. Los componentes para un constructo de ADN, o un vector que comprende un constructo de ADN, en general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: un promotor adecuado para la expresión de un ADN operablemente ligado, una molécula de ADN operablemente ligada que codifica una proteína, y una región no traducida al 3' (3'-UTR). Los promotores útiles en practicar la presente invención incluyen aquellos que funcionan en una planta para expresión de un polinucleótido operablemente ligado. Tales promotores son variados y bien conocidos en la técnica e incluyen aquellos que son inducibles, virales, sintéticos, constitutivos, temporalmente regulados, espacialmente regulados, y/o espacio-temporalmente regulados. Los componentes opcionales adicionales incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes elementos: 5'-UTR, potenciador, líder, elemento cis-actuante, intrón, péptidos del tránsito de cloroplasto (CTP), y uno o más transgenes del marcador seleccionables.

Los constructos de ADN de la invención pueden incluir una molécula de CTP operablemente ligada a la molécula de ADN que codifica una proteína proporcionada por la invención. Un CTP útil para practicar la presente invención incluye aquellos que funcionan para facilitar la localización de la molécula de proteína diseñada por ingeniería dentro de la célula. Facilitando la localización de la proteína dentro de la célula, el CTP puede incrementar la acumulación de la proteína diseñada por ingeniería, protegerla de la degradación proteolítica, mejorar el nivel de tolerancia al herbicida, y de este modo reducir los niveles de daño después de la aplicación del herbicida. Las moléculas de CTP para uso en

la presente invención se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan al CTP EPSPS de la *Arabidopsis thaliana* (Klee *et al.*, 1987), el CTP EPSPS de *Petunia hybrida* (della-Cioppa *et al.*, 1986), la secuencia señal cab-m7 de maíz (Becker *et al.*, 1992; PCT WO 97/41228) y la secuencia señal de glutatona reductasa de guisante (Creissen *et al.*, 1991; PCT WO 97/41228).

5 Las moléculas de ADN recombinante de la presente invención pueden ser sintetizadas y modificadas por procedimientos conocidos en la técnica, ya sea completamente o en parte, especialmente donde es deseable proporcionar secuencias útiles para manipulación de ADN (tal como sitios de reconocimiento de la enzima de restricción o sitios de clonación a base de recombinación), secuencias preferidas de la planta (tales como empleo de codón de la planta o secuencias consenso Kozak), o secuencias útiles para diseño de constructo de ADN (tales como secuencias espaciadoras o enlazadoras). La presente invención incluye moléculas de ADN recombinante y proteínas
10 diseñadas por ingeniería que comprenden una secuencia de la SEQ ID NO:58. Como se usa en la presente, el término "porcentaje de identidad de secuencia" o "% de identidad de secuencia" se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos idénticos en una secuencia de polinucleótido o polipéptido lineal de una secuencia ("consulta") de referencia (o su hebra complementaria) comparada con una secuencia de prueba ("sujeto") (o su hebra complementaria) cuando las dos secuencias son óptimamente alineadas (con inserciones, supresiones, de aminoácido o nucleótidos apropiados, o huecos que totalizan menos de 20 por ciento de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación). Los alineamientos óptimos de las secuencias para alinear una ventana de comparación son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y pueden ser conducidos por herramientas tales como el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, la búsqueda por el procedimiento de similitud de Pearson y Lipman, y por implementaciones
20 computarizadas de estos algoritmos tales como GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA disponibles como parte del paquete de software de Análisis de Secuencia del GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., San Diego, CA), MEGAlign (DNASTar, Inc., 1228 S. Park St., Madison, Wis. 53715), y MUSCLE (versión 3.6) (RC Edgar, Nucleic Acids Research (2004) 32(5):1792-1797) con parámetros de omisión. Una "fracción de identidad" para segmentos alineados de una secuencia de prueba y una secuencia de referencia es el número de componentes idénticos los cuales son compartidos por las dos secuencias alineadas divididas por el número total de componentes en el segmento de la secuencia de referencia, es decir, la secuencia de referencia completa o una parte definida más pequeña de la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia es representado como la fracción de identidad multiplicada por 100. La comparación de una o más secuencias puede ser a una secuencia de longitud completa o una porción de la misma, o a una secuencia más larga.

Proteínas diseñadas por ingeniería pueden ser producidas cambiando (es decir, modificando) una proteína de tipo silvestre para producir una nueva proteína con una nueva combinación de características de proteína útiles, tales como V_{máx} alterado, K_m, especificidad de sustrato, selectividad de sustrato y estabilidad de proteína. Las modificaciones se pueden hacer a posiciones específicas de aminoácido en una proteína y pueden ser una sustitución del aminoácido encontrado en tal posición en la naturaleza (es decir, en la proteína de tipo silvestre) con un aminoácido diferente. Posiciones de aminoácido ejemplares con relación a la secuencia de proteína de la proteína de tipo silvestre RdpA (SEQ ID NO:60) útil para diseñar por ingeniería la proteína se representan en la Figura 3. Las Figuras 6A, 6B, 6C, 6D, 6E proporcionan un alineamiento de secuencia múltiple de la RdpA de la secuencia de proteína de tipo silvestre y las secuencias de proteína diseñadas por ingeniería SEQ ID NO:1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, y 46-52. Una proteína diseñada por ingeniería puede ser diseñada que tiene al menos aproximadamente 92% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste de la SEQ ID NO:1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, y 46-52. Las proteínas diseñadas por ingeniería proporcionadas por la invención de este modo proporcionan una nueva proteína con una o más características de proteína alterada con relación a la proteína de tipo silvestre encontrada en la naturaleza. En una realización de la invención, una proteína diseñada por ingeniería tiene características de proteína alteradas tales como actividad disminuida o mejorada contra uno o más herbicidas o estabilidad de proteína mejorada comparada con una proteína similar de tipo silvestre, o cualquier combinación de tales características. En una realización, la invención proporciona una proteína diseñada por ingeniería, y la molécula de ADN recombinante que codifica la SEQ ID NO: 51.

Plantas Transgénicas

50 Un aspecto de la invención incluye células de plantas transgénicas, tejidos de plantas transgénicas, plantas transgénicas, y semillas transgénicas que comprenden las moléculas de ADN recombinante y proteínas diseñadas por ingeniería proporcionadas por la invención. Estas células, tejidos, plantas y semillas que comprenden las moléculas de ADN recombinante y proteínas diseñadas por ingeniería presentan tolerancia al herbicida para uno o más de los herbicidas de ariloxifenoxipropionato (AOPP), herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos.

55 Los procedimientos adecuados para la transformación de células de plantas hospederas para uso con la invención actual incluyen virtualmente cualquier procedimiento por el cual el ADN puede ser introducido en una célula (por ejemplo, donde un constructo de ADN recombinante está integrado establemente en un cromosoma de planta) y son bien conocidos en la técnica. Un procedimiento ejemplar y ampliamente utilizado para introducir un constructo de ADN recombinante en las plantas es el sistema de transformación de *Agrobacterium*, el cual es bien conocido por aquellos de habilidad en la técnica. Las plantas transgénicas pueden ser regeneradas a partir de una célula de planta transformada por los procedimientos de cultivo de células vegetal. Una planta transgénica homocigota con respecto a un transgen (es decir, dos copias alélicas del transgen) se pueden obtener por auto-polinización (autofecundación) a

una planta transgénica que contiene un alelo de transgen único con la misma, por ejemplo una planta R0, para producir la semilla R1. Un cuarto de la semilla R1 producida será homocigota con respecto al transgen. Las plantas que crecen a partir de la germinación de la semilla R1 pueden ser probadas por cigosidad, típicamente usando ensayo de SNP, secuenciamiento de ADN, o un ensayo de amplificación térmica que permite la distinción entre heterocigotos y homocigotos, referido como un ensayo de cigosidad.

Las plantas, semillas, partes de plantas, tejidos de plantas, y células proporcionadas por la invención presentan tolerancia al herbicida a uno o más de los herbicidas de AOPP, herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos. Los herbicidas de AOPP dirigen la acetil-coenzima A carboxilasa de la planta (ACCase), la cual es parte de la trayectoria biosintética del ácido graso. Las plantas de grama son sensibles a estos herbicidas debido a que contienen ACCase sensible al herbicida en sus plásticos y citosoles. Los herbicidas de AOPP son bien conocidos en la técnica y comercialmente disponibles. Ejemplos de herbicidas de AOPP incluyen, pero no se limitan a, clodinafop, cihalofop, diclofop, fenoxaprop, fenoxaprop-P, fentaprop, fluazifop, fluazifop-P, haloxifop, isoxapirifop, metamifop, propaquizafop, quizalofop, quizalofop-P, y trifop. Los herbicidas de fenoxiácido y de piridiniloxilácidos son auxinas sintéticas similares al ácido indolacético (IAA) de la hormona de crecimiento vegetal. Las plantas de hoja ancha son sensibles a estos herbicidas, las cuales inducen crecimiento incontrolado, rápido, eventualmente matando a la planta. Ejemplos de herbicidas de fenoxiácido incluyen, pero no se limitan a, 2,4-D; 2,4-DB; clomeprop; diclorprop; fenoprop; MCPA; MCPB, y mecoprop. Ejemplos de herbicidas de piridiniloxiácido incluyen, pero no se limitan a, triclopir; fluroxipir; aminopirialid, clopiralid, y picloram.

Los herbicidas pueden ser aplicados a un área de crecimiento de la planta que comprende las plantas y semillas proporcionadas por la invención como un procedimiento para controlar malezas. Las plantas y semillas proporcionadas por la invención comprenden un rasgo de tolerancia al herbicida y como tal son tolerantes a la aplicación de uno o más herbicidas de AOPP, o herbicidas de fenoxiácido, o herbicidas de piridiniloxilácidos. La aplicación del herbicida puede ser la relación comercial recomendada (1X) o cualquier fracción o múltiple del mismo, tal como dos veces la relación comercial recomendada (2X). Las relaciones de herbicidas pueden ser expresadas como equivalentes por libra por acre (lb ae/acre) o libras de ingrediente activo por acre (lb ia/acre). La aplicación del herbicida comprende al menos un herbicida seleccionado a partir del grupo que consiste de herbicidas de AOPP, y herbicidas de fenoxiácido, y herbicidas de piridiniloxilácidos. El área de crecimiento de la planta puede o no puede comprender plantas de malezas al tiempo de la aplicación del herbicida. Una dosis herbicídicamente efectiva de herbicidas de AOPP para uso en el área para controlar malezas debe consistir de un intervalo desde aproximadamente 0.01 lb ia/acre hasta aproximadamente 16 lb ia/acre durante una estación de crecimiento. Por ejemplo, una relación 1X de quizalofop-P podría ser una relación de 0.08 lb ia/acre. Una dosis herbicídicamente efectiva de herbicidas de fenoxiácido para uso en el área para controlar malezas debe consistir de un intervalo desde aproximadamente 0.01 lb ae/acre hasta aproximadamente 16 lb ae/acre durante una estación de crecimiento. Por ejemplo, una relación 1X de 2,4-D debe ser una relación de aproximadamente 0.75 lb ae/acre hasta 1.0 lb ae/acre. Una dosis herbicídicamente efectiva de herbicidas de piridiniloxiácido para uso en el área para controlar malezas debe consistir de un intervalo desde aproximadamente 0.01 lb ae/acre hasta aproximadamente 16 lb ae/acre durante una estación de crecimiento. Por ejemplo, una relación 1X de fluroxipir debe estar a un intervalo de aproximadamente 0.13 hasta 0.48 lb ae/acre.

La aplicación del herbicida puede ser secuencialmente o mezclada en tanque con una, dos o una combinación de varios herbicidas de AOPP, herbicidas de fenoxiácido, herbicidas de piridiniloxiácidos o cualquier otro herbicida compatible. Las aplicaciones múltiples de un herbicida o de dos o más herbicidas, en combinación o solos, pueden ser usadas durante una estación de crecimiento en áreas que comprenden plantas transgénicas de la invención para el control de un amplio espectro de malezas dicotiledóneas, malezas monocotiledóneas, o ambas, por ejemplo, dos aplicaciones (tales como una aplicación pre-plantación y una aplicación de post-emergencia o una aplicación de pre-emergencia y una aplicación de post-emergencia) o tres aplicaciones (tal como una aplicación pre-plantación, una aplicación de pre-emergencia, y una aplicación de post-emergencia o una aplicación de pre-emergencia y dos aplicaciones post-emergencia).

Como se usa en la presente, "tolerancia" o "tolerancia al herbicida" significa una planta, semilla, tejido de planta, parte de la planta, o célula, con capacidad para resistir los efectos tóxicos de uno o más herbicida(s). La tolerancia al herbicida de una planta, semilla, tejido de planta, parte de la planta, o célula puede ser medida comparando la planta, semilla, tejido de planta, parte de la planta, o célula con un control adecuado. Por ejemplo, la tolerancia al herbicida puede ser medida o evaluada aplicando un herbicida a una planta que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína capaz de conferir tolerancia al herbicida (la planta de prueba) y una planta que no comprende la molécula de ADN recombinante que codifica la proteína capaz de conferir tolerancia al herbicida (la planta de control) y después comparar el daño de la planta de las dos plantas, donde la tolerancia al herbicida de la planta de prueba está indicada por una relación de daño disminuida comparada con la relación de daño de la planta de control. Una planta, semilla, tejido de planta, parte de la planta, o células tolerante al herbicida presenta una respuesta disminuida a los efectos tóxicos de un herbicida cuando se compra con una planta, semilla, tejido de planta, parte de la planta, o célula de control. Como se usa en la presente, un "rasgo de tolerancia al herbicida" es un rasgo transgénico que imparte tolerancia al herbicida mejorada a una planta de control comparado con una planta de control o planta de tipo silvestre.

Las plantas, progenie, semillas, células de planta, y partes de plantas transgénicas de la invención, también pueden contener uno o más rasgos transgénicos. Los rasgos transgénicos adicionales pueden ser introducidos cruzando una

planta que contiene un transgen que comprende las moléculas de ADN recombinante proporcionadas por la invención con otra planta que contiene rasgo(s) transgénico(s) adicional(es). Como se usa en la presente, "cruza" significa reproducción de dos plantas individuales para producir una progenie de planta. Dos plantas transgénicas pueden de este modo ser cruzadas para producir la progenie que contiene los rasgos transgénicos. Como se usa en la presente "progenie" significa la descendencia de cualquier generación de una planta precursora, y progenie transgénica comprende un constructo de ADN proporcionado por la invención y heredado de al menos una planta precursora. Alternativamente, el(los) rasgo(s) transgénico(s) adicionales pueden ser introducidos co-transformando un constructo de ADN para tales rasgo(s) transgénicos adicionales con un constructo de ADN que comprende las moléculas de ADN recombinante proporcionadas por la invención (por ejemplo, con todos los constructos de ADNs presentes como parte del mismo vector usado para la transformación de la planta) o insertando el(los) rasgo(s) adicionales en una planta transgénica que comprende un constructo de ADN proporcionado por la invención o *vice versa* (por ejemplo, usando cualquiera de los procedimientos de transformación de una planta en un planta transgénica o célula de la planta). Tales rasgos transgénicos adicionales incluyen, pero no se limitan a, resistencia al insecto incrementada, eficiencia del uso de agua incrementada, desempeño del rendimiento incrementado, resistencia a la sequía incrementada, calidad de semilla incrementada, calidad nutricional mejorada, producción de semilla híbrida, y tolerancia al herbicida, en los cuales el rasgo es medido con respecto a un tipo de planta silvestre o planta de control. Tales rasgos transgénicos adicionales se conocen por uno de habilidad en la técnica; por ejemplo, una lista de tales rasgos se proporciona en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Servicio de Inspección de Saludo Animal y Vegetal (APHIS) y se pueden encontrar en su sitio de red en www.aphis.usda.gov.

Las plantas transgénicas y progenie que contienen un rasgo transgénico proporcionados por la invención pueden ser usadas con cualquiera de los procedimientos de reproducción que son comúnmente conocidos en la técnica. En líneas de plantas que comprenden dos o más rasgos transgénicos, los rasgos transgénicos pueden ser independientemente segregantes, enlazados o una combinación de ambos en líneas de plantas que comprenden tres o más rasgos transgénicos. El retro-cruzamiento a una planta parenteral y exogamia con una planta no transgénica también están contemplados, como es la propagación vegetativa. Las descripciones de los procedimientos de reproducción que son comúnmente usados para diferentes rasgos y cultivos son bien conocidos por aquellos de habilidad en la técnica. Para confirmar la presencia del(los) transgen(es) en una planta o semilla particular, una variedad de ensayos puede ser realizada. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de biología molecular, tales como manchado Southern y northern, PCR, y secuenciamiento de ADN; análisis bioquímicos, tales como detectar la presencia de un producto de proteína, por ejemplo, por medios inmunológicos (manchados ELISAs y Western) o por función enzimática; los ensayos de parte de planta, tales como ensayos de hoja o raíz; y también, analizando el fenotipo de la planta completa.

La introgresión de un rasgo transgénico en un genotipo de planta se logra como el resultado del proceso de conversión de retrocruza. Un genotipo de planta en el cual un rasgo transgénico ha sido de introgresión puede ser referido como un genotipo, línea, endogámico, o híbrido, convertido por retrocruza. De manera similar, un genotipo de planta que carece del rasgo transgénico deseado puede ser referido como un genotipo, línea, endogámico, o híbrido no convertido.

Como se usa en la presente, el término "que comprende" significa "que incluye pero no se limita a".

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Ingeniería de Proteína Inicial y Análisis de Enzima

Las proteínas diseñadas por ingeniería, novedosas y moléculas de ADN recombinante que codifican estas proteínas se concibieron de y crearon en el laboratorio usando las técnicas de proteína de ingeniería. Las proteínas diseñadas por ingeniería son enzimas que tienen actividad de oxigenasa y fueron diseñadas por ingeniería para tener capacidades alteradas para inactivar los herbicidas de AOPP, herbicidas de fenoxiácido, o ambos con relación a la proteína de tipo silvestre.

Se seleccionaron dieciséis proteínas conocidas con actividad de oxigenasa y se usaron para crear una alineación de secuencia de homología consenso. Esta se usó en combinación con análisis guiados por estructura para informar las estrategias de diseño racional. A partir de estos análisis, cinco regiones cada una de 13 hasta 21 aminoácidos de longitud, referidos como "islas", se seleccionaron para mutagénesis. Las mutaciones en cada una de estas regiones se crearon usando técnicas conocidas por aquellos de habilidad en la técnica, tales como Mutaciones de Barrido de Alanina; Mutaciones de Barrido de Homología; Mutaciones de Barrido de Pro/Gly; Mutaciones o Barrido de Región; y combinaciones de estas varias técnicas (véase, M Lehmann and M Wyss, *Current Opinion in Biotechnology* (2001) 12(4):371-375; B Van den Burg and VGH Eijssink, *Current Opinion in Biotechnology* (2002) 13(4):333-337; y Weiss *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97(16):8950-8954). Usando estos procedimientos, más de 1,200 proteínas únicas diseñadas por ingeniería y las moléculas de ADN recombinante que las codifican se generaron para análisis y caracterización adicional. Debido al gran número de proteínas diseñadas por ingeniería producidas para pruebas, y la necesidad de probar y comparar la actividad enzimática de cada proteína, un sistema de ensayo enzimático y de expresión de proteína bacteriana de alto rendimiento se desarrolló para análisis rápido usando extractos bacterianos crudos.

La expresión de la proteína bacteriana de alto rendimiento se logró sintetizando una molécula de ADN recombinante

que codifica cada proteína diseñada por ingeniería y clonando esta en un vector de expresión bacteriana con una etiqueta de histidina C-terminal (etiqueta-His) operablemente ligada a la molécula de ADN recombinante. Los vectores se usaron para transformar *Escherichia coli* (*E. coli*), y se indujo la expresión bacteriana de las proteínas diseñadas por ingeniería. Durante la noche, se hicieron crecer cultivos de *E. coli* en placas de 96 pocillos y los cultivos se centrifugaron para formar en pelotilla la bacteria. Las pelotillas bacterianas se sometieron a lisis agregando una mezcla principal de 100 ul de lisis (10 ml de Reactivo de Extracción de Proteína Bacteriana (B-PER®) II (Pierce Biotechnology, Rockford, IL; cat. no. 78260); 10 ul de Lisozima (10 ug/ml final; Lysozyme American Bioanalytical, Natick, MA; cat. no. AB011780-00005); y 40 ul de Nucleasa Benzonase® (100 Unidades/ml final, Novagen, Darmstadt, Alemania; cat no 71206-3)) a cada pocillo. Las placas se sometieron a vórtices, después se incubaron por 30 minutos a 4°C. 400 ul de amortiguador MOPS (pH 6.57) se agregaron a cada cavidad y los desechos se formaron en pelotilla por centrifugación. El sobrenadante lisado se removió cuidadosamente y se usó como el extracto bacteriano crudo para análisis enzimático subsecuente.

El ensayo de degradación enzimática de herbicida de alto rendimiento se diseñó para ensayar la actividad enzimática de las proteínas diseñadas por ingeniería hacia varios herbicidas usando el extracto bacteriano crudo. La actividad de oxigenasa de la proteína diseñada por ingeniería (es decir, su actividad enzimática) se midió por un ensayo colorimétrico de punto final utilizando detección de productos de fenol a través de la medición de la absorbancia a 510 nm de 4-aminoantipirina y ferricianuro de potasio. Este ensayo se basa en el ensayo descrito en Fukumori and Hausinger, Journal of Biological Chemistry (1993) 268(32):24311-24317. Las reacciones enzimáticas se sometieron a ensayo en placas de 96 cavidades en un volumen total de 150 ul que contiene: 20 mM de MOPS pH 6.75, 50-200 uM de NH₄FeSO₄, 50-200 uM de ascorbato de sodio, 1 mM de alfa-cetoglutarato (aKG), 10 ul de lisado de células de *E. coli* que contiene la proteína diseñada por ingeniería expresada, y sustrato (ya sea un herbicida de AOPP o herbicida de fenoxiácido). Después del inicio de la reacción con sustrato, la placa se incubó a varias temperaturas por varios tiempos y se apagó (terminó) por la adición de EDTA a una concentración final de 6.25 mM o por la adición de 15 ul de amortiguador a pH 10 (50 mM de ácido bórico, 50 mM de KCl) seguido por 15 ul de 0.2% de 4-aminoantipirina y 15 ul de 0.8% de ferricianuro de potasio. Las mediciones de absorbancia se hicieron en un espectrómetro de laboratorio estándar. Los ensayos fueron escalados como se necesiten para mejorar el rendimiento. Las curvas estándares se generaron usando proteína purificada o estándares de producto.

Usando este sistema de ensayo enzimático y de proteína de expresión bacteriana de alto rendimiento, las actividades de aproximadamente 1200 proteínas diseñadas por ingeniería se midieron con relación a la actividad de una proteína de tipo silvestre seleccionada, RdpA. En un ensayo de placa de 96 pocillos, hubieron 3 controles (extracto bacteriano crudo sin una proteína diseñada por ingeniería) y 3 controles positivos (extracto bacteriano crudo con proteína de tipo silvestre). La absorbancia de las cavidades se midió y la actividad de la proteína se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad}_i = \left(\frac{(\text{Absorbancia}_i - \text{Absorbancia}_{\text{pET}})}{(\text{Absorbancia}_{\text{TS}} - \text{Absorbancia}_{\text{pET}})} \right) \times 100$$

donde, Actividad_i es la actividad de la muestra, Absorbancia_i es la absorbancia de la muestra, Absorbancia_{TS} es la absorbancia de los pocillos que contienen extracto de *E. coli* que expresa la enzima de tipo silvestre, y Absorbancia_{pET} es la absorbancia de las cavidades que contienen extracto de *E. coli* sin una proteína diseñada por ingeniería. La actividad de cada proteína diseñada por ingeniería única se midió por duplicado y se reportó como un promedio de las dos mediciones.

Con base en los resultados a partir del sistema de ensayo enzimático de alto rendimiento, aproximadamente 545 proteínas únicas diseñadas por ingeniería se seleccionaron para análisis adicional usando proteína de ingeniería purificada. En el ensayo de preparación de proteína de ingeniería purificada, se prepararon lisados de expresión bacteriana crudos usando Agarosa Ni-NTA de QUIAGEN® (Qiagen, Valencia, CA, cat. no. 30230) siguiendo los protocolos del fabricante.

Las proteínas diseñadas por ingeniería purificadas se sometieron a ensayo usando el ensayo enzimático de degradación de herbicida descrito en este Ejemplo 1 con el herbicida de AOPP quizalofop como el sustrato. Los resultados de los ensayos de proteína de ingeniería purificada conforman ampliamente los resultados del ensayo enzimático de alto rendimiento. Los resultados del ensayo para siete de las aproximadamente 545 proteínas diseñadas por ingeniería se muestran en la Tabla 1, donde la actividad enzimática es expresada como la actividad de la muestra con relación a la actividad de la RdpA de enzima de tipo silvestre (calculado como se describe en este Ejemplo 1). Estos datos a partir de estos ensayos proporcionan el resultado sorprendente de que las combinaciones de mutaciones específicas funcionan significativamente mejor que otras y demuestran que la actividad enzimática de las proteínas diseñadas por ingeniería podría ser alterada significativamente.

Tabla 1

Número de réplica	Isla 1-2-3	Isla 1-2-5	Isla 1-3-4	Isla 2-3-4	Isla 2-3-5	Isla 2-4-5	Isla 3-4-5
1	-5.94	-4.14	-4.86	-2.84	138.99	48.12	4.06
2	-3.54	-2.64	-3.9	-0.05	117.67	48.84	5.56
3		-3.85			140.75		
4		-0.65			113.77		
5		-0.05			150.58		
6		2.14			141.27		

Usando la información aprendida a partir de los primeros ensayos, la ingeniería de la proteína se hizo como se describe previamente para producir proteínas diseñadas por ingeniería adicionales, las cuales se probaron como se describe en este Ejemplo 1. Los resultados del ensayo enzimático de alto rendimiento con quizalofop-P como el sustrato para cinco de estas proteínas diseñadas por ingeniería adicionales se proporcionan en la Tabla 2 (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención).

Tabla 2

SEQ ID NO	MON-HT	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio de la actividad de quizalofop-P
1	MON-HT51	117.02	124.87	110.17	117.35
4	MON-HT52	92.17	54.46	89.75	78.79
7	MON-HT53	105.34	105.31	106.13	105.60
9	MON-HT54	131.85	149.77	130.56	137.39
11	MON-HT55	118.48	99.79		109.13

La caracterización de la proteína adicional, tal como Km, V_{máx}, y análisis de estructura cristalina, se realizó usando las cinco proteínas diseñadas por ingeniería a partir de la Tabla 2. Para este análisis detallado, la proteína purificada se preparó como sigue: 2 ml de cultivos de la noche de *E. coli* que expresa un transgen que codifica una proteína MON-HT dada se usaron para inocular 500 ml de caldo y se hicieron crecer a 37°C por 4 horas seguido por cultivo a 15°C por aproximadamente 36 horas. Después 250 ml de los 500 ml de cultivo bacteriano se forman en pelotilla por centrifugación y se resuspendieron en 25 ml de amortiguador de extracción (20 mM de Tris, pH 7.8, 300 mM de NaCl, 5 mM de beta-mercaptoetanol (BME), 20 mM de imidazol (Fluka/Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 125 unidades/ml de benzonasa y 10K unidades/ml de lisozima (Novagen, Darmstadt, Alemania). La suspensión celular se pasó a través de un disruptor celular una vez a 20000 psi y después este lisado se clarificó por centrifugación a 35,000 x g por 20 min a 4°C. El sobrenadante que contiene las proteínas etiquetadas con His solubles, se usó para la purificación de la proteína. Para esta purificación, el sobrenadante se aplicó a una columna de 1 ml de HisTrap™ FF (Sefarosa de Níquel) (GE Healthcare, Piscataway, NJ) usando un sistema AKTexpress™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ) siguiendo el protocolo estándar del fabricante. El amortiguador de lavado consiste de: 20 mM de Tris pH 7.8, 300 mM de NaCl, 20 mM de imidazol y 5 mM de BME. La composición del amortiguador de elusión fue la misma como el amortiguador de lavado excepto con 500 mM de imidazol. El eluato de la columna de níquel se desaló en una columna fina G-25 de Quick Spin Protein Sephadex (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) siguiendo el protocolo del fabricante. La proteína eluada estuvo en amortiguador que consiste de: 20 mM de Tris pH 7.8, 50 mM de NaCl y 5 mM de BME. La pureza del extracto de proteína se evaluó por análisis de SDS-PAGE. La concentración de la proteína se determinó por ensayo Bradford usando reactivo de tinte de Ensayo de Proteína Bio-Rad (Biorad, Hercules, CA, cat no 500-0006).

La proteína purificada para las cinco proteínas diseñadas por ingeniería se analizó usando el ensayo de enzima descrito en este Ejemplo 1, pero con cuatro diferentes herbicidas de AOPP como sustratos: quizalofop-P, haloxifop, fenoxaprop, y fluazifop. Se generaron curvas estándares usando 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), el cual se usó para producir una curva estándar de fenol general. La cantidad de fenol generado en el ensayo por las proteínas diseñadas por ingeniería se calculó con base en esta curva estándar. Los controles fueron enzima de tipo silvestre purificada, sin enzima y sin sustrato. Las mediciones de cinéticas de la enzima de las cinco proteínas diseñadas por ingeniería se hicieron usando 0, 20, 40, 80, 160, 320, 640, o 1280 µM de herbicidas quizalofop-P, haloxifop, fenoxaprop, o fluazifop.

La Tabla 3 (no abarcada por la redacción de las reivindicaciones) muestra los Km y Vmáx (expresados como valores relativos) medidos para las cinco proteínas con los cuatro sustratos de herbicida AOPP. Las características de la proteína de estas cinco proteínas diseñadas por ingeniería con cada uno de los cuatro herbicidas de AOPP como sustratos demostró que la actividad enzimática, es decir Km y Vmáx, de las proteínas diseñadas por ingeniería podría ser alterada significativamente a través de la ingeniería de proteínas.

Tabla 3

	Quizalofop-P		Haloxifop		Fenoxaprop		Fluazifop	
	Km (uM)	Vmáx	Km (uM)	Vmáx	Km (uM)	Vmáx	Km (uM)	Vmáx
MON-HT51	570	120	250	48	870	180	4.0	12
MON-HT52	420	39	280	45	490	420	14	43
MON-HT53	690	95	290	64	1100	640	1.0	40
MON-HT54	560	32	380	40	2100	630	ND	ND
MON-HT55	250	320	450	190	200	450	50	320

Ejemplo 2: Expresión de Proteínas Diseñadas por Ingeniería en Maíz

Se construyeron vectores de transformación de planta que comprende cada uno una molécula de ADN recombinante que codifica una de las tres proteínas diseñadas por ingeniería con la secuencia codificante de proteína optimizada para la expresión de monocotiledónea, MON-HT51 (SEQ ID NO:3), MON-HT52 (SEQ ID NO:6), y MON-HT55 (SEQ ID NO:13) (todo lo anterior no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para la comprensión de la invención). Estos vectores se crearon usando diferentes combinaciones de promotor, líder, intrón, y 3'UTR y con y sin un CTP operablemente ligado a la secuencia codificante de proteína. También incluido en los vectores está un segundo casete de ADN que comprende una secuencia codificante cp4-EPSPS para ser usada en las plantas transgénicas para tolerancia a glifosato. Embriones de maíz inmaduro (LH244) se transformaron con estos vectores usando *Agrobacterium tumefaciens* y procedimientos estándares conocidos en la técnica. Las plántulas transgénicas R0 regeneradas se hicieron crecer en el invernadero y se rociaron a aproximadamente la etapa de crecimiento V2-V4 con 0.04 o 0.08 lb ia/acre de quizalofop-P (Assure™ II, E.I. DuPont), que representa relaciones 0.5X y 1X, respectivamente. Las muestras de hoja se usaron para identificar plantas transgénicas con una copia única del inserto de ADN transgénico (es decir, plantas de evento único). Plantas R0 que contienen solamente una copia única y pasaron ya sea el ensayo de atomización de quizalofop-P de 0.5X o 1X se autofecundaron para producir la semilla R1. No se obtuvieron eventos con los constructos que contienen MON-HT52. Solamente un evento se regeneró a partir del constructo que contiene MON-HT51 con un CTP y a partir del constructo que contiene MON-HT51 sin un CTP. Se transformaron dos pares de vectores que contienen MON-HT55, con cada par siendo diferente solamente en que contiene un CTP o que no contiene un CTP.

Plantas R1 que expresan MON-HT55 con y sin un CTP operablemente ligado se hicieron crecer en el invernadero y se aplicó herbicida quizalofop-P en la etapa de crecimiento V2 a una relación de 0.08 lb ae/acre (1X). Las plantas se evaluaron para determinar el daño once días después del tratamiento. Las plantas R1 se segregaron para el rasgo en la relación típica Mendeliana, y los números esperados (~25%) de segregantes nulos (plantas de progenie que no contienen el rasgo transgénico) se observaron que no sobreviven al tratamiento de herbicida. Todas las plantas transgénicas R1 que expresan MON-HT55 (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) con un CTP operablemente ligado, con la excepción de aquellas que representan un evento, mostraron solamente moteado clorótico menor en las hojas más jóvenes expuestas después de la aplicación de quizalofop-P. No se registraron registros de daño de más del 5% para estas plantas después de la aplicación del herbicida. Las plantas transgénicas no rociadas también no difieren fenotípicamente a partir de las plantas de control no rociadas. La Figura 1A muestra las plantas de control LH244 y plantas transgénicas que comprenden MON-HT55 (SEQ ID NO:13) 18 días después de la aplicación de quizalofop-P.

Para evaluar el efecto de usar un CTP para dirigir la proteína diseñada por ingeniería al cloroplasto de la célula vegetal, se compararon plantas transgénicas que comprenden un inserto de transgen con y sin un CTP operablemente ligado a la secuencia codificante de proteína. Las plantas que comprenden un CTP operablemente ligado a la secuencia codificante de proteína mostraron mejor tolerancia a quizalofop-P comparado con aquellas sin un CTP. En pruebas en invernadero de R1 descritas en este Ejemplo 2, la mayoría de las plantas transgénicas que comprenden un CTP operablemente ligado a la secuencia codificante de proteína mostraron completa tolerancia a quizalofop-P. Las plantas que no comprenden un CTP operablemente ligado a la secuencia codificante de proteína mostraron tolerancia a quizalofop-P pero con algunos fenotipos de daño moderado. Estos resultados demuestran que el uso de un CTP para

dirigir la proteína diseñada por ingeniería al cloroplasto de la célula vegetal mejora la tolerancia a quizalofop-P a la planta transgénica. Este hallazgo inesperado se probó nuevamente en ensayos de campo de eficacia de rasgos con plantas R1 que comprenden ya sea MON-HT51 con o sin un CTP operablemente ligado a la secuencia codificante de proteína o MON-HT55 con o sin un CTP operablemente ligado a la secuencia codificante de proteína. Estas plantas R1 fueron de copia única, pero fueron todavía segregantes. En este ensayo de campo, la semilla se plantó en el campo y se trató como sigue: 2X (0.16 lb ia/acre) de quizalofop-P en la pre-plantilla, 2X (0.14 lb ia/acre) de haloxifop en la etapa de crecimiento V4, después quizalofop-P 2X en la etapa de crecimiento V8. Un porcentaje superior de plantas que comprende un CTP operablemente ligado a la secuencia codificante de proteína sobreviven a las aplicaciones de quizalofop-P y haloxifop y tienen registros de daño inferior comparado con plantas que no comprenden un CTP operablemente ligado a la secuencia codificante de proteína. Los datos son proporcionados en la Tabla 4. Esto confirma el hallazgo inesperado de que un CTP operablemente ligado a la secuencia codificante de proteína confiere tolerancia superior a la planta a la aplicación de herbicida por las proteínas diseñadas por ingeniería.

Tabla 4

Proteína	CTP	Eventos únicos	% promedio de daño de herbicida
MON-HT51	No	1	95%
MON-HT51	Sí	1	35%
MON-HT55	No	12	49%
MON-HT55	Sí	3	25%
MON-HT55	No	2	90%
MON-HT55	Sí	7	24%

Se condujeron ensayos en campo para determinar la eficacia del rasgo endogámico para evaluar la tolerancia a los herbicidas de AOPP y la sensibilidad a los herbicidas de ciclohexandionas (CHD) en un antecedente endogámico. Las plantas endogámicas R2 se generaron por autofecundación de una planta R1 transgénica homocigota y se recolectó la semilla. Las plantas endogámicas R2 que contienen MON-HT55 (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) con o sin un CTP o MON-HT51 (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) con un CTP, se evaluaron en dos ubicaciones de campo. El tratamiento de herbicida fue quizalofop-P 2X a 0.16 lb ia/acre aplicado PRE (después de la plantación pero antes de la emergencia) seguido por quizalofop-P a 0.16 lb ia/acre aplicado a una etapa de crecimiento V4 seguido por quizalofop-P a 0.16 lb ia/acre aplicado a una etapa de crecimiento V8. Las parcelas se evaluaron para daño al cultivo 7-10 días después de la aplicación del herbicida en una escala de 0-100 con cero siendo sin daño y 100 siendo muerte completa del cultivo. Todos los datos se sometieron a análisis de varianza y los medios se separaron en LSD (0.05). La mayoría de las plantas R1 endogámicas no mostraron daño, confirmando que tanto MON-HT55 como MON-HT51, con o sin un CTP, confieren tolerancia al quizalofop-P en maíz. Para probar la sensibilidad a herbicidas de CHD, lo cual es deseable para uso en control voluntario, las plantas se trataron con una relación 1X de cletodim (0.25 lb ia/acre) en la etapa de crecimiento V8. El control voluntario usando una relación 1X de cletodim fue 100% efectivo para todas las plantas transgénicas probadas. Se condujeron ensayos de campo para determinar el rasgo híbrido para evaluar la tolerancia a los herbicidas de AOPP y sensibilidad a los herbicidas de ciclohexandionas (CHD) en un antecedente híbrido. Las plantas híbridas F1 se produjeron cruzando una planta endogámica R1 con una planta no transgénica y recolectando la semilla. Las plantas F1 resultantes que contienen MON-HT55 (SEQ ID NO:13) con o sin un CTP o MON-HT51 (SEQ ID NO:3) sin un CTP se evaluaron en seis ubicaciones de campo. Se condujeron ensayos de campo para determinar la eficacia del rasgo híbrido en seis ubicaciones bajo un intervalo de condiciones ambientales, que incluyen alto calor y condiciones de sequía durante la estación de campo. Esto permite a la proteína diseñada por ingeniería ser evaluada en maíz bajo condiciones de alta temperatura y estrés de agua. Los datos son proporcionados en la Tabla 5. El daño inicial a partir de aplicaciones 2X de quizalofop-P fue superior que el deseado (>10% daño) a 7-10 días después de la aplicación. Las plantas eventualmente crecieron de la mayoría dañadas, con en general menos daño a partir de la aplicación de la etapa de crecimiento V8 como se compara con la aplicación en etapa de crecimiento V4. El daño excesivo también se observó cuando se aplicó quizalofop-P muy tempranamente (por ejemplo, en la etapa de crecimiento VE-V2).

Tabla 5

Proteína	CTP	Eventos únicos evaluados	% de daño después del rocío V4	% de daño después del rocío V8
MON-HT51	Sí	4	51.8	33.3
MON-HT55	No	9	46.8	78.8
MON-HT55	Sí	17	42.6 - 48.3	14.2 - 38.8

El hallazgo de que las plantas híbridas que expresan las proteínas diseñadas por ingeniería MON-HT55 o MON-HT51 (ambas no están abarcadas en la redacción de las reivindicaciones pero se consideran útiles para comprender la invención) fueron sensibles a la aplicación de quizalofop-P cuando crecen en condiciones de campo de alta temperatura, se confirmó usando un ensayo a base de planta. El ensayo a base de planta se designó para probar la tolerancia a quizalofop-P de híbridos F1 en la cámara de crecimiento previo a las pruebas de campo. El ensayo se desarrolló usando híbridos F1 de plantas que contienen eventos de maíz NK603 (Patente Estadounidense No. 8,273,959) x MON89034 (Patente Estadounidense No. 8,581,047) e híbridos F1 de plantas que contienen MON-HT55 x MON89034. La semilla de híbrido F1 se germinó en una cámara de crecimiento por 1 semana y después se movió a una de las tres cámaras de crecimiento diferentes para aclimatarse por dos días a temperaturas del día/noche de 20°C/20°C, 28°C/20°C, y 38°C/30°C previo a la aplicación de 2X (0.16 lb ia/acre) de quizalofop-P. Como se esperaba, las plantas que no contienen MON-HT55 a todos los regímenes de temperatura fueron severamente dañadas por la aplicación de quizalofop-P 2X (Figura 1B). Las plantas transgénicas que contienen MON-HT55 mostraron buena tolerancia a la aplicación de quizalofop-P 2X cuando se aclimataron a temperaturas de día/noche de 20°C/20°C o 28°C/20°C, pero mostraron sensibilidad significativa cuando se aclimataron a temperaturas de día/noche de 38°C/30°C (Figura 1C). Esto confirmó que el ensayo a base de planta podría ser usado para seleccionar proteínas en plantas en la cámara de crecimiento para actividad sensible a la temperatura.

Los datos demuestran que las proteínas diseñadas por ingeniería podrían ser expresadas en plantas transgénicas para conferir tolerancia al herbicida y que las plantas transgénicas no rociadas no difieren fenotípicamente a partir de las plantas de control no rociadas. Los datos también confirman que la expresión de las proteínas diseñadas por ingeniería en plantas permite el uso de herbicidas de CHD para el control voluntario. Inesperadamente, los datos mostraron que el uso de un CTP para dirigir el cloroplasto de la proteína diseñada por ingeniería mejora el rasgo de tolerancia al herbicida y que la tolerancia al herbicida proporcionada por las proteínas diseñadas por ingeniería fue sensible a la temperatura, disminuyendo bajo condiciones de alta temperatura.

Ejemplo 3: Optimización de Proteínas Diseñadas por Ingeniería

Para crear proteínas diseñadas por ingeniería optimizadas por actividad en temperaturas superiores, el análisis de porción de proteína usado en las primeras dos rondas de ingeniería de proteína se combinó con los datos de la estructura cristalina para varias de las proteínas diseñadas por ingeniería. Esto se usó para informar rondas adicionales de mutagénesis, realizadas como se describe previamente, y aproximadamente 1400 proteínas diseñadas por ingeniería adicionales fueron de este modo generadas. Estas se combinaron con las aproximadamente 1200 proteínas diseñadas por ingeniería descritas en el Ejemplo 1 para un total de aproximadamente 2600 proteínas diseñadas por ingeniería para selección con el nuevo ensayo de sensibilidad a la temperatura para identificar proteínas optimizadas para determinar la actividad en temperaturas superiores.

Para analizar estas proteínas diseñadas por ingeniería por actividad en temperaturas superiores, el ensayo enzimático *in vitro* en el Ejemplo 1 se modificó para especificar de pre-calentamiento de todos los componentes del ensayo a la temperatura deseada por 5 minutos antes de combinar los componentes y después mantener la reacción a la temperatura deseada por la duración de la reacción. Para normalizar las mediciones de ensayo, se usó quizalofop-P como el sustrato para la reacción y la actividad enzimática se normalizó con base en las lecturas a 25°C. Usando estos parámetros, se calculó la temperatura a la cual la actividad enzimática fue la mitad de la máxima ($T_{1/2}$). La $T_{1/2}$ para MON-HT55 se calculó por ser 29°C, y la $T_{1/2}$ para RdpA de tipo silvestre se calculó para ser 38°C (Figura 2A).

Debido al gran número de variantes a probar, se usó un proceso de selección de nivel cinco. La Tabla 6 muestra el número aproximado de variantes probadas en las diferentes selecciones.

Tabla 6

	Proteínas diseñadas por ingeniería probadas
Primera selección	~2600
Segunda selección	~1250
Tercera selección	94
Cuarta selección	47
Quinta selección	11

La primera selección se realizó con aproximadamente 2600 proteínas diseñadas por ingeniería y se usó el sistema de ensayo enzimático y de proteína de expresión bacteriana de alto rendimiento con lisados bacterianos crudos como se describe en el Ejemplo 1 pero modificado para ser conducido a las temperaturas deseadas de 25°C y 40°C con el desarrollo de color post-apagado hecho a 25°C. De esta selección, aproximadamente 1250 proteínas diseñadas por ingeniería fueron seleccionadas y avanzadas. La segunda selección fue similar, pero incluye muestras a través de la normalización de la proteína. De esta selección, 94 proteínas diseñadas por ingeniería se seleccionaron y avanzaron. La tercera selección usó la proteína purificada con el ensayo enzimático de degradación de herbicida como se describe en el Ejemplo 1, pero modificado para ser conducido a las temperaturas deseadas de 25°C y 40°C con el desarrollo de color post-apagado hecho a 25°C. De esta selección, 47 proteínas diseñadas por ingeniería se seleccionaron y avanzaron. La cuarta selección se hizo usando proteína purificada, las concentraciones de proteína se normalizaron, y la selección incluyó quizalofop-P y (para una subserie de las variantes de proteína) 2,4-D como sustratos con ensayos de punto final hechos a 23°C y 40°C. A partir de esta selección, treinta proteínas diseñadas por ingeniería se seleccionaron y avanzaron.

Para la quinta selección, la proteína recombinante para cada una de las once proteínas diseñadas por ingeniería se produjo y purificó para un análisis bioquímico en profundidad. Este análisis bioquímico incluye: (1) análisis de cinética ($V_{\max}$ y K_m), (2) ensayos de actividad sobre un intervalo de temperaturas, (3) análisis de fusión de proteína, (4) actividad en sustratos herbicidas de AOPP adicionales, y (5) análisis de espectrometría de masas en péptidos para confirmar la identidad. Los análisis bioquímicos también se hicieron con la proteína de tipo silvestre recombinante purificada y proteína MON-HT55 (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerada útil para comprender la invención) por comparación. Para el análisis de cinética, se condujo un ensayo de punto final a 23°C con ya sea quizalofop-P o 2,4-D como sustrato. Las proteínas recombinantes para estos ensayos se produjeron en bacterias y se purificaron usando una etiqueta 6-His fusionada al extremo C-terminal de la proteína. Los resultados de los análisis cinéticos con ya sea quizalofop-P o 2,4-D como sustrato son representados para diez de las proteínas diseñadas por ingeniería, proteína de tipo silvestre, y proteína MON-HT55 en la Tabla 7 (el error estándar se muestra en paréntesis). El $V_{\max}$ se expresa como actividad específica, enzima-1 mg de producto de herbicida μmol ; K_m se expresa como mM de sustrato herbicida. NDB indica que la actividad enzimática puede ser evidente a concentraciones superiores de herbicida, pero la actividad bajo las concentraciones probadas no fue bastante fuerte para proporcionar la caracterización cinética apropiada. Para MON-HT55 (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerada útil para comprender la invención), bajos niveles de actividad ($V_{\max}$) con 2,4-D como el sustrato resultaron en baja confianza en el valor reportado. MON-HT7 (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerada útil para comprender la invención) tiene un $V_{\max}$ con quizalofop-P que es aproximadamente 40% mayor que la enzima de tipo silvestre y un $V_{\max}$ para 2,4-D que es solamente aproximadamente la mitad de aquel de la enzima de tipo silvestre. MON-HT1 (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerada útil para comprender la invención) tiene un $V_{\max}$ para quizalofop-P que es aproximadamente la mitad de aquel de la enzima de tipo silvestre y un $V_{\max}$ para 2,4-D que es 9.5-veces superior que aquel de la enzima de tipo silvestre. La diferenciación de las cinéticas de proteína para MON-HT1 y MON-HT7 fueron sorprendentes debido a que existen solamente cuatro diferencias de aminoácido entre MON-HT1 y MON-HT7. Específicamente, MON-HT1 tiene los siguientes aminoácidos en la posición indicada: I82; F105; T112; y V273, y MON-HT7 tienen los siguientes aminoácidos en la posición indicada: L82; V105; S112; y A273.

Tabla 7

Proteína	V _m Quizalofop	K _m Quizalofop	V _m 2,4-D	K _m 2,4-D
MON-HT55 (SEQ ID NO:11)	0.44 (-0.04)	0.32 (-0.07)	0.03 (-0.02)	0.69 (-0.66)
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	0.76 (-0.04)	0.17 (-0.03)	0.95 (-0.03)	0.03 (0.00)
MON-HT2 (SEQ ID NO:18)	1.41 (-0.11)	0.41 (-0.06)	0.23 (-0.01)	0.04 (-0.01)
MON-HT3 (SEQ ID NO:22)	0.77 (-0.04)	0.38 (-0.05)	0.10 (-0.01)	0.27 (-0.06)
MON-HT4 (SEQ ID NO:25)	0.30 (-0.02)	0.24 (-0.05)	NDB	NDB
MON-HT5 (SEQ ID NO:28)	0.57 (-0.03)	0.17 (-0.03)	NDB	NDB
MON-HT6 (SEQ ID NO:31)	0.39 (-0.03)	0.10 (-0.03)	NDB	NDB
MON-HT7 (SEQ ID NO:34)	1.94 (-0.12)	0.33 (-0.05)	0.04 (-0.01)	0.06 (-0.04)
MON-HT8 (SEQ ID NO:37)	0.46 (-0.02)	0.11 (-0.02)	0.11 (-0.01)	0.14 (-0.05)
MON-HT9 (SEQ ID NO:40)	0.53 (-0.02)	0.10 (-0.01)	NDB	NDB
MON-HT10 (SEQ ID NO:43)	0.78 (-0.05)	0.13 (-0.03)	NDB	NDB
RdpA de tipo silvestre	1.38 (-0.06)	0.27 (-0.03)	0.10 (-0.01)	0.03 (-0.01)

La actividad enzimática sobre un intervalo de temperaturas se analizó en profundidad para MON-HT1, MON-HT2, MON-HT7, y MON-HT8 (todo lo anterior no está abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero se considera útil para la comprensión de la invención.). Estos ensayos se condujeron como se describe anteriormente. Se usó Quizalofop-P o 2,4-D como el sustrato para estas reacciones y la actividad se normalizó con base en la actividad de la enzima de tipo silvestre a 25°C. Las curvas de actividad obtenidas son representadas en la Figura 2B (con quizalofop-P como el sustrato) y Figura 2C (con 2,4-D como el sustrato). Usando quizalofop-P como el sustrato, MON-HT55 fue el más sensible a la temperatura, con una $T_{1/2}$ de 29°C. La enzima de tipo silvestre tiene una $T_{1/2}$ de 38°C. MON-HT1 y MON-HT8 fueron menos sensibles a la temperatura que la enzima de tipo silvestre con una $T_{1/2}$ de 42°C y 41°C, respectivamente, en tales temperaturas la enzima de tipo silvestre es 90% inactiva. MON-HT2 y MON-HT7 fueron mucho menos sensibles a la temperatura con una $T_{1/2}$ de 46°C y 47°C, respectivamente, en tales temperaturas la enzima de tipo silvestre es completamente inactiva. Cuando se usa 2,4-D como el sustrato, la enzima de tipo silvestre tiene una $T_{1/2}$ de 36°C. MON-HT2, MON-HT7, y MON-HT8 fueron todos ligeramente más sensibles a la temperatura con una $T_{1/2}$ inferior que la enzima de tipo silvestre. MON-HT1 fue ligeramente menos sensible a la temperatura, con una $T_{1/2}$ de aproximadamente 1°C superior que la enzima de tipo silvestre.

También se condujo un análisis de fusión de proteína. Para las determinaciones de fusión de proteína, la enzima purificada se agregó a placas microtituladoras de 96 pocillos en amortiguador de almacenamiento estándar (30 mM de Tris pH7.5, 150 mM de NaCl) con o sin 50 uM de Fe^{2+} y 1.0 mM de aKG. El despliegue de la proteína entonces se detectó con tinte de gel de proteína anaranjado SYPRO® (Invitrogen™ catálogo #S6651, Life Technologies, Grand Isla, NY) en una máquina de PCR en tiempo real BioRad CFX96™ (BioRad, Hercules, CA) con lecturas tomadas entre 10°C a 95°C en etapas a 0.5°C. La $T_{1/2}$ (aquí, las temperaturas donde 50% de la proteína es desplegada) se muestra en la Tabla 8. La enzima de tipo silvestre muestra estabilización con 50 uM de Fe^{2+} y 1.0 mM de aKG. Por el contrario, 50 uM de Fe^{2+} y 1.0 mM de aKG tienen poco efecto en la estabilidad de cualquiera de las proteínas diseñadas por ingeniería. MON-HT55, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT6, y MON-HT10 (todo lo anterior no está abarcado en la redacción de las reivindicaciones) tienen temperaturas de fusión en el intervalo de 41°C a 48°C, lo cual está por debajo de la temperatura de fusión de la enzima de tipo silvestre. MON-HT1, MON-HT2, MON-HT5, MON-HT7, MON-HT8, y MON-HT9 (todo lo anterior no está abarcado en la redacción de las reivindicaciones) tienen temperaturas de fusión entre 58°C y 67°C, las cuales son 8°C a 17°C superiores que la enzima de tipo silvestre. Para MON-HT7 y MON-HT1, la diferencia en el punto de fusión fue 11°C en amortiguador sin Fe^{2+} y aKG y 8°C en amortiguador con Fe^{2+} y aKG. Esto fue sorprendente puesto que hubieron solamente cuatro diferentes diferencias de aminoácido entre las dos enzimas. Estos datos en el punto de fusión de las enzimas confirma que las proteínas diseñadas por ingeniería han sido optimizadas para la estabilidad de la proteína a temperaturas superiores. Estos datos también igualan los resultados del ensayo de actividad enzimática para las proteínas conducidas a diferentes temperaturas.

Tabla 8

Proteína	Amortiguador	Amortiguador más Fe ²⁺ y aKG
MON-HT55 (SEQ ID NO:11)	41°C	41°C
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	56°C	59°C
MON-HT2 (SEQ ID NO:18)	55°C	58°C
MON-HT3 (SEQ ID NO:22)	46°C	48°C
MON-HT4 (SEQ ID NO:25)	43°C	44°C
MON-HT5 (SEQ ID NO:28)	60°C	61°C
MON-HT6 (SEQ ID NO:31)	44°C	44°C
MON-HT7 (SEQ ID NO:34)	67°C	67°C
MON-HT8 (SEQ ID NO:37)	61°C	61°C
MON-HT9 (SEQ ID NO:40)	61°C	60°C
MON-HT10 (SEQ ID NO:43)	44°C	44°C
RdpA de tipo silvestre	42°C	50°C

La actividad enzimática de variantes de proteína MON-HT con haloxifop, fenoxaprop, fluazifop, y diclorprop como sustratos se determinó usando el ensayo de actividad enzimática conducido a 23°C con la enzima purificada. La actividad se registró como la actividad máxima como un porcentaje de la enzima de actividad de tipo silvestre, la cual se ajustó a 100%. Los datos son proporcionados en la Tabla 9. MON-HT55, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT5, y MON-HT9 (todo lo anterior no está abarcado en la redacción de las reivindicaciones) tienen actividades máximas para todos los cuatros sustratos inferiores que, o iguales a, la actividad máxima de la enzima de tipo silvestre con el mismo sustrato. Con haloxifop como el sustrato MON-HT1, MON-HT2, MON-HT7, y MON-HT10 (todo lo anterior no está abarcado en la redacción de las reivindicaciones) tienen una actividad máxima que fue mayor que aquella de la enzima de tipo silvestre. Con fenoxaprop como el sustrato MON-HT1, MON-HT2, MON-HT6, MON-HT7, MON-HT8, y MON-HT10 (todo lo anterior no está abarcado en la redacción de las reivindicaciones) tienen una actividad máxima que fue mayor que aquella de la enzima de tipo silvestre. Con fluazifop como el sustrato MON-HT2 y MON-HT7 tienen una actividad máxima que fue mayor que aquella de la enzima de tipo silvestre. Con diclorprop como el sustrato MON-HT1, MON-HT7, y MON-HT8 (todo lo anterior no está abarcado en la redacción de las reivindicaciones) tiene una actividad máxima que fue mayor que aquella de la enzima de tipo silvestre.

Tabla 9

Proteína	Haloxifop	Fenoxaprop	Fluazifop	Diclorprop
MON-HT55 (SEQ ID NO:11)	58	34	38	31
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	134	175	67	175
MON-HT2 (SEQ ID NO:18)	142	121	124	92
MON-HT3 (SEQ ID NO:22)	67	83	60	100
MON-HT4 (SEQ ID NO:25)	49	53	52	39
MON-HT5 (SEQ ID NO:28)	100	92	46	36
MON-HT6 (SEQ ID NO:31)	75	333	47	37
MON-HT7 (SEQ ID NO:34)	193	210	161	210
MON-HT8 (SEQ ID NO:37)	99	106	50	106
MON-HT9 (SEQ ID NO:40)	91	67	41	19

MON-HT10 (SEQ ID NO:43)	124	233	48	29
RdpA de tipo silvestre	100	100	100	100

Las identidades enzimáticas se confirmaron usando espectroscopia de masas. Para este análisis, la proteína purificada se separó en un gel PAGE y se tiñó. Las bandas teñidas fueron entonces cortadas, desteñidas y digeridas con tripsina usando protocolos estándares. Las preparaciones de proteína digeridas con tripsina se separaron en un Sistema Dionox UltiMat® 3000 RSLCnano LC (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA) usando una columna de Guarda Thermo Scientific™ AQUASIL™ C-18 Javelin™ bajo condiciones estándares e inyectó para análisis de MS-MS usando un Espectrómetro de Masas Quadrupole-Orbitrap Híbrido Thermo Scientific™ Q Exactive™ (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA).

Para optimizar proteínas para actividad incrementada en la presencia de herbicidas de fenoxiacido, se realizó ingeniería computacional de proteína en la estructura cristalina para varias de las proteínas diseñadas por ingeniería. Esto se usó para informar rondas adicionales de mutagénesis, realizada como se describe previamente pero usando la secuencia bacteriana, SEQ ID NO:15, que codifica la secuencia de proteína MON-HT1 (SEQ ID NO:14) (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) como la secuencia de partida. Aproximadamente 472 proteínas diseñadas por ingeniería adicionales se generaron. Estas se combinaron con las aproximadamente 2600 proteínas diseñadas por ingeniería descritas en el Ejemplo 1 y Tabla 6 para un total de aproximadamente 3072 proteínas diseñadas por ingeniería para identificar proteínas optimizadas para actividad en la presencia de 2,4-D. La primera selección de las nuevas variantes fue la expresión de la proteína bacteriana de alto rendimiento (HTP) y sistema de ensayo enzimático con lisados bacterianos crudos como se describe en el Ejemplo 1, pero modificado para ser conducido a las temperaturas deseadas de 25°C y 40°C con el desarrollo de color post-apagado hecho a 25°C. Después de esta selección de HTP, aproximadamente 34 proteínas diseñadas por ingeniería se seleccionaron y avanzaron en selección con normalización de la proteína a través de todas las muestras. A partir de esta selección, 12 proteínas diseñadas por ingeniería se seleccionaron y avanzaron para selección con proteína purificada ensayada con el ensayo enzimático de degradación de herbicida como se describe en el Ejemplo 1. La estabilidad de calor de la enzima se ensayó con ensayos de fusión de proteína limitada. A partir de esta selección, 7 proteínas diseñadas por ingeniería se seleccionaron y avanzaron para la prueba de la planta. Tres variantes de enzima se seleccionaron para la caracterización detallada usando proteína purificada, donde las concentraciones de proteína fueron normalizadas, y la selección incluye quizalofop-P y 2,4-D como sustratos, así como también herbicidas adicionales mostrados en la Tabla 10 y Tabla 12 y caracterización de fusión de la proteína.

Los análisis de cinética usando un ensayo de punto no final se condujeron a 23°C con ya sea quizalofop-P o 2,4-D como sustrato, como se detalla anteriormente para la proteína purificada de la enzima de tipo silvestre, MON-HT1, MON-HT13, MON-HT15, (las tres anteriores no están abarcadas en la redacción de las reivindicaciones pero se consideran útiles para comprender la invención) y MON-HT17. Los datos demuestran un mejoramiento significativo e inesperado de la actividad enzimática de MON-HT13, MON-HT15, y MON-HT17 con relación a tanto la RdpA de enzima de tipo silvestre como la enzima MON-HT1 (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerada útil para comprender la invención) cuando se prueba con 2,4-D como un sustrato. Específicamente, las tres variantes mostraron un incremento aproximadamente de 2.5 a 3 veces en actividad ($V_{m\acute{a}x}$) con relación a MON-HT1. La actividad enzimática de las variantes MON-HT13, MON-HT15, y MON-HT17 con quizalofop como el sustrato fue aproximadamente similar a la actividad de MON-HT1. Véase Tabla 10.

Tabla 10

Proteína	Quizalofop		2,4-D	
	$V_{m\acute{a}x}$	Km	$V_{m\acute{a}x}$	Km
RdpA de tipo silvestre	2.76 (0.11)	0.09 (0.013)	0.25 (0.01)	0.13 (0.017)
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	1.62 (0.05)	0.12 (0.012)	1.17 (0.01)	0.03 (0.002)
MON-HT13 (SEQ ID NO:47)	1.51 (0.05)	0.12 (0.013)	3.38 (0.05)	0.08 (0.004)
MON-HT15 (SEQ ID NO:49)	1.52 (0.06)	0.12 (0.017)	3.53 (0.04)	0.07 (0.004)
MON-HT17 (SEQ ID NO:51)	1.53 (0.05)	0.14 (0.014)	2.91 (0.04)	0.07 (0.004)

Un análisis de fusión de proteína se condujo como se detalla anteriormente. Las temperaturas de fusión de MON-HT13, MON-HT15 (ambas no están abarcadas en la redacción de las reivindicaciones pero se consideran útiles para comprender la invención), y MON-HT17 fueron similares a la temperatura de fusión de MON-HT1 (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerada útil para comprender la invención) con $T_{1/2}$ en amortiguador en el intervalo de 55-58°C, y con $T_{1/2}$ en amortiguador más Fe²⁺ y aKG en el intervalo de 60-62°C. Estos datos indican que las variantes MON-HT13, MON-HT15, y MON-HT17 tienen una estabilidad de calor de enzima similar comparado con MON-HT1. Estos datos en el punto de fusión de las variantes enzimáticas confirman que las proteínas diseñadas por

ingeniería han sido optimizadas para estabilidad de la proteína a temperaturas superiores. Véase Tabla 11.

Tabla 11

Proteína	Temp. de fusión °C	
	Amortiguador	Amortiguador más Fe ²⁺ y aKG
RdpA de tipo silvestre	43	53
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	58	62
MON-HT13 (SEQ ID NO:47)	57	62
MON-HT15 (SEQ ID NO:49)	55	60
MON-HT17 (SEQ ID NO:51)	57	61

La actividad enzimática de las variantes de proteína MON-HT con triclopir, fluroxipir, MCPA, MCPB, mecoprop, como sustrato se determinó usando el ensayo de actividad enzimática conducido a 23°C con la enzima purificada. La actividad se registró como la actividad máxima como un porcentaje de la RdpA de actividad de la enzima de tipo silvestre, la cual se ajustó a 100%. Los datos son proporcionados en la Tabla 12. Para cada una de las proteínas ensayadas (MON-HT1, MON-HT13, MON-HT15 (las tres no están abarcadas en la redacción de las reivindicaciones pero se consideran útiles para comprender la invención), y MON-HT17) con los herbicidas triclopir y fluroxipir como el sustrato, hubo actividad detectable, especialmente en las variantes diseñadas por ingeniería, pero la actividad no fue lo suficientemente robusta para cuantificación. No hubo actividad detectable para cada una de las proteínas ensayadas (MON-HT1, MON-HT13, MON-HT15, y MON-HT17) con el herbicida MCPB como el sustrato. La actividad enzimática con mecoprop como un sustrato se redujo para cada una de las variantes MON-HT1, MON-HT13, MON-HT15, y MON-HT17 comparado con la RdpA de enzima de tipo silvestre. Un resultado inesperado fue que la actividad enzimática con MCPA como un sustrato fue aproximadamente 6 veces mayor para MON-HT1, y aproximadamente 10-veces mayor para MON-HT13, MON-HT15, y MON-HT17 comparado con la RdpA de enzima de tipo silvestre. Véase Tabla 12.

Tabla 12

Proteína	Mecoprop		MCPA	
	V _{máx}	K _m	V _{máx}	K _m
RdpA de tipo silvestre	100	100	100	100
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	63	142	600	21
MON-HT13 (SEQ ID NO:47)	37	92	1800	68
MON-HT15 (SEQ ID NO:49)	25	57	1300	59
MON-HT17 (SEQ ID NO:51)	27	65	1400	62

Ejemplo 4: Expresión de Proteínas Diseñadas por Ingeniería Optimizadas en Maíz

Se seleccionaron diez proteínas únicas diseñadas por ingeniería optimizadas por actividad a temperaturas superiores para transformación de maíz y análisis en plantas. Se produjeron constructos de ADN para expresar estas proteínas diseñadas por ingeniería con empleo de codón optimizado para la expresión de monocotiledóneas usando procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Potenciadores, promotores, líderes, intrones, CTPs, y 3'UTRs se probaron en varias combinaciones con las proteínas diseñadas por ingeniería en estos constructos de ADN. Los constructos de ADNs se usaron para transformar embriones de maíz inmaduros (LH244) con estos vectores usando *Agrobacterium tumefaciens* y procedimientos estándares conocidos en la técnica. Se hicieron crecer plántulas transgénicas R0 regeneradas en el invernadero.

Se seleccionaron plantas de maíz R0 transgénicas por la aplicación de quizalofop-P (2X) más 2,4-D (2X) de 7 a 10 días después del trasplante en cuñas (en general que corresponde a la etapa de crecimiento V3-V4). Todos los constructos probados producen plantas que contienen eventos únicos que pasan la selección R0. Las plantas R0 fueron autofecundadas para generar semillas homocigotas R1 y el R10 también se usó como el macho para la cruce con plantas endogámicas que contienen evento de maíz MON89034 para generar semilla híbrida F1 segregante para los ensayos de eficacia en campo.

Se condujo un ensayo de eficacia en campo con plantas híbridas F1 segregantes, con 50% homocigotas y 50% nulas

para el transgen. La tolerancia a quizalofop-P (2X) más 2,4-D (2X) se evaluó usando dos regímenes de aplicación de herbicida: (1) quizalofop-P (Assure II) a 0.16 lb ia/acre (2X) más 0.25% de v/v de tensoactivo no iónico (NIS) aplicado a una etapa de crecimiento VE-V2 seguido por el mismo en la etapa de crecimiento V4 seguido por la misma en la etapa de crecimiento V8 y (2) 2,4-D amina a 2 lb ae/acre (2X) más quizalofop-P a 0.04 lb ia/acre (0.5X) más 0.25% de v/v de NIS aplicado a una etapa de crecimiento VE-V2 seguido por 2,4-D amina a 2 lb ae/acre (2X) amina a 0.25% de v/v de NIS aplicado a una etapa de crecimiento V4 seguida por la misma en la etapa de crecimiento V8. El 50% de las plantas que fueron nulas para el transgen fueron removidas por la primera aplicación de quizalofop-P en la etapa de crecimiento VE-V2. Las parcelas fueron visualmente clasificadas 10-14 días después de la aplicación para determinar daño al cultivo en una escala de 0 a 100 con "0" siendo ninguno y "100" siendo completa destrucción del cultivo. La Tabla 13 (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerada útil para comprender la invención) muestra la clasificación de daño promedio en etapas de crecimiento V4 y V8 para ambos regímenes de rocío. Las clasificaciones de daño de <10% fueron consideradas muy buena tolerancia y las clasificaciones de daño de <20% fueron consideradas buenas para tolerancia favorable. El porcentaje de clasificación de daño con la aplicación 2X de 2,4-D en la etapa de crecimiento V8 varió desde uno alto de 40% a uno bajo de 0. De manera similar, el porcentaje de clasificación de daño con la aplicación 2X de quizalofop-P en la etapa de crecimiento V8 varió desde uno alto de 90% hasta uno bajo de 0. La variación en la clasificación de daño entre las plantas que expresan la misma proteína es probablemente debido a las variaciones en el diseño del constructo o ubicación de inserción del transgen. Estos datos confirman que las plantas que expresan las proteínas diseñadas por ingeniería presentan tolerancia a la aplicación del herbicida 2,4-D y quizalofop a la relación de 2X.

Tabla 13

Proteína	CTP	% de Daño de V4 Quizalofop	% de Daño de V8 Quizalofop	% de Daño de V4 2,4-D	% de Daño de V8 2,4-D
MON-HT1	A	8.33	8.33	7.5	5.83
MON-HT1	Ninguno	7.14	7.86	12.86	10.71
MON-HT1	B	7.5	8.75	10	10
MON-HT1	C	0.45	0.91	14.09	11.36
MON-HT2	A	0	0	20	34.17
MON-HT2	Ninguno	0	0	20	33.75
MON-HT2	B	11.67	11.67	10.56	13.33
MON-HT2	C	14.33	14.33	12	12
MON-HT3	A	1.6	0.5	21.7	9.2
MON-HT4	A	6.1	0	22.3	12.3
MON-HT5	A	6.8	1.7	27.2	17.4
MON-HT6	A	8	1.7	27	12.7
MON-HT7	A	31.2	5	21.6	16.6
MON-HT8	A	1.25	1.25	10	10
MON-HT8	Ninguno	85	90	0	0
MON-HT8	B	9.17	8.33	12.5	11.67
MON-HT8	C	30	32.5	20	21.25
MON-HT9	A	5	5	20	40
MON-HT10	A	0	0	28	38.33
MON-HT3 + MON-HT1	A + Ninguno	6.67	5.56	20.56	18.89
MON-HT4 + MON-HT8	A + Ninguno	11.25	11.88	9.38	4.38

Se usó un ensayo de actividad enzimática en base a planta para sensibilidad al calor para determinar el efecto de temperaturas elevadas en el crecimiento en la tolerancia al herbicida de plantas transgénicas que contienen las proteínas diseñadas por ingeniería optimizadas. Para probar la tolerancia a quizalofop-P a temperaturas elevadas de

crecimiento, se hizo crecer semilla de maíz híbrido F1 (producido por cruzamiento de una planta homocigota R1 que expresa una de las proteínas MON-HT con un maíz endogámico de la prueba MON89034) en una cámara de crecimiento por 10 días a una temperatura de día de 28°C y una temperatura de noche de 20°C con 50% de humedad. Después de 10 días, las plantas se trasladaron para aclimatarse por 3 días a uno de los tres diferentes regímenes de temperatura de día y noche: (1) tanto temperaturas de día como de noche establecida a 20°C; (2) temperatura de día a 28°C y temperatura de noche a 20°C; o (3) temperatura de día a 38°C y temperatura de noche a 30°C. Al final del periodo de aclimatación, las plantas están generalmente en la etapa de crecimiento V4 y se rociaron con quizalofop-P 2X. Diez días después del tratamiento, las plantas se registraron para daño en una escala de clasificación de 1 a 5 en donde "0" no es una daño visible observada, "1" es moteado clorótico, "2" es rayas cloróticas, "3" existen huecos o rasgadura de hoja, "4" son plantas con crecimiento atrofiado y/o hojas torcidas, y "5" son plantas muertas o no se observa crecimiento. Los resultados presentados en la Figura 4. Las plantas de maíz híbridas F1 que expresan MON-HT55 (no abarcada en la redacción de las reivindicaciones pero considerada útil para comprender la invención) mostraron buena tolerancia (clasificaciones de lesiones de alrededor de 2) a los tratamientos por rocío cuando las temperaturas día/noche son 20°C/20°C (Figura 4A) o 28°C/20°C (Figura 4B) en relación a las plantas de control del híbrido F1 (maíz de pruebas NK603 X MON89034) (clasificación de daño de 5). Cuando las temperaturas día/noche son 38°C/30°C, las plantas de control del híbrido F1 tienen una clasificación de daño de 5, las plantas híbridas F1 que expresan MON-HT55 tienen una clasificación de daño promedio de 3, y las plantas híbridas F1 que expresan MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4 o MON-HT7 (todo lo anterior no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para la comprensión de la invención) tienen clasificación de daño de ≤ 1 (Figura 4C). Las proteínas diseñadas por ingeniería optimizadas para actividad en altas temperaturas proporcionan tolerancia a herbicida AOPP cuando las plantas que expresan estas proteínas diseñadas por ingeniería se exponen a altas temperaturas.

Para la prueba a la tolerancia de 2,4-D a temperaturas elevadas de crecimiento, las plantas híbridas F1 se produjeron por cruzamiento de la planta R1 que contiene MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT7 o MON-HT55 (todo lo anterior no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para la comprensión de la invención) con una planta endogámica que contiene maíz de la prueba MON89034. Las plantas híbridas F1 se hacen crecer en un invernadero por una semana a una temperatura mínima de 20°C y una temperatura máxima de 28°C con 50 a 80% de humedad. Después de 1 semana, las plantas se trasladaron para aclimatarse por tres días a uno de los dos diferentes regímenes de temperatura día/noche: (1) temperaturas tanto de día como de noche establecidas a 20°C o (2) temperatura de día a 28°C y temperatura de noche a 30°C. Al final del periodo de aclimatación, las plantas están generalmente en una etapa de crecimiento V4 y se rociaron con 3,4-D amina 4X. Diez días después del tratamiento, las plantas se registraron para daño usando una escala de daño de 0 a 100 con "0" siendo sin daño y "100" siendo una planta muerta. Cuando las plantas se aclimataron a temperaturas de día/noche de 20°C/20°C antes de la aplicación de 2,4-D amina 4X, las plantas F1 que contienen MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT7 o MON-HT55 tienen promedios de clasificación de daño de <10%, y las plantas de control tienen promedios de clasificación de daño de <20% (Figura 4D). Cuando las plantas se aclimataron a temperaturas de día/noche de 38°C/30°C antes de la aplicación de 2,4-D amina 4X, las plantas F1 que contienen MON-HT4 o MON-HT7 tienen promedios de clasificación de daño de <20%, las plantas F1 que contienen MON-HT1, MON-HT2 o MON-HT3 tienen promedios de clasificación de daño de <10% (Figura 4E), y las plantas de control y plantas que contienen MON-HT55, las plantas F1 tienen promedios de clasificación de daño de 50% (Figura 4). Estos resultados demuestran que las proteínas diseñadas por ingeniería optimizadas para actividad en altas temperaturas proporcionan tolerancia al herbicida 2,4-D cuando las plantas que expresan estas proteínas diseñadas por ingeniería se exponen a altas temperaturas.

Se condujeron ensayos de campo de eficacia de rasgos por separado para quizalofop-P y 2,4-D en dos ubicaciones cada una con plantas transgénicas híbridas F1 producidas por cruzamiento de una planta endogámica que contiene maíz de la prueba MON89034 con una planta R1 que contiene MON-HT55 (con un CTP), MON-HT1 (con o sin un CTP), MON-HT2 (con o sin un CTP), MON-HT3 (con un CTP), MON-HT4 (con un CTP), MON-HT5 (con un CTP), MON-HT6 (con un CTP), o MON-HT7 (con un CTP) (todo lo anterior no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para la comprensión de la invención). Se usaron plantas híbridas F1 transgénicas que contienen maíz de la prueba NK603 X MON89034 para comparación como un control.

En el ensayo de campo de la eficacia para tolerancia a quizalofop-P y sensibilidad a cletodio, se usaron uno de cuatro tratamientos con herbicida: (1) quizalofop-P (Assure II) a 0.32 lb ia/acre (4X) más 0.25% v/v de tensoactivo no iónico (NIS) aplicado en la etapa de crecimiento VE-V2 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V4 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V8; (2) quizalofop-P a 0.64 lb ia/acre (8X) más 0.25% v/v de NIS aplicado en la etapa de crecimiento VE a V2 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V4 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V8; (3) quizalofop-P a 1-28 lb ia/acre (16X) más 0.25% v/v de NIS aplicado en la etapa de crecimiento VE a V2 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V4 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V8; o (4) cletodim a 0.25 lb ia/acre (1X) más 0.25% v/v de NIS aplicado en la etapa de crecimiento V8. Se evaluaron visualmente las parcelas en los días 10-14 después de la aplicación para daño del cultivo en una escala de 0 a 100 con "0" siendo ninguna y "100" siendo la destrucción completa del cultivo. Las tablas 14 y 15 muestran clasificaciones de daño promedio después de la aplicación de herbicida en las etapas de crecimiento V4 o V8, respectivamente.

Las plantas que contienen MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT5, MON-HT6 o MON-HT7 (todas operablemente ligadas a un CTP) (todo lo anterior no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero

considerado útil para la comprensión de la invención) mostraron cada una buena tolerancia a quizalofop-P clasificaciones de daño de menos del 15% a través de todos los índices de aplicación y en las etapas de crecimiento tanto V4 como V8. Las plantas que contienen MON-HT55 operablemente ligadas a un CTP mostraron moderada o pobre tolerancia con clasificaciones de daño desde 0.8% hasta 78.8%. Las clasificaciones de daño para las plantas de control después de la aplicación de quizalofop-P son 99.5%. Estos resultados indican que las plantas que contienen MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT5, MON-HT6 o MON-HT7 (todo lo anterior no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para la comprensión de la invención) operablemente ligadas a un CTP tienen buena tolerancia a aplicaciones secuenciales de quizalofop-P.

Las plantas que contienen MON-HT1 o MON-HT2 (ambas no están abarcadas en la redacción de las reivindicaciones pero se consideran útiles para comprender la invención) con un CTP operablemente ligado tienen mejor tolerancia a quizalofop-P que las plantas que contienen MON-HT1 o MON-HT2 sin un CTP operablemente ligado. Las plantas que contienen MON-HT1 con un CTP operablemente ligado tienen de 0 a 5.5% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P comparado al 3.3% hasta 18.8% de clasificación de daño de las plantas que contienen MON-HT1 sin un CTP operablemente ligado. Las plantas que contienen MON-HT2 con un CTP operablemente ligado tienen 1.5% hasta 10% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P comparado al 16.3% a 82.5% de clasificación de daño de las plantas que contienen MON-HT2 sin un CTP operablemente ligado. La figura 5 muestra plantas que contienen MON-HT2 operablemente ligado a un CTP (Figura 5A) y las plantas que contienen MON-HT2 sin un CTP (Figura 5B) 10 a 14 días después de la aplicación de quizalofop-P (tratamiento 3) a 1.28 lb ia/acre (16X) más 0.25% v/v de NIS aplicado en la etapa de crecimiento VE a V2 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V4 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V8. Las plantas de control no sobreviven, las plantas que contienen MON-HT2 sin un CTP tienen moderada o pobre tolerancia, y las plantas que contienen el MON-HT2 operablemente enlazado a un CTP tienen tolerancia fuerte a la aplicación de quizalofop-P. Estos resultados confirman que el uso de un CTP operablemente ligado mejora en gran medida la tolerancia a quizalofop-P.

Todas las plantas transgénicas tienen clasificación de daño por arriba del 90% a una aplicación de cletodio 1X (0.25 lb ia/acre) aplicado en la etapa de crecimiento V8, demostrando el uso de este herbicida para control de voluntarios en plantas transgénicas que contienen las proteínas diseñadas por ingeniería.

En el ensayo del campo de eficacia para tolerancia a 2,4-D, se usó uno de los cuatro tratamientos de herbicida: (1) 2,4-D amina a 2 lb ia/acre (2X) más 0.25% v/v de tensoactivo no iónico (NIS) aplicado a VE hasta V2 seguido por V4 seguido por V8; (2) 2,4-D amina a 4 lb ia/acre (4X) más 0.25 v/v de NIS aplicado a VE hasta V2 seguido por V4 seguido por V8; (3) 2,4-D amina a 8 lb ia/acre (8X) más 0.25% v/v de NIS aplicado a VE hasta V2 seguido por V4 seguido por V8; (4) 2,4-D amina a 16 lb ia/acre (16X) más 0.25% v/v de NIS aplicado a VE hasta V2 seguido por V4 seguido por V8. Las parcelas se evaluaron visualmente como anteriormente. Las tablas 14 y 15 muestran un promedio de clasificación de daño después de aplicación de herbicida en la etapa de crecimiento V4 o V8, respectivamente.

Las plantas que contienen MON-HT1, MON-HT2 o MON-HT6 (todas operablemente enlazadas a un CTP) (todo lo anterior no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para la comprensión de la invención) mostraron muy buena tolerancia a 2,4-D con clasificación de daño de menos del 10% y menos del 17% a través de todos los índices de aplicación en las etapas de crecimiento V4 y V8, respectivamente. Las plantas que contienen MON-HT3, MON-HT4, MON-HT5 o MON-HT7 (todas operablemente enlazadas a un CTP) mostraron buena tolerancia a 2,4-D con clasificación de daño de menos del 20% y menos del 22% a través de todos los índices de aplicación en las etapas de crecimiento V4 y V8, respectivamente. Las plantas que contienen MON-HT55 operablemente enlazadas a un CTP mostraron moderada a pobre tolerancia con clasificaciones de daño desde 7.5% hasta 66%. Las clasificaciones de daño para las plantas de control después de la aplicación de 2,4-D varía de 40% hasta 82.2%. Estos resultados indican que las plantas que contienen MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT5, MON-HT6 o MON-HT7 (todo lo anterior no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para la comprensión de la invención) tienen buena tolerancia a aplicaciones secuenciales de 2,4-D.

Las plantas que contienen MON-HT1 o MON-HT2 (ambas no están abarcadas en la redacción de las reivindicaciones pero se consideran útiles para comprender la invención) con un CTP operablemente enlazado en general no muestran diferencias marcadas en tolerancia a 2,4-D comparado a las plantas que contienen MON-HT1 o MON-HT2 son un CTP operablemente enlazado como se observa con la aplicación de quizalofop-P. Las plantas que contienen MON-HT1 con un CTP operablemente enlazado tienen hasta 16.3% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de 2,4-D comparado a las clasificaciones de daño del 0 a 13.8% de las plantas que contienen MON-HT1 sin un CTP operablemente enlazado. Las plantas que contienen MON-HT2 son un CTP operablemente enlazado tienen 1.3% hasta 15% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de 2,4-D comparado a las clasificaciones de daño del 1.3% a 21.3% de las plantas que contienen MON-HT2 son un CTP operablemente enlazado. Sin embargo, la diferencia es notable después la aplicación de 2,4-D en la etapa de crecimiento V4 para plantas que contienen MN-HT2 con un CTP operablemente enlazado (clasificación de daño del 4.5% a 8X y 7.5% a 16X) comparado a las plantas sin el CTP (clasificación de daño del 13.75% a 8X y 21.25% a 16X).

Tabla 14

Etapas de crecimiento V4	2,4-D 2x	2,4-D 4x	2,4-D 8x	2,4-D 16x	Quizalo-fop 4x	Quizalo-fop 8x	Quizalo-fop 16x
Control	52.5	64.4	73.8	74.7	99.5	99.5	99.5
MON-HT55	30.0	41.3	43.8	66.3	37.5	67.5	77.5
MON-HT55	20.0	23.1	50.0	55.0	12.5	43.8	62.5
MON-HT55	15.0	30.0	58.8	53.8	2.0	7.5	20.0
MON-HT55	12.5	30.0	48.8	52.5	8.0	18.8	48.8
MON-HT55	13.8	31.3	45.0	61.3	6.0	10.0	21.3
MON-HT55	n/a	n/a	n/a	n/a	0.8	13.8	16.3
MON-HT55	7.5	22.5	53.8	63.8	5.5	12.5	13.8
MON-HT1 (sin CTP)	0.0	0.0	5.8	12.5	5.8	11.3	18.8
MON-HT1	0.0	0.0	5.0	6.3	0.0	0.8	4.5
MON-HT2 (sin CTP)	1.3	2.5	13.8	21.3	42.5	76.3	82.5
MON-HT2	1.3	0.0	4.5	7.5	1.5	0.8	10.0
MON-HT3	3.8	6.3	8.8	11.3	0.8	0.0	4.3
MON-HT4	0.0	1.3	8.8	18.8	2.8	3.3	13.8
MON-HT5	2.5	2.5	7.5	17.5	1.3	4.5	4.5
MON-HT6	0.0	2.0	5.8	8.8	0.0	1.3	2.8
MON-HT7	1.3	1.3	5.8	12.5	0.8	1.3	3.3

Tabla 15

Etapas de crecimiento V8	Cleto-dim 1x	2,4-D 2x	2,4-D 4x	2,4-D 8x	2,4-D 16x	Quiza- lofop 4x	Quiza- lofop 8x	Quiza- lofop 16x
Control	93.6	40.0	52.8	64.1	82.2	99.5	99.5	99.5
MON-HT55	93.3	16.3	28.8	36.3	55.0	25.0	45.0	78.8
MON-HT55	93.3	14.4	20.0	39.4	56.9	10.0	31.3	41.3
MON-HT55	93.3	11.3	16.3	30.0	47.5	3.8	3.8	16.3
MON-HT55	93.3	11.3	20.0	35.0	47.5	3.8	20.0	38.8
MON-HT55	94.5	15.0	18.8	33.8	57.5	4.3	5.0	18.8
MON-HT55	93.3	n/a	n/a	n/a	n/a	2.5	6.3	18.8
MON-HT55	94.5	12.5	13.8	36.3	52.5	2.0	5.5	11.8
MON-HT1 (sin CTP)	94.5	2.5	4.0	8.8	13.8	3.3	7.5	16.3
MON-HT1	93.3	1.3	1.5	8.3	16.3	2.0	2.0	5.5
MON-HT2 (sin CTP)	92.0	5.0	8.8	13.8	25.0	16.3	52.5	77.5
MON-HT2	93.3	2.5	3.3	10.0	15.0	2.5	3.8	4.8
MON-HT3	94.5	5.5	5.5	11.3	13.8	2.5	2.0	6.0
MON-HT4	94.5	2.0	8.8	12.5	21.3	3.3	3.3	8.0

MON-HT5	92.0	3.3	4.0	10.0	21.3	2.5	0.0	8.0
MON-HT6	93.3	6.3	4.3	11.3	12.5	1.3	2.0	5.0
MON-HT7	93.3	2.0	2.8	9.3	20.0	1.5	0.8	5.5

Ejemplo 5: Evaluación de Péptidos dirigidos a Cloroplasto en Expresión de Proteínas Diseñadas por Ingeniería Optimizadas en Maíz

Para evaluar diferentes péptidos dirigidos a cloroplasto (CTP), se construyeron vectores de transformación de la plata, cada uno comprende una molécula de ADN recombinante optimizada para expresión de monocotiledónea y que codifica MON-HT1 (SEQ ID NO:16), MON-HT2 (SEQ ID NO:20), y MON-HT8 (SEQ ID NO:39), MON-HT9 (SEQ ID NO:42), o MON-HT10 (SEQ ID NO:45) (todo lo anterior no está abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero se consideran útiles para comprender la invención). Los vectores se crearon usando la misma combinación del promotor, líder, intrón y 3'-UTR, pero con uno de los tres CTP separados (A, B o C) o sin un CTP operablemente enlazado a la secuencia que codifica la proteína. Véase Tabla 16. Los constructos de ADN se usaron para transformar embriones de maíz inmaduro (LH244) usando *Agrobacterium tumifaciens* y procedimientos estándar conocidos en la técnica. Se hicieron crecer plántulas transgénicas R0 regeneradas en el invernadero. Las plantas R0 se autofecundaron para generar semillas homocigotas R1. Las plantas R0 también se usaron como el macho para la cruce con las plantas endogámicas que contienen maíz de la prueba MON89034 para generar la semilla híbrida F1 segregante para ensayos de campo de eficacia de rasgos.

Se condujeron ensayos de campo de eficacia de rasgos por separado para quizalofop-P y 2,4-D en dos ubicaciones, cada una con las plantas transgénicas endogámicas homocigotas (generación R2 o R4). En estos ensayos de campo, se usó uno de los dos tratamientos con herbicida: (1) quizalofop-P (Assure II) a 0.16 lb ia/acre (2X) más 0.25% v/v de tensoactivo no iónico (NIS) aplicado en la etapa de crecimiento V4 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V8; o (2) 2,4-D amina a 2 lb ia/acre (2X) más 0.25% v/v de tensoactivo no iónico (NIS) aplicado a V4 seguido por V8. Las clasificaciones de daño (porcentaje de daño del cultivo a V4 (CIPV4) o V8 (CIPV8) se tomaron a 10 hasta 14 días después de las aplicaciones en V4 y V8. Se calculó el error usando LSD (0.05). Los resultados demostraron que estas plantas tienen tolerancia a aplicaciones secuenciales 2X de ya sea quizalofop-P o 2,4-D con clasificación de daño por debajo del 10% seguido por las aplicaciones a V4 y V8. Véase Tabla 16.

Tabla 16

Proteína	CTP	Quizalofop-P 2X		2,4-D 2X	
		LSD CIPV4 (0.05) = 1.45	LSD CIPV8 (0.05) = 2.2	LSD CIPV4 (0.05) = 0.95	LSD CIPV8 (0.05) = 1.6
MON-HT1	A	0	2.125	0	2.5
MON-HT1	B	0	1.75	0	1.25
MON-HT1	C	0	1.75	1.25	1.25
MON-HT1	sin CTP	0	1.25	0	1.25
MON-HT2	A	0	1.875	0.875	1.25
MON-HT2	B	0	0	0	2.5
MON-HT2	C	0	2	0	1.25
MON-HT2	sin CTP	1.25	3.5	0	2.5
MON-HT8	A	0	1.25	1.75	1.25
MON-HT8	B	0.75	2.5	0	1.25
MON-HT8	C	0	1.25	1.25	0
MON-HT9	A	0	0	3.75	1.25
MON-HT10	A	0	0	0	1.25

Se recolectaron muestras de hojas a partir de las plantas que contienen casetes transgénicos que codifican MON-HT1, MON-HT2, y MON-HT8 (todo lo anterior no está abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero se considera útil para comprender la invención) con y sin secuencias CTP para determinar la expresión del mRNA transcrito a partir del casete del transgen que codifica las proteínas diseñadas por ingeniería. Se realizó en análisis Quantigene® en los extractos de muestra de la hoja para determinar la expresión de mRNA del casete del transgen.

Para estos ensayos, la sonda fue la secuencia 3'-UTR común presente en cada casete de expresión usado para generar las plantas transgénicas. Se calculó la expresión relativa normalizando los genes housekeeping o constitutivos de maíz. Se recolectó una muestra de hoja de cada una de las ocho plantas para cada configuración de constructo usada para elaborar plantas transgénicas, y los datos de expresión de mRNA relativamente reportados es un promedio de las ocho muestras con error estándar.

Las plantas que contienen el constructo de transgen que codifica ya sea MON-HT1 (SEQ ID NO:14) o MON-HT2 (SEQ ID NO:18) (todo lo anterior no está abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero se considera útil para comprender la invención) tienen elevada expresión de mRNA de transgen relativa para constructos que contienen ya sea el CTP "A" o "B" que para constructos sin un CTP o con el CTP "C". Las plantas que contienen el constructo de transgen que codifica MON-HT8 (SEQ ID NO: 37) tiene similar expresión de mRNA de transgen relativa elevada para constructos que contienen cualquiera de los tres CTP (A, B o C). Véase Tabla 17.

Tabla 17

Variante de MON-HT	CTP	Expresión Relativa	Error Estándar
MON-HT1	A	7.80	1.20
MON-HT1	B	5.95	1.63
MON-HT1	C	3.82	0.44
MON-HT1	sin CTP	4.31	0.68
MON-HT2	A	6.96	0.66
MON-HT2	B	6.16	0.65
MON-HT2	C	4.11	0.29
MON-HT2	sin CTP	4.66	0.45
MON-HT8	A	8.06	0.48
MON-HT8	B	7.62	0.46
MON-HT8	C	4.87	0.47
LH244 Control	ninguno	0.00	0.00

Se condujeron ensayos de campo para eficacia de rasgos por separado para detección de presión de quizalofop-P y 2,4-D en una ubicación cada uno con plantas transgénicas híbridas F1 producidas cruzando una planta endogámica que contiene maíz de la prueba MON98034 con una planta R1 que contiene MON-HT1, MON-HT2, MON-HT8, MON-HT9, y MON-HT10 (todo lo anterior no está abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero se considera útil para comprender la invención) con y sin secuencias CTP operablemente enlazadas. Se usaron plantas híbridas F1 transgénicas que contiene maíz de eventos NK603 X MON89034 para comparación como un control.

En el ensayo de campo de eficacia de rasgos para tolerancia a quizalofop-O, se usó uno de tres tratamientos: (1) quizalofop-P (Assure II) a 0.32 lb ia/acre (4X) más 0.25% v/v de tensoactivo no iónico (NIS) aplicado en la etapa de crecimiento VE-V2 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V4 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V8; (2) quizalofop-P a 0.64 lb ia/acre (8X) más 0.25% v/v de NIS aplicado en la etapa de crecimiento VE-V2 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V4 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V8; o (3) quizalofop-P a 1.28 lb ia/acre (16X) más 0.25% v/v de NIS aplicado en la etapa de crecimiento VE-V2 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V4 seguido por lo mismo en la etapa de crecimiento V8. Las parcelas se evaluaron visualmente como anteriormente. La tabla 18 muestra las clasificaciones de daño promedio después de la aplicación de herbicida en la etapa de crecimiento V4 (CIPV4) o V8 (CIPV8), respectivamente. La clasificación de daño para las plantas de control después de todas las aplicaciones de quizalofop-P fue 100%. Se calculó el error usando LSD (0.05).

Tabla 18

variante MON-HT	CTP	Quizalofop-P 4X		Quizalofop-P 8X		Quizalofop-P 16X	
		LSD CIPV4 (0.05) = 1.92	LSD CIPV8 (0.05) = 2.3	LSD CIPV4 (0.05) = 4.7	LSD CIPV8 (0.05) = 5.3	LSD CIPV4 (0.05) = 5.0	LSD CIPV8 (0.05) = 5.4

ninguno	ninguno	100	100	100	100	100	100
MON-HT1	A	0	7.5	2.5	10	5	15
MON-HT1	B	2.5	5	2.5	7.5	2.5	20
MON-HT1	C	0	5	2.5	10	5	20
MON-HT1	sin CTP	2.5	10	10	22.5	22.5	37.5
MON-HT2	A	0	5	2.5	7.5	5	15
MON-HT2	B	0	5	0	10	0	20
MON-HT2	C	0	5	5	12.5	12.5	20
MON-HT2	sin CTP	35	45	50	37.5	70	55
MON-HT8	A	15	15	37.5	35	60	50
MON-HT8	B	5	7.5	32.5	35	27.5	30
MON-HT8	C	55	45	75	55	85	72.5
MON-HT9	A	0	5	2.5	15	7.5	20
MON-HT10	A	0	5	2.5	10	5	21

Plantas que contienen MON-HT1 con cualquiera de los tres CTP (A, B o C) operablemente enlazados tienen mejor tolerancia a quizalofop-P que las plantas que contienen MON-HT1 (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) sin un CTP operablemente enlazado. Las plantas que contienen MON-HT1 con el CTP "A" operablemente enlazado tiene 0 hasta 15% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P. Las plantas que contienen MON-HT1 con el CTP "B" operablemente enlazado tiene 2.5% a 20% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P. Las plantas que contienen MON-HT1 con el CTP "C" operablemente enlazado tienen 0 a 20% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P comparado a las plantas que contienen MON-HT1 sin un CTP operablemente enlazado que tiene 2.5% a 37.5% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P.

Plantas que contienen MON-HT2 (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) con cualquiera de los tres CTP (A, B o C) operablemente enlazados tienen mejor tolerancia a quizalofop-P que las plantas que contienen MON-HT2 sin un CTP operablemente enlazado. Las plantas que contienen MON-HT2 con el CTP "A" operablemente enlazado tiene 0 hasta 15% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P. Las plantas que contienen MON-HT2 con el CTP "B" operablemente enlazado tienen 0% a 20% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P. Las plantas que contienen MON-HT2 con el CTP "C" operablemente enlazado tienen 0 a 20% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P comparado a las plantas que contienen MON-HT2 sin un CTP operablemente enlazado que tiene 35% a 70% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P.

Plantas que contienen MON-HT8 (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) con ya sea el CTP "A" o "B" operablemente enlazados tienen mejor tolerancia a quizalofop-P que las plantas que contienen MON-HT8 con el CTP "C" operablemente enlazado. Las plantas que contienen MON-HT8 con el CTP "A" operablemente enlazado tienen 15 hasta 60% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P. Las plantas que contienen MON-HT8 con el CTP "B" operablemente enlazado tienen 5% a 35% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P, comparado a las plantas que contienen MON-HT8 con el CTP "C" operablemente enlazado que tienen 45 a 85% de clasificación de daño a través de todas las aplicaciones de quizalofop-P.

Plantas que contienen MON-HT1 o MON-HT2 (ambas no abarcadas en la redacción de las reivindicaciones pero consideradas útiles para comprender la invención) con cualquiera de los tres CTP operablemente enlazados y plantas que contienen MON-HT9 o MON-HT10 con el CTP "A" operablemente enlazado tienen mejor tolerancia a quizalofop-P que las plantas que contienen MON-HT8 con cualquiera de los tres CTP operablemente enlazados. Las plantas que contienen MON-HT9 o MON-HT10 (ambas no abarcadas en la redacción de las reivindicaciones pero consideradas útiles para comprender la invención) con el CTP "A" operablemente enlazado tienen tolerancia a quizalofop-P a través de todas las aplicaciones que son comparables a las plantas que contienen MON-HT1 o MON-HT2 con cualquiera de los tres CTP operablemente enlazados. En la relación elevada (16X) de aplicaciones de quizalofop, las plantas que contienen MON-HT1 o MON-HT2 con un CTP "A" operablemente enlazado tienen una tolerancia ligeramente mayor que las plantas que contienen MON-HT1 o MON-HT2 con un CTP "B" o "C" operablemente enlazado.

Se usaron tres tratamientos con herbicida en el ensayo de campo de eficacia de rasgos para tolerancia a 2,4-D; (1) 2,4-D amina a 4 lb ia/acre (4X) más 0.25% v/v de NIS aplicado a VE-V2 seguido por V4 seguido por V8; (2) 2,4-D amina a 8 lb ia/acre (8X) más 0.25 v/v de NIS aplicado a VE-V2 seguido por V4 seguido por V8 de maíz; (3) 2,4-D

amina a 16 lb ia/acre (16X) más 0.25% v/v de NIS aplicado a VE-V2 seguido por V4 seguido por V8. Las parcelas se evaluaron visualmente como anteriormente.

La Tabla 19 muestra el promedio de clasificación de daño en maíz después de aplicación de herbicida 2,4-D en la etapa de crecimiento V4 (CIPV4) o V8 (CIPV8), respectivamente. La clasificación de daño para las plantas de control después de todas las aplicaciones de 2,4-D varió de 80% a 96.25%. En la relación mayor de 2,4-D (16X) aplicada a través de V8, las plantas que contienen MON-HT1 o MON-HT2 (ambas no abarcadas en la redacción de las reivindicaciones pero consideradas útiles para comprender la invención) operablemente enlazadas a cualquiera de los tres CTP (A, B o C) tienen mejor tolerancia que las plantas que contienen MON-HT1 o MON-HT2 sin estar operablemente enlazados a un CTP. Las plantas que contienen MON-HT1 o MON-HT2 o MON-HT8 (todo lo anterior no comprendido en el tenor de las reivindicaciones pero considerado útil para la comprensión de la invención) con o sin CTP operablemente enlazado tienen mejor tolerancia a 2,4-D en todas las aplicaciones probadas comparado a las plantas que contienen ya sea MON-HT9 o MON-HT10 con un CTP "A" operablemente enlazado. Sobre el intervalo de aplicaciones de 2,4-D la clasificación relativa de tolerancia fue: plantas que contienen MON-HT1 tienen mejor tolerancia que las plantas que contienen MON-HT2 las cuales a su vez mejor que las plantas que contienen MON-HT8. Consistente con los datos del ensayo de prueba de presión de quizalofop-P, las plantas que contienen MON-HT1, MON-HT2 o MON-HT8 operablemente enlazadas al CTP "A" muestran una ligera ventaja matemática, pero no estadísticamente significativa sobre el péptido de tránsito "B" y "C". Se calculó el error usando LSD (0.05).

Tabla 19

variante MON-HT	CTP	2,4-D 4X		2,4-D 8X		2,4-D 16X	
		LSD CIPV4 (0.05) = 3.4	LSD CIPV8 (0.05) = 3.33	LSD CIPV4 (0.05) = 2.1	LSD CIPV8 (0.05) = 3.5	LSD CIPV4 (0.05) = 3.4	LSD CIPV8 (0.05) = 3.5
Ninguno- Control	Ninguno	80	88.75	82.5	95	87.5	96.25
MON-HT1	A	5	5	5	10	7.5	15
MON-HT1	B	5	5	5	10	10	15
MON-HT1	C	5	5	5	10	10	17.5
MON-HT1	sin CTP	5	5	7.5	10	10	22.5
MON-HT2	A	5	5	10	7.5	10	20
MON-HT2	B	5	5	5	10	10	25
MON-HT2	C	10	15	10	10	15	20
MON-HT2	sin CTP	7.5	7.5	17.5	42.5	25	45
MON-HT8	A	7.5	5	10	12.5	15	30
MON-HT8	B	5	7.5	10	27.5	10	20
MON-HT8	C	10	7.5	10	17.5	17.5	25
MON-HT9	A	17.5	55	25	75	45	90
MON-T10	A	32.5	70	55	87.5	45	90

Ejemplo 6: Expresión de Proteínas Diseñadas por Ingeniería Optimizadas en Soya

Se seleccionaron dos proteínas diseñadas por ingeniería para análisis en frijol de soya. Se produjeron constructos de ADN para expresión de MON-HT1 (SEQ ID NO: 14) y MON-HT2 (SEQ ID NO. 18) (ambas no están abarcadas en la redacción de las reivindicaciones pero se consideran útiles para comprender la invención) con uso de codón optimizado para expresión de dicotiledónea usando procedimientos conocidos por aquellos de experiencia en la técnica. Mejoradores, promotores, líderes, intrones, CTPs y 3'UTRs en combinaciones variadas están operablemente enlazados a las proteínas diseñadas por ingeniería en estos constructos de ADN. Los constructos de ADN se usaron para transformar frijol de soya usando *Agrobacterium tumefaciens* y procedimientos estándar conocidos en la técnica. Se hicieron crecer plántulas transgénicas R0 regeneradas en el invernadero. Aproximadamente 9 semanas después de la transformación en la etapa de hoja de 1-2 trifolios, se identificaron pruebas R0 de copia única y se rociaron con herbicida 2,4-D a una relación de 0.5X (0.375 lb ia/acre), 2X (1.5 lb ia/acre), o 4X (3.0 lb ia/acre). Aproximadamente 2 semanas después de la aplicación del herbicida, las plantas se evaluaron para daño de herbicida en una escala de 1

a 3, en donde 1 = poco o sin daño (<20%), 2 = daño moderado (20-50%) y 3 = daño severo (>50%).

Las plantas de soja R0 que contienen cada uno de los constructos muestran tolerancia a 2,4-D con poco o sin daño (<20% de daño) o daño moderado (20-50%). Los datos se proporcionan en la Tabla 20. Esta indica que las proteínas diseñadas por ingeniería MON-HT1 y MON-HT2 (ambas no están anarcadas en la redacción de las reivindicaciones pero se consideran útiles para comprender la invención) pueden otorgar tolerancia a 2,4-D en plantas de soja.

Tabla 20

Proteína	CTP	Relación 2,4-D	Prueba de copia única	Pruebas con <20% de daño	Pruebas con 20-50% de daño	Pruebas con daño a >50%
MON-HT1	No	0.5X	130	120	10	0
MON-HT1	No	2X	36	6	30	0
MON-HT1	Si	2X	136	101	35	0
MON-HT2	No	0.5X	22	3	19	0
MON-HT1	Si	4X	11	5	6	0

Después se seleccionaron para análisis unas cinco proteínas diseñadas por ingeniería optimizadas adicionales para actividad de 2,4-D en frijol de soja transgénico. Se produjeron constructos de ADN para expresar MON-HT13 (SEQ ID NO:47), MON-HT14 (SEQ ID NO:48), MON-HT15 (SEQ ID NO:49), (todo lo anterior no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para la comprensión de la invención) MON-HT17 (SEQ ID NO:51), y MON-HT18 (SEQ ID NO:52) (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) con uso de codón optimizado para expresión de dicotiledónea. Los elementos de expresión operablemente enlazados (promotor, líder, intrón, CTP y 3'UTR) son idénticos en todos los constructos. Se tomaron muestras de hojas de plántulas R0 y se identificaron plantas de copia única usando un ensayo a base de PCR. Cuando las plantas R0 de copia única tienen aproximadamente dos a tres hojas trifoliadas, se trataron con ya sea 1.5 lb ia/acre (2X) o 3.0 lb ia/acre (4X) de 2,4-D. Siete días después de la aplicación del herbicida, las plantas se registraron para daño por herbicida en base al porcentaje de área de la planta que muestra daño, como se indica anteriormente.

En la relación de aplicación 2X, las plantas de soja que contienen cualquiera de las seis variantes de MON-HT (MON-HT1, MON-HT13, MON-HT14, MON-HT15 (todo lo anterior no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para la comprensión de la invención), MON-HT17, y MON-HT18) (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) mostraron excelente tolerancia al tratamiento de 2,4-D, como se pone en evidencia por todos pero dos de las plantas de copia única que tienen clasificación de daño de <20%; estos dos eventos (uno para MON-HT13 y uno para MON-HT18) tienen una clasificación de daño de 20-30%. A la relación de aplicación de 4X, de las once plantas de copia única que contienen MON-HT1, cinco plantas tienen un registro de daño de <20%, y seis plantas tienen un registro de daño de 20-50%. De las once plantas de copia única que contienen MON-HT13, diez plantas tienen un registro de daño de <20% y una planta tienen un registro de daño de 20-50%. De las ocho plantas de copia única que contienen MON-HT14, seis plantas tienen un registro de daño de <20%, una planta tiene un registro de daño de 20-50%, y una planta tiene un registro de daño de >50%. De las siete plantas de copia única que contienen MON-HT15, cinco plantas tienen un registro de daño de <20%, una planta tiene un registro de daño de 20-50%, y una planta tiene un registro de daño de >50%. De las once plantas de copia única que contienen MON-HT17, todas las once plantas tienen un registro de daño de <20%. De las doce plantas de copia única que contienen MON-HT18, nueve plantas tienen un registro de daño de <20% y tres plantas tienen un registro de daño de 20-50%. Estos resultados indican que las plantas de soja que contienen MON-HT1 (SEQ ID NO:14), MON-HT13 (SEQ ID NO:47), MON-HT14 (SEQ ID NO:48), MON-HT15 (SEQ ID NO:49), MON-HT17 (SEQ ID NO:51), o MON-HT18 (SEQ ID NO:52) tienen tolerancia a 2,4-D a la relación de aplicación 4X. Además, esto demuestra que las plantas de soja que contienen MON-HT13 (SEQ ID NO:47), MON-HT14 (SEQ ID NO:48), MON-HT15 (SEQ ID NO:49), MON-HT17 (SEQ ID NO:51), o MON-HT18 (SEQ ID NO:52) tienen tolerancia mejorada a 2,4-D a la relación de aplicación 4X comparado con MON-HT1 (SEQ ID NO:14). Con base en el porcentaje de plantas de copia única con un registro de daño de <20%, las plantas de soja que contienen ya sea MON-HT13 o MON-HT17 tienen mejor tolerancia a 2,4-D aplicado a la relación 4X comparado con las plantas de soja que contienen MON-HT1, MON-HT14, MON-HT15, o MON-HT18. Véase Tabla 21.

Tabla 21

MON-HT	SEQ ID NO	Relación 2,4-D	Eventos de copia única	Eventos con <20% de daño	Eventos con 20-50% de daño	Eventos con daño >50%
MON-HT1	14	2X	12	12	--	--
MON-HT13	47	2X	13	12	1	--
MON-HT14	48	2X	9	9	--	--
MON-HT15	49	2X	5	5	--	--
MON-HT17	51	2X	12	12	--	--
MON-HT18	52	2X	12	11	1	--
MON-HT1	14	4X	11	5	6	--
MON-HT13	47	4X	11	10	1	--
MON-HT14	48	4X	8	6	1	1
MON-HT15	49	4X	7	5	1	1
MON-HT17	51	4X	11	11	--	--
MON-HT18	52	4X	12	9	3	--

Ejemplo 7: Tolerancia a Auxinas Sintéticas de Fluroxipir, Triclopir, y MCPA

- 5 Se determinó la tolerancia de las plantas de maíz y soja que contienen MON-HT1 a aplicaciones de 2,4-D, fluroxipir, triclopir, y MCPA. Las semillas de maíz híbrido F1 para los tres eventos únicos que contienen MON-HT1 (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) con la semilla de soja CTP "A" y R2, se plantaron en maceta. La semilla de maíz híbrido que contiene NK603 x MON89034 y el mismo germoplasma de frijol de soja usado para la transformación de la planta, se usaron como controles. Las plantas se hicieron crecer en un invernadero y se usaron cuatro plantas para cada tratamiento. Las plantas se rociaron con herbicida en una cámara de crecimiento cuando las plantas fueron de 15.24-22.86 cms (6-8 pulgadas) de soja y 25.4-30.48 cms (10-12 pulgadas) de alto, entonces se transfirieron a un invernadero programado para mantener las condiciones de crecimiento óptimas.

- 15 Para soja, se usó una relación de aplicación de herbicida 2X de cada uno de los siguientes: (1) 2,4-D Amina 4 (1680 g ae/ha) (2) triclopir (840 g ae/ha, GARLON®); (3) fluroxipir (840 g ae/ha, Starane®); o (4) MCPA (g ae/ha 1680). Después de la aplicación de triclopir, fluroxipir, o MCPA la sintomatología primaria en soja fue necrosis y epinastia severa. Las clasificaciones visuales de daño en la planta se hicieron para todos los tratamientos en la escala de clasificación desde 0% hasta 100%, donde 0% representa plantas equivalentes a controles no tratados y 100% representa plantas que fueron completamente muertas. Todas las clasificaciones se tomaron a siete días después del tratamiento. Las plantas para los tres eventos de MON-HT1 (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) de soja mostraron buena tolerancia a 2,4-D Amine (2,4-D) promediando menos de 7% de daño al cultivo comprado con los controles a 90-97% de daño al cultivo. Ninguno de los eventos de soja mostraron tolerancia a triclopir o fluroxipir, con clasificaciones de daño a través de los tres eventos promediando 81-97% de daño al cultivo comprado con los controles a 91% de daño al cultivo. Uno de los tres eventos de soja mostró un bajo nivel de tolerancia a MCPA con una clasificación de daño promedio de 72% mientras los otros dos eventos tienen 90% de daño al cultivo comparado con los controles a 90% de daño. Véase Tabla 22.

Tabla 22

TRT #	Herbicida	Relación 2X (g ae/ha)	% de daño al cultivo de soya promedio por 4 repet.			
			MON-HT1 Evento 1	MON-HT1 Evento 2	MON-HT1 Evento 3	Control
1	2,4-D Amina	1680	4.5	6.5	5.3	90.0
2	triclopir	840	81.3	90.0	90.0	91.3
3	fluroxipir	840	96.3	93.8	97.5	91.3
4	MCPA	1680	90.0	90.0	72.5	90.0
5	Controles	0	0.0	0.0	0.0	0.0

Para maíz, se usó una relación de aplicación de herbicida 4X de cada uno de los siguientes: (1) 2,4-D Amina 4 (3360 g ae/ha); (2) triclopir (1680 g ae/ha, GARLON®); (3) fluroxipir (1680 g ae/ha, Starane®); o (4) MCPA (g ae/ha 3360). Después de la aplicación de triclopir, fluroxipir, o MCPA al maíz, se volcó la sintomatología primaria. Las plantas para los tres eventos de MON-HT1 (no abarcado en la redacción de las reivindicaciones pero considerado útil para comprender la invención) de maíz fueron tolerantes de 2,4-D promediando menos de 15% de daño comparado con los controles a 43% de daño del cultivo. Los tres eventos de maíz de MON-HT1 parecieron mostrar alguno bajo nivel de tolerancia a triclopir con daño al cultivo promediando 26%-37% comparado con los controles con 47% de daño al cultivo. Los tres eventos de maíz de MON-HT1 parecen mostrar algún bajo nivel de tolerancia a fluroxipir con daño al cultivo promediando 20%-21% comparado con los controles con 55% de daño al cultivo. Dos de los eventos de maíz de MON-HT1 mostraron buena tolerancia a MCPA con un promedio de daño al cultivo de menos de 6% comparado con los controles a 31% de daño al cultivo. El tercer evento de MON-HT1 de maíz tiene una clasificación de daño promedio de 20%. Véase Tabla 23. Estos resultados que muestran baja tolerancia a triclopir y fluroxipir y buena tolerancia a MCPA fueron consistentes con los datos enzimáticos *in vitro* con la enzima MON-HT1 purificada.

Tabla 23

TRT #	Herbicida	Relación 4X (g ae/ha)	% de daño al cultivo de maíz promedio para 4 repet.			
			MON-HT1 Evento 1	MON-HT1 Evento 2	MON-HT1 Evento 3	LH244
1	2,4-D Amina	3360	5.8	15.0	5.3	43.8
2	triclopir	1680	26.3	37.5	35.0	47.5
3	fluroxipir	1680	20.0	20.0	21.3	55.0
4	MCPA	3360	3.8	5.0	20.0	31.3
5	Controles	0	0.0	0.0	0.0	0.0

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la SEQ ID NO:51, en la que dicho polipéptido confiere tolerancia a herbicidas a una planta transgénica.
- 5 2. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que la secuencia de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO:58.
3. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 está unida operativamente a un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal.
4. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 3, en la que la molécula de ADN recombinante está además unida operativamente a una molécula de ADN que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto.
- 10 5. Un constructo de ADN que comprende un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal unido operativamente a la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.
6. El constructo de ADN de la reivindicación 5, que comprende además una molécula de ADN que codifica un péptido de tránsito de cloroplasto unido operativamente a la molécula de ADN recombinante.
- 15 7. El constructo de ADN de la reivindicación 5, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:51.
8. El constructo de ADN de la reivindicación 5, en el que el constructo de ADN está presente en el genoma de una planta transgénica.
9. Una planta, semilla, tejido vegetal, parte de planta o célula que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.
- 20 10. La planta, semilla, tejido vegetal, parte de planta o célula de la reivindicación 9, en la que la planta, semilla, tejido vegetal, parte de planta o célula comprende tolerancia a al menos un herbicida seleccionado del grupo que consiste en herbicidas AOPP, herbicidas de fenoxiácidos y herbicidas de piridiniloxiácidos.
11. Una planta, semilla, tejido vegetal, parte de planta o célula que comprende el constructo de ADN de la reivindicación 5.
- 25 12. Una planta, semilla, tejido vegetal, parte de planta o célula que comprende el polipéptido codificado por la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.
13. Un polipéptido de la SEQ ID NO:51, en el que dicho polipéptido confiere tolerancia a herbicidas a una planta transgénica.
14. El polipéptido de la reivindicación 13, en el que el polipéptido tiene actividad oxigenasa contra al menos un herbicida seleccionado del grupo que consiste en herbicidas AOPP, herbicidas de fenoxiácidos y herbicidas de piridiniloxiácidos.
- 30 15. Un procedimiento para conferir tolerancia a herbicidas a una planta, semilla, célula o parte de planta que comprende expresar en dicha planta, semilla, célula o parte de planta el polipéptido de la reivindicación 13.
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que dicha planta, semilla, célula o parte de planta comprende un constructo de ADN que comprende un promotor heterólogo funcional en una célula vegetal unido operativamente a una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la SEQ ID NO: 51.
- 35 17. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la planta, semilla, célula o parte de la planta comprende tolerancia a al menos un herbicida seleccionado del grupo que consiste en herbicidas AOPP, herbicidas de fenoxiácidos y herbicidas de piridiniloxiácidos.
- 40 18. Un procedimiento para producir una planta transgénica tolerante a herbicidas que comprende transformar una célula o tejido vegetal con una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:
 - a) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:51; y
 - 45 b) una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:58;
 y regenerar una planta transgénica tolerante a herbicidas a partir de la célula o tejido vegetal transformado.

19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicha planta transgénica tolerante a herbicidas comprende tolerancia a al menos un herbicida seleccionado del grupo que consiste en herbicidas AOPP, herbicidas de fenoxiácidos y herbicidas de piridiniloxiácidos.