

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

01-140880

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

GENES NOVEDOSOS CON RESISTENCIA A HERBICIDAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

DOW AGROSCIENCES LLC

DOMICILIO

INDIANAPOLIS, INDIANA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

For. 09-12-2004

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-140880-00000-0000

Fecha: 2009-12-09 17:08:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 310**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **DOW AGROSCIENCES LLC**
Sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América.Dirección: 9330 Zionsville Road,
Indianapolis,
Indiana 46268,
Estados Unidos de AméricaDomicilio: Indianapolis,
Indiana,
Estados Unidos de América**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344T.P. 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Justin M. LIRA**
12373 Ensley Drive,
Fishers,
Indiana 46038,
Estados Unidos de América3. **Andrew E. ROBINSON**
4099 Point Bar Road, Apt. 1b,
Indianapolis,
Indiana 46268,
Estados Unidos de América5. **Donald J. MERLO**
11845 Durbin Drive,
Carmel,
Indiana 46032,
Estados Unidos de América2. **Erika Megan SNODDERLEY**
7776 Cobblesprings Drive,
Avon,
Indiana 46123
Estados Unidos de América4. **Terry R. WRIGHT**
14162 Charity Chase Circle,
Westfield,
Indiana 46074,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2008/063212Publicación Internacional No. WO 2008/141154Fecha: 09 de mayo de 2008Fecha: 20 de noviembre de 2008

6

Título (54)**GENES NOVEDOSOS CON RESISTENCIA A HERBICIDAS**

7

Clasificación Internacional (51) C12N 015/082C12Q 1/68

2

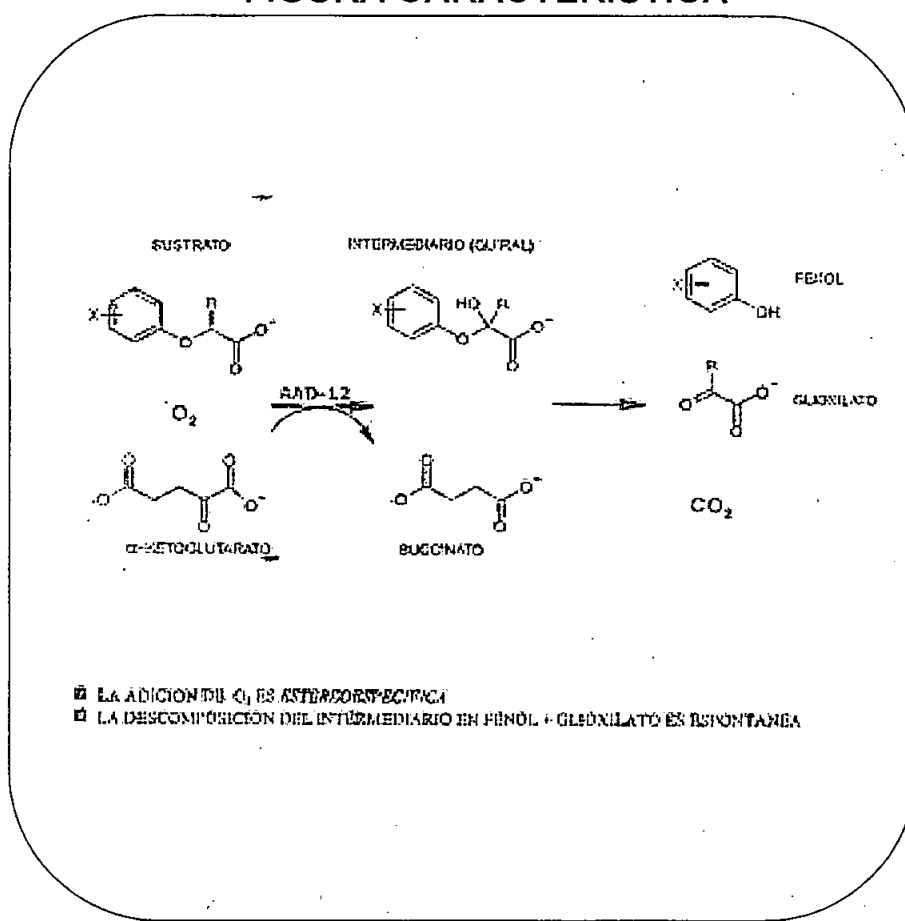
8	Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	SI ☒ NO ☐	<u>US</u>	<u>09 de mayo de 2007</u>	<u>60/928,303</u>

9	Comprobante de pago No.: <u>09-82,159</u>	Fecha: <u>03 de noviembre de 2009</u>
	Comprobante de pago No.: <u>09-84,014</u>	Fecha: <u>09 de noviembre de 2009</u>
	Comprobante de pago No.: <u>09-87,649</u>	Fecha: <u>23 de noviembre de 2009</u>
	Comprobante de pago No.: <u>09-87,663</u>	Fecha: <u>23 de noviembre de 2009</u>

10	Anexos:
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.
☒	Comprobante de pago por 83 reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por \$2.075.000.oo.
☒	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
☒	Poderes, si fuere el caso.
☐	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
☐	Declaraciones.
☒	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
☒	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
☐	Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
☐	Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
☐	De ser el caso, copia del contrato de acceso.
☐	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
☐	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
☒	Arte final 12x12
☐	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
☒	Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA:

Luз Clemencia de Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/141154 A3

Descripción:

Páginas 93 en el idioma original

Páginas 143 en español

Reivindicaciones: Número (s) 98

Figuras: Número (s) 3

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

10470
6228 5

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)

Dow AgroSciences LLC

of/ domiciliado (s) en 9330 Zionsville Road,
Indianapolis, Indiana 46268, United
States of America,

por el presente ratificamos la _____

presentada por _____

como agente oficioso ante _____

en _____

el _____

y por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad,

hereby ratify the _____

filed without a Power of Attorney by _____

before _____

in _____

on _____ and do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, I (we) confer (confer) power in favor of the above named attorneys-at-law, so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtaining of patents of invention, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of

A la vuelta →

Over →

medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

6.

unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy _____

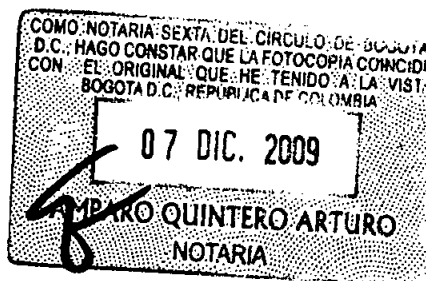
February 6, 1998

In/en Indianapolis, Indiana 46268

United States of America

Kenneth L. Loertscher Firma

Signature
Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary
& General Patent Counsel





Consulado General de Colombia

500 NORTH MICHIGAN AVENUE, SUITE 2040
CHICAGO, ILLINOIS 60611

TEL (312) 923-1196 FAX (312) 923-1197

No. 254

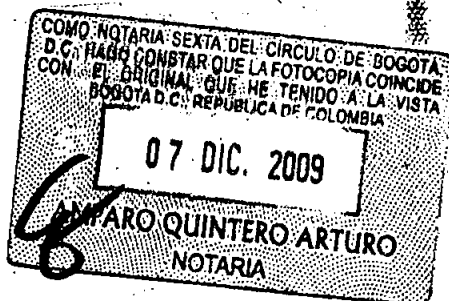
Chicago, FEB 20 1998

El suscrito Cónsul General de Colombia, CERTIFICA, que el señor (a) MARY REEVER quien como SECRETARIA DELEGADA ESTADO, IN. autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; que la compañía DOW AGROSCIENCES LLC es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes de DELAWARE y cumple su objeto conforme a las mismas; que el (a) señor (a) KENNETH L. WERTSCHER quien en su carácter de REPRESENTANTE LEGAL de la citada compañía confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

El Cónsul General no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES
US\$56.00 (Cincuenta y seis dólares)

CARLOS ALFONSO NEGRETTE
Cónsul General





100

RELACIONES
TERIORES
(1960)

2212207

Dejust

LA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
FUNCIONES INDICADAS

1998 MAR 11 AM 11:55

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1999



by: Deputy Secretary of State
Chicago
Secretary of State
Deputy Secretary of State

February 6, 1998
Tenth day of

at Indianapolis, this
set my hand and affixed the Great Seal of the State of Indiana,
Justice and elsewhere. In testimony whereof, I have hereunto
cial, full faith and credit ought to be given in all Courts of

that the term of said office included the date of February 6, 1998 : that to all his/her official acts as said offi-

appointed to the office of Notary Public in and for Hendricks County

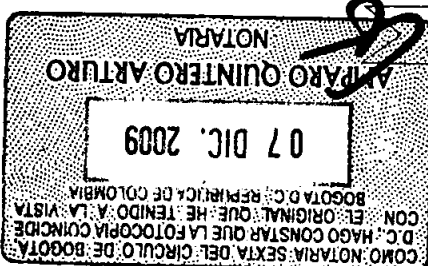
ording to records on file in my office, Lydia S. Owens was duly elected

Sue Anne Gilroy, Secretary of State of Indiana, DO HEREBY CERTIFY: That,

STATE OF INDIANA

CERTIFICATE OF OFFICE

UNITED STATES OF AMERICA



CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 6 días del mes de FEBRERO de 19 98
ante mí, Notario Público de ESTADO DE INDIANA
compareció(eron) personalmente KENNETH L. LOERTSCHER

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público — Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 6 de FEBRERO de 19 98
compareció(eron) ante mí
KENNETH L. LOERTSCHER

a quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía

denominada Dow AgroSciences LLC

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:

CERTIFICADO DE CONSTITUCION, FECHADO 1 JULIO 1997
CERTIFICADO DE MODIFICACION, FECHADO 1 OCT. 1997
RESOLUCION JUNTA DIRECTIVA, FECHADO 23 OCT. 1991
CONSENTIMIENTO ESCRITO DE LA JUNTA, 1 JULIO 1997

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Dow AgroSciences LLC

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente

de acuerdo con las leyes de 1 Estado de Delaware,
Estados Unidos de América

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana
46268, Estados Unidos de America.

2.3. Que el objeto u objeto para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) KENNETH L. LOERTSCHER
SECRETARIO ASISTENTE Y ASESOR LEGAL PATENTES

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad INDIANAPOLIS

Estado INDIANA

Hoy 6 FEB. de 19 98

Notario Público — Notary Public

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 6th day of February 19 98
before me, a Notary Public of State of Indiana.
personally appeared Kenneth L. Loertscher

to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 6th day of February 19 98
appeared before me
Kenneth L. Loertscher

who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Dow AgroSciences LLC Limited Liability Company, named Dow AgroSciences LLC Company.

I Certify:

1. That I have seen the following documents:

Certificate of formation, dated July 1, 1997
Certificate of amendment, dated October 1, 1997
Board resolution, dated October 23, 1991
Board written consent, dated July 1, 1997

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Dow AgroSciences LLC

is a Limited Liability Company legally constituted and in existence

in accordance with the laws of the State of Delaware,
United States of America

2.2. That the domicile of said Limited Liability Company is
9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana
46268, United States of America.

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power of Attorney is granted are contained within the corporation purposes set forth in the Charter of the corporation mentioned

2.4. That Mr. (Messrs.) Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary and General Patent Counsel
is (are) authorized to execute the foregoing document as Attorney.

City Indianapolis

State Indiana

This 6th day of Feb. 19 98

Lydia S. Owens

Lydia S. Owens
Notary Public, State of Indiana
Hendricks County
My Commission Expires 03/05/00

* Documents must be identified with date and origin.

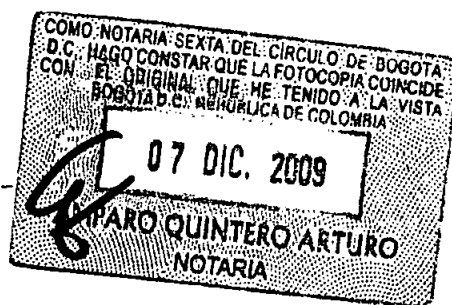
**CERTIFICACION NOTARIAL
Y AUTENTICACION CONSULAR**

1. Es necesaria la legalización con certificado notarial. El Notario Público debe certificar:
 - 1.1. Que la compañía está legalmente constituida y actualmente existente.
 - 1.2. Su domicilio.
 - 1.3. Que el propósito del poder está incluido en el objeto social de la compañía.
 - 1.4. Que el poderdante está autorizado para dar el poder en nombre de la compañía.
2. Los documentos que hay que mostrarle al Notario Público para probar los puntos anteriores, deben estar expresados en el Certificado Notarial con fecha y origen:
 - 2.1. Respecto a los puntos 1.1, 1.2 y 1.3 sugerimos referirse a los artículos de constitución con fecha y lugar de otorgamiento; y
 - 2.2. Para el punto 1.4 sugerimos mencionar la resolución de la Junta Directiva o los estatutos, según los cuales la persona que otorga el poder está autorizada para ello.
3. Enseguida el Señor Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

**NOTARIAL CERTIFICATION AND
CONSULAR AUTENTIFICATION**

1. Notarial legalization is necessary. The Notary Public must certify:
 - 1.1. That the company is legally constituted and presently existent.
 - 1.2. Its place of business.
 - 1.3. That the purpose of the Power-of-Arroney is included in the activities of the company.
 - 1.4. That the grantor is empowered to give the Power of Arroney in the name of the company he represents.
2. The documents which the Notary Public had before him to prove the above points must be listed by him in the Notarial Certificate with dated and origin:
 - 2.1. In connection with points 1.1., 1.2. and 1.3 we suggest referring to the articles of incorporation with date and place of execution.
 - 2.2. For point 1.4 we suggest to mention the resolution of the Board of Directors and/or the by-laws whereby the person who grants the Power of Arroney has been authorized to give it.
3. Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL COLOMBIANO: Según el artículo 259 del C. de P.C. el Señor Cónsul debe autenticar la última precedente autenticación.



11

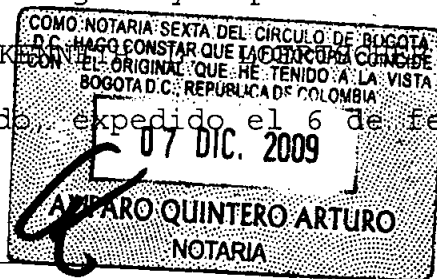
TRADUCCION OFICIAL No.03.075.98 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor al mismo tiempo que la presente. Esta traducción ha sido preparada por Bernarda R. de Martínez, Traductora Oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución No. 683 de 1991.

(Se traducen sellos y legalizaciones que aparecen a continuación de un documento escrito en inglés y español por medio del cual Dow AgroSciences LLC, otorga Poder a favor de GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ.)

Dado y firmado hoy 6 de febrero de 1998, en Indianápolis, Indiana, E.E.U.U., por Kenneth L. Loertscher, Subsecretario y Asesor General de Patentes.

(Sellos parciales en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

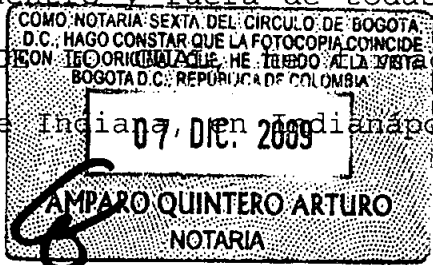
CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO), en inglés y español referente a la capacidad legal que tenía KENON para otorgar el documento antes mencionado, expedido el 6 de febrero de 1998 en el Estado de Indiana.



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD), en inglés y español referente a la existencia legal de la sociedad Dow AgroSciences LLC, expedido en la Ciudad de Indianápolis, Indiana, E.E.U.U., el 6 de febrero de 1998.

(Firmado), Lydia S. Owens, Notario Público
(Sello notarial en tinta), LYDIA S. OWENS Notario Público,
Estado de Indiana, Condado de Hendricks Mi comisión expira el
03/05/00
(Sello notarial seco), LYDIA S. OWENS NOTARIO PUBLICO INDIANA
(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en
Chicago.)

ESTADO UNIDOS DE AMERICA
CERTIFICADO DEL CARGO
ESTADO DE INDIANA

Yo, SUE ANN GILROY, Secretario de Estado de Indiana, POR EL
PRESENTE CERTIFICO: que, de acuerdo con los archivos que obran
en mi oficina, LYDIA S. OWENS fue debidamente elegido y
nombrado para el cargo de NOTARIO PUBLICO en y para el Condado
de Hendricks y que el término de dicho cargo incluía la fecha
del 6 de febrero de 1998: que a todos sus actos oficiales se
les debe dar completa fe y crédito dentro y fuera de todas las
Corte de Justicia. EN TESTIMONIO  y
estampado el Gran Sello del Estado de Indiana en Indianápolis,
hoy 10 de febrero de 1998.

(Firma facsimilar), Sue Ann Gilroy

Secretario de Estado

(Firmado), Por: Mary Reeve

Suplente

(Adherido se encuentra sello de oblea dorado con texto en
relieve), SELLO DEL ESTADO DE INDIANA 1816

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

(En español), Certificación de la firma y cargo de MARY REEVER, de la existencia legal de la compañía DOW AGROSCIENCES LLC y de la autoridad que tenía su representante Legal, KENNETH L. LOERTSCHER, para otorgar el poder mencionado arriba. Esta certificación fue expedida por el CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN CHICAGO, ILLINOIS, bajo el N° 254, de fecha 20 de febrero de 1998 y firmada por Carlos Alfonso Negret Mosquera, Cónsul General. Pagados Impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de veintiún dólares.

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

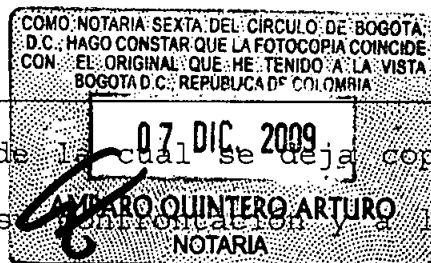
(al dorso), Legalización de la firma que antecede expedida el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 221-220, de fecha 11 de marzo de 1998 y firmada por el Jefe de Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, 17 de marzo de 1998

COLO 6641-801-001-3

BRM.137



Bernarda R. de Martínez

Bernarda R. de Martínez

Traductora e Interprete Oficial

Resolución 683 Minjusticia 1994

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

[Signature]

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 17 MAR 1998



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

98 MAR 18 AM 11:56

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

[Signature]
022686

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA EN BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

07 DIC. 2009

ARTURO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

CAVELIER

ABOGADOS

TENET®
CABLES: CAVELEYES
TELEX: 45479 CAVE-CO
TELEX: (23) 7407375 CAVE-UC

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

14
TELEFONOS: (57) (1) 347-36 11
(57) (1) 212-01 00
TELEFAX: (57) (1) 217-92 11
(57) (1) 235-88 50

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: DOW AGROSCIENCES LLC

Poder conferido el: 06-02-98

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,



GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

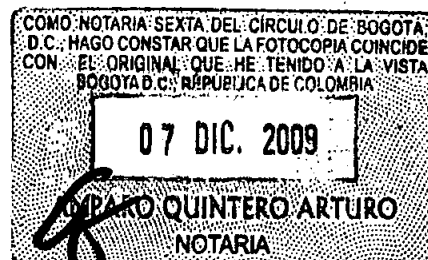
Acepto:



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



2e-780-2

15

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D. C. 25 FEB 1998
A M. PABLO MENDEZ BARAJAS S.
NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE BOGOTA.

Comparecieron
[Signature]
[Signature]
que en su nombre comparecieron la(s) C. C. 478019

que en su nombre comparecieron la(s) C. C. 2877924
77832 8721929

Comparecieron en Bogotá y declararon que la(s) firma(s) que
parecen(n) en el presente documento es(son)
y el contenido del mismo es cierto.
constancia se firma esta Diligencia.

[Signature]

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
07 DIC. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

[Signature]
NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ
BARAJAS
Notario Sexto Encargado

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 November 2008 (20.11.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/141154 A3

(51) International Patent Classification:
C12N 15/82 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/063212

(22) International Filing Date: 9 May 2008 (09.05.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/928,303 9 May 2007 (09.05.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): DOW
AGROSCIENCES LLC [US/US]; 9330 Zionsville Road,
Indianapolis, IN 46268-1054 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LIRA, Justin,
M. [US/US]; 12373 Ensley Drive, Fishers, IN 46038
(US). SNODDERLEY, Erika, Megan [US/US]; 7776
Cobblesprings Drive, Avon, IN 46123 (US). ROBINSON,
Andrew, E. [US/US]; 4099 Point Bar Road, Apt.1b, Indi-
anapolis, IN 46268 (US). WRIGHT, Terry, R. [US/US];
14162 Charity Chase Circle, Westfield, IN 46074 (US).
MERLO, Donald, J. [US/US]; 11845 Durbin Drive,
Carmel, IN 46032 (US).

(74) Agents: SANDERS, Jay, M. et al.; Baker & Daniels LLP,
300 North Meridian Street, Suite 2700, Indianapolis, Indi-
ana 46204 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

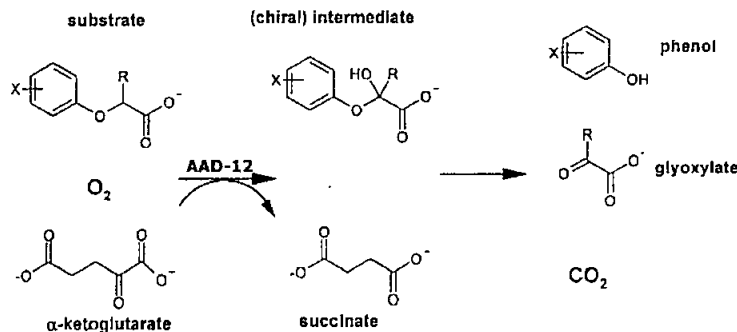
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL HERBICIDE RESISTANCE GENES



■ Addition of O_2 is stereospecific
■ Breakdown of intermediate to phenol + glyoxylate is spontaneous

FIGURE 1

(57) Abstract: The subject invention provides novel plants that are not only resistant to 2,4-D, but also to a pyridyloxyacetate herbicide. The subject invention also includes plants that produce one or more enzymes of the subject invention "stacked" together with one or more other herbicide resistance genes. The subject invention enables novel combinations of herbicides to be used in new ways. Furthermore, the subject invention provides novel methods of preventing the development of, and controlling, strains of weeds that are resistant to one or more herbicides such as glyphosate. The preferred enzyme and gene for use according to the subject invention are referred to herein as AAD-13 (Aryloxyalkanoate Dioxygenase). This highly novel discovery is the basis of significant herbicide tolerant crop trait and selectable marker opportunities.

17

WO 2008/141154 A3



— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

(88) Date of publication of the international search report:
5 February 2009

NOVEL HERBICIDE RESISTANCE GENES

Background of the Invention

Weeds can quickly deplete soil of valuable nutrients needed by crops and other desirable plants. There are many different types of herbicides presently used for the control of weeds. One extremely popular herbicide is glyphosate.

Crops, such as corn, soybeans, canola, cotton, sugar beets, wheat, turf, and rice, have been developed that are resistant to glyphosate. Thus, fields with actively growing glyphosate resistant soybeans, for example, can be sprayed to control weeds without significantly damaging the soybean plants.

With the introduction of genetically engineered, glyphosate tolerant crops (GTCs) in the mid-1990's, growers were enabled with a simple, convenient, flexible, and inexpensive tool for controlling a wide spectrum of broadleaf and grass weeds unparalleled in agriculture. Consequently, producers were quick to adopt GTCs and in many instances abandon many of the accepted best agronomic practices such as crop rotation, herbicide mode of action rotation, tank mixing, incorporation of mechanical with chemical and cultural weed control. Currently glyphosate tolerant soybean, cotton, corn, and canola are commercially available in the United States and elsewhere in the Western Hemisphere. Alfalfa was the first perennial GTC introduced, furthering the opportunity for repeated use of glyphosate on the same crop and fields repeatedly over a period of years. More GTCs (*e.g.*, wheat, rice, sugar beets, turf, *etc.*) are poised for introduction pending global market acceptance. Many other glyphosate resistant species are in experimental to development stages (*e.g.*, sugar cane, sunflower, beets, peas, carrot, cucumber, lettuce, onion, strawberry, tomato, and tobacco; forestry species like poplar and sweetgum; and horticultural species like marigold, petunia, and begonias; *see* "isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005" website). Additionally, the cost of glyphosate has dropped dramatically in recent years to the point that few conventional weed control programs can effectively compete on price and performance with glyphosate GTC systems.

Glyphosate has been used successfully in burndown and other non-crop areas for total vegetation control for more than 15 years. In many instances, as with GTCs, glyphosate has been used 1-3 times per year for 3, 5, 10, up to 15 years in a row. These circumstances have led to an over-reliance on glyphosate and GTC technology and have placed a heavy selection

pressure on native weed species for plants that are naturally more tolerant to glyphosate or which have developed a mechanism to resist glyphosate's herbicidal activity.

Extensive use of glyphosate-only weed control programs is resulting in the selection of glyphosate-resistant weeds, and is selecting for the propagation of weed species that are inherently more tolerant to glyphosate than most target species (*i.e.*, weed shifts). (Powles and Preston, 2006, Ng *et al.*, 2003; Simarmata *et al.*, 2003; Lorraine-Colwill *et al.*, 2003; Sfiligoj, 2004; Miller *et al.*, 2003; Heap, 2005; Murphy *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2002.) Although glyphosate has been widely used globally for more than 15 years, only a handful of weeds have been reported to have developed resistance to glyphosate (Heap, 2005); however, most of these have been identified in the past five years. Resistant weeds include both grass and broadleaf species—*Lolium rigidum*, *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica*, *Sorghum halepense*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Conyza canadensis*, *Conyza bonariensis*, *Plantago lanceolata*, *Amaranthus palmerii*, and *Amaranthus rudis*. Additionally, weeds that had previously not been an agronomic problem prior to the wide use of GTCs are now becoming more prevalent and difficult to control in the context of GTCs, which comprise >80% of U.S. cotton and soybean acres and >20% of U.S. corn acres (Gianessi, 2005). These weed shifts are occurring predominantly with (but not exclusively) difficult-to-control broadleaf weeds. Some examples include *Ipomoea*, *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Taraxacum*, and *Commelina* species.

In areas where growers are faced with glyphosate resistant weeds or a shift to more difficult-to-control weed species, growers can compensate for glyphosate's weaknesses by tank mixing or alternating with other herbicides that will control the missed weeds. One popular and efficacious tankmix partner for controlling broadleaf escapes in many instances has been 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). 2,4-D has been used agronomically and in non-crop situations for broad spectrum, broadleaf weed control for more than 60 years. Individual cases of more tolerant species have been reported, but 2,4-D remains one of the most widely used herbicides globally. A limitation to further use of 2,4-D is that its selectivity in dicot crops like soybean or cotton is very poor, and hence 2,4-D is not typically used on (and generally not near) sensitive dicot crops. Additionally, 2,4-D's use in grass crops is somewhat limited by the nature of crop injury that can occur. 2,4-D in combination with glyphosate has been used to provide a more robust burndown treatment prior to planting

no-till soybeans and cotton; however, due to these dicot species' sensitivity to 2,4-D, these burndown treatments must occur at least 14-30 days prior to planting (Agrilience, 2005).

2,4-D is in the phenoxy acid class of herbicides, as is MCPA. 2,4-D has been used in many monocot crops (such as corn, wheat, and rice) for the selective control of broadleaf weeds without severely damaging the desired crop plants. 2,4-D is a synthetic auxin derivative that acts to deregulate normal cell-hormone homeostasis and impede balanced, controlled growth; however, the exact mode of action is still not known. Triclopyr and fluroxypyr are pyridyloxyacetic acid herbicides whose mode of action is as a synthetic auxin, also.

These herbicides have different levels of selectivity on certain plants (e.g., dicots are more sensitive than grasses). Differential metabolism by different plants is one explanation for varying levels of selectivity. In general, plants metabolize 2,4-D slowly, so varying plant response to 2,4-D may be more likely explained by different activity at the target site(s) (WSSA, 2002). Plant metabolism of 2,4-D typically occurs via a two-phase mechanism, typically hydroxylation followed by conjugation with amino acids or glucose (WSSA, 2002).

Over time, microbial populations have developed an alternative and efficient pathway for degradation of this particular xenobiotic, which results in the complete mineralization of 2,4-D. Successive applications of the herbicide select for microbes that can utilize the herbicide as a carbon source for growth, giving them a competitive advantage in the soil. For this reason, 2,4-D currently formulated has a relatively short soil half-life, and no significant carryover effects to subsequent crops are encountered. This adds to the herbicidal utility of 2,4-D.

One organism that has been extensively researched for its ability to degrade 2,4-D is *Ralstonia eutropha* (Streber *et al.*, 1987). The gene that codes for the first enzymatic step in the mineralization pathway is *tfdA*. See U.S. Patent No. 6,153,401 and GENBANK Acc. No. M16730. *TfdA* catalyzes the conversion of 2,4-D acid to dichlorophenol (DCP) via an α -ketoglutarate-dependent dioxygenase reaction (Smejkal *et al.*, 2001). DCP has little herbicidal activity compared to 2,4-D. *TfdA* has been used in transgenic plants to impart 2,4-D resistance in dicot plants (e.g., cotton and tobacco) normally sensitive to 2,4-D (Streber *et al.* (1989), Lyon *et al.* (1989), Lyon (1993), and U.S. Patent No. 5,608,147).

A large number of *tfdA*-type genes that encode proteins capable of degrading 2,4-D have been identified from the environment and deposited into the Genbank database. Many

homologues are similar to *tfdA* (>85% amino acid identity) and have similar enzymatic properties to *tfdA*. However, there are a number of homologues that have a significantly lower identity to *tfdA* (25-50%), yet have the characteristic residues associated with α -ketoglutarate dioxygenase Fe^{+2} dioxygenases. It is therefore not obvious what the substrate specificities of these divergent dioxygenases are.

One unique example with low homology to *tfdA* (35% amino acid identity) is *sdpA* from *Sphingobium herbicidovorans* (Kohler *et al.*, 1999, Westendorf *et al.*, 2002, Westendorf *et al.*, 2003). This enzyme has been shown to catalyze the first step in (S)-dichlorprop (and other (S)-phenoxypropionic acids) as well as 2,4-D (a phenoxyacetic acid) mineralization (Westendorf *et al.*, 2003). Transformation of this gene into plants has not heretofore been reported.

Development of new herbicide-tolerant crop (HTC) technologies has been limited in success due largely to the efficacy, low cost, and convenience of GTCs. Consequently, a very high rate of adoption for GTCs has occurred among producers. This created little incentive for developing new HTC technologies.

Aryloxyalkanoate chemical substructures are a common entity of many commercialized herbicides including the phenoxyacetate auxins (such as 2,4-D and dichlorprop), pyridyloxyacetate auxins (such as fluroxypyr and triclopyr), aryloxyphenoxypropionates (AOPP) acetyl-coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibitors (such as haloxyfop, quizalofop, and diclofop), and 5-substituted phenoxyacetate protoporphyrinogen oxidase IX inhibitors (such as pyraflufen and flumiclorac). However, these classes of herbicides are all quite distinct, and no evidence exists in the current literature for common degradation pathways among these chemical classes. A multifunctional enzyme for the degradation of herbicides covering multiple modes of action has recently been described (PCT US/2005/014737; filed May 2, 2005). Another unique multifunctional enzyme and potential uses are described hereafter.

Brief Summary of the Invention

The subject invention provides novel plants that are not only resistant to 2,4-D, but also to pyridyloxyacetate herbicides. Heretofore, there was no expectation or suggestion that a plant with both of these advantageous properties could be produced by the introduction of a single gene. The subject invention also includes plants that produce one or more enzymes of

the subject invention "stacked" together with one or more other herbicide resistance genes, including, but not limited to, glyphosate-, ALS- (imidazolinone, sulfonylurea), aryloxyalkanoate-, HPPD-, PPO-, and glufosinate-resistance genes, so as to provide herbicide-tolerant plants compatible with broader and more robust weed control and herbicide resistance management options. The present invention further includes methods and compositions utilizing homologues of the genes and proteins exemplified herein.

In some embodiments, the invention provides monocot and dicot plants tolerant to 2,4-D, MCPA, fluroxypyr, and one or more commercially available herbicides (e.g., glyphosate, glufosinate, paraquat, ALS-inhibitors (e.g., sulfonylureas, imidazolinones, triazolopyrimidine sulfonanilides, et al), HPPD inhibitors (e.g., mesotrione, isoxaflutole, *et al.*), dicamba, bromoxynil, aryloxyphenoxypropionates, and others). Vectors comprising nucleic acid sequences responsible for such herbicide tolerance are also disclosed, as are methods of using such tolerant plants and combinations of herbicides for weed control and prevention of weed population shifts. The subject invention enables novel combinations of herbicides to be used in new ways. Furthermore, the subject invention provides novel methods of preventing the development of, and controlling, strains of weeds that are resistant to one or more herbicides such as glyphosate. The subject invention enables novel uses of novel combinations of herbicides and crops, including preplant application to an area to be planted immediately prior to planting with seed for plants that would otherwise be sensitive to that herbicide (such as 2,4-D).

The subject invention relates in part to the identification of an enzyme that is not only able to degrade 2,4-D, but also surprisingly possesses novel properties, which distinguish the enzyme of the subject invention from previously known *tfdA*-type proteins, for example. More specifically, the subject invention relates to the use of an enzyme that is capable of degrading both 2,4-D and pyridyloxyacetate herbicides. No α -ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme has previously been reported to have the ability to degrade herbicides of both the phenoxyacetate and pyridyloxyacetates auxin herbicides. The preferred enzyme and gene for use according to the subject invention are referred to herein as *AAD-13* (AryloxyAlkanoate Dioxygenase). This highly novel discovery is the basis of significant herbicide-tolerant crop (HTC) trait and selectable marker opportunities. Plants of the subject invention can be resistant throughout their entire life cycle.

There was no prior motivation to produce plants comprising an *AAD-13* gene (preferably an *AAD-13* polynucleotide that has a sequence optimized for expression in one or more types of plants, as exemplified herein), and there was no expectation that such plants could effectively produce an AAD-13 enzyme to render the plants resistant a phenoxyacetic acid herbicide (such as 2,4-D) and/or one or more pyridyloxyacetates herbicides such as triclopyr and fluroxypyr. Thus, the subject invention provides many advantages that were not heretofore thought to be possible in the art.

This invention also relates in part to the identification and use of genes encoding aryloxyalkanoate dioxygenase enzymes that are capable of degrading phenoxyacetate auxin and/or pyridyloxyacetates auxin herbicides. Methods of screening proteins for these activities are within the scope of the subject invention. Thus, the subject invention includes degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other aryloxyalkanoate auxin herbicides by a recombinantly expressed AAD-13 enzyme. The subject invention also includes methods of controlling weeds wherein said methods comprise applying one or more pyridyloxyacetate or phenoxyacetate auxin herbicides to plants comprising an *AAD-13* gene. The subject invention also provides methods of using an *AAD-13* gene as a selectable marker for identifying plant cells and whole plants transformed with *AAD-13*, optionally including one, two, or more exogenous genes simultaneously inserted into target plant cells. Methods of the subject invention include selecting transformed cells that are resistant to appropriate levels of an herbicide. The subject invention further includes methods of preparing a polypeptide, having the biological activity of aryloxyalkanoate dioxygenase, by culturing plants and/or cells of the subject invention.

Brief Description of the Figures

Figure 1 illustrates the general chemical reaction that is catalyzed by AAD-13 enzymes of the subject invention.

Figure 2 is a ClustalW alignment of α -ketoglutarate dioxygenases. Residues conserved in 80% of the sequences are highlighted. (Identical and similar residues are highlighted.)

Figure 3 illustrates the concomitant breakdown of α -ketoglutarate and the substrate of interest via AAD-13.

24

Brief Description of the Sequences

SEQ ID NO:1 is the native nucleotide sequence of *AAD-13* from *Sphingobium herbicidovorans*.

SEQ ID NO:2 is the translated protein sequence encoded by SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO:3 is the plant optimized nucleotide sequence of *AAD-13* (v1).

SEQ ID NO:4 is the translated protein sequence encoded by SEQ ID NO:3.

SEQ ID NO:5 is the E.coli optimized nucleotide sequence of *AAD-13* (v2).

SEQ ID NO:6 shows the sequence of the "sdpacodF" *AAD-13* (v1) primer.

SEQ ID NO:7 shows the sequence of the "sdpacodR" *AAD-13* (v1) primer.

SEQ ID NO:8 shows the sequence of the "sucCD" primer.

SEQ ID NO:9 shows the sequence of the "sucCD" primer.

SEQ ID NO:10 shows the sequence of the *AAD-13* (v2) primer.

SEQ ID NO:11 shows the sequence of the *AAD-13* (v2) primer.

Detailed Description of the Invention

The subject development of a 2,4-D resistance gene and subsequent resistant crops provides excellent options for controlling broadleaf, glyphosate-resistant (or highly tolerant and shifted) weed species for in-crop applications. 2,4-D is a broad-spectrum, relatively inexpensive, and robust broadleaf herbicide that would provide excellent utility for growers if greater crop tolerance could be provided in dicot and monocot crops alike. 2,4-D-tolerant transgenic dicot crops would also have greater flexibility in the timing and rate of application. An additional utility of the subject herbicide tolerance trait for 2,4-D is its utility to prevent damage to normally sensitive crops from 2,4-D drift, volatilization, inversion (or other off-site movement phenomenon), misapplication, vandalism, and the like. An additional benefit of the *AAD-13* gene is that unlike all *tfdA* homologues characterized to date, *AAD-13* is able to degrade the pyridyloxyacetates auxin (e.g., fluroxypyr) in addition to achiral phenoxy auxins (e.g., 2,4-D, MCPA, 4-chlorophenoxyacetic acid). See Table 1. A general illustration of the chemical reactions catalyzed by the subject *AAD-13* enzyme is shown in Figure 1. (Addition of O₂ is stereospecific; breakdown of intermediate to phenol and glyoxylate is spontaneous.) It should be understood that the chemical structures in Figure 1 illustrate the molecular backbones and that various R groups and the like (such as those shown in Table 1) are included but are not necessarily specifically illustrated in Figure 1. Multiple mixes of

different phenoxy auxin combinations have been used globally to address specific weed spectra and environmental conditions in various regions. Use of the *AAD-13* gene in plants affords protection to a much wider spectrum of auxin herbicides, thereby increasing the flexibility and spectra of weeds that can be controlled. The subject invention can also be used to protect from drift or other off-site synthetic auxin herbicide injury for the full breadth of commercially available phenoxy auxins. **Table 1** defines commercially available pyridyloxy and phenoxy auxins and provides relevant chemical structures.

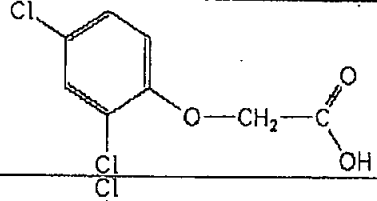
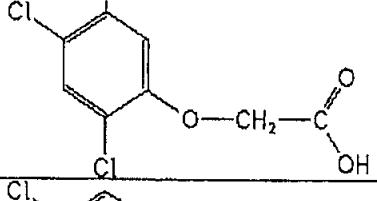
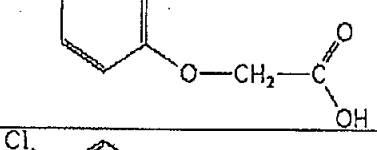
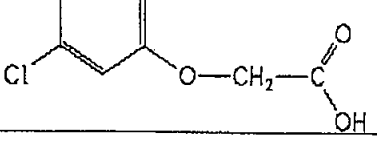
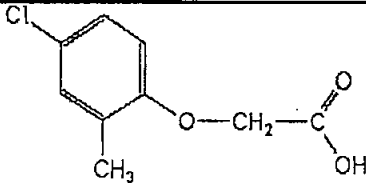
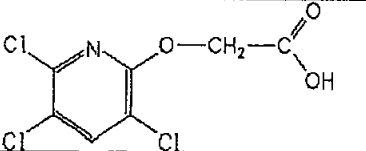
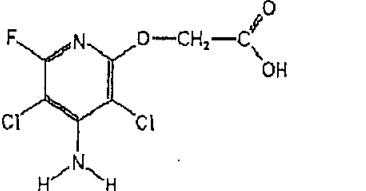
Table 1. Commercially available phenoxyacetate and pyridyloxyacetate auxins. Reference to phenoxy auxin and pyridyloxy auxin herbicides is generally made to the active acid but some are commercially formulated as any of a variety of corresponding ester formulations and these are likewise considered as substrates for AAD-13 enzyme <i>in planta</i> as general plant esterases convert these esters to the active acids <i>in planta</i> . Likewise reference can also be for the corresponding organic or inorganic salt of the corresponding acid. Possible use rate ranges can be as stand-alone treatments or in combination with other herbicides in both crop and non-crop uses.				
Chemical name	CAS no	Possible use rate ranges (g ae/ha)	Preferred use rate ranges (g ae/ha)	Structure
2,4-D	94-75-7	25 – 4000	280 – 1120	
2,4,5-T	93-76-5	25 – 4000	25 – 4000	
4-CPA	122-88-3	25 – 4000	25 – 4000	
3,4-DA	588-22-7	25 – 4000	25 – 4000	

Table 1. Commercially available phenoxyacetate and pyridyloxyacetate auxins. Reference to phenoxy auxin and pyridyloxy auxin herbicides is generally made to the active acid but some are commercially formulated as any of a variety of corresponding ester formulations and these are likewise considered as substrates for AAD-13 enzyme <i>in planta</i> as general plant esterases convert these esters to the active acids <i>in planta</i> . Likewise reference can also be for the corresponding organic or inorganic salt of the corresponding acid. Possible use rate ranges can be as stand-alone treatments or in combination with other herbicides in both crop and non-crop uses.				
Chemical name	CAS no	Possible use rate ranges (g ae/ha)	Preferred use rate ranges (g ae/ha)	Structure
MCPA	94-74-6	25 – 4000	125 – 1550	
Triclopyr	55335-06-3	50 – 2000	70 – 840	
Fluroxypyr	69377-81-7	25 – 2000	35 – 560	

A single gene (*AAD-13*) has now been identified which, when genetically engineered for expression in plants, has the properties to allow the use of phenoxy auxin herbicides in plants where inherent tolerance never existed or was not sufficiently high to allow use of these herbicides. Additionally, *AAD-13* can provide protection *in planta* to pyridyloxyacetate herbicides where natural tolerance also was not sufficient to allow selectivity, expanding the potential utility of these herbicides. Plants containing *AAD-13* alone now may be treated sequentially or tank mixed with one, two, or a combination of several phenoxy auxin herbicides. The rate for each phenoxy auxin herbicide may range from 25 to 4000 g ae/ha, and more typically from 100 to 2000 g ae/ha for the control of a broad spectrum of dicot weeds. Likewise, one, two, or a mixture of several pyridyloxyacetate auxin compounds may be applied to plants expressing *AAD-13* with reduced risk of injury from said herbicides. The rate for each pyridyloxyacetate herbicide may range from 25 to 2000 g ae/ha, and more typically from 35-840 g ae/ha for the control of additional dicot weeds.

Glyphosate is used extensively because it controls a very wide spectrum of broadleaf and grass weed species. However, repeated use of glyphosate in GTCs and in non-crop applications has, and will continue to, select for weed shifts to naturally more tolerant species or glyphosate-resistant biotypes. Tankmix herbicide partners used at efficacious rates that offer control of the same species but having different modes of action is prescribed by most herbicide resistance management strategies as a method to delay the appearance of resistant weeds. Stacking *AAD-13* with a glyphosate tolerance trait (and/or with other herbicide-tolerance traits) could provide a mechanism to allow for the control of glyphosate resistant dicot weed species in GTCs by enabling the use of glyphosate, phenoxy auxin(s) (e.g., 2,4-D) and pyridyloxyacetates auxin herbicides (e.g., fluroxypyr)—selectively in the same crop. Applications of these herbicides could be simultaneously in a tank mixture comprising two or more herbicides of different modes of action; individual applications of single herbicide composition in sequential applications as pre-plant, preemergence, or postemergence and split timing of applications ranging from approximately 2 hours to approximately 3 months; or, alternatively, any combination of any number of herbicides representing each chemical class can be applied at any timing within about 7 months of planting the crop up to harvest of the crop (or the preharvest interval for the individual herbicide, whichever is shortest).

It is important to have flexibility in controlling a broad spectrum of grass and broadleaf weeds in terms of timing of application, rate of individual herbicides, and the ability to control difficult or resistant weeds. Glyphosate applications in a crop with a glyphosate resistance gene/*AAD-13* stack could range from about 250-2500 g ae/ha; phenoxy auxin herbicide(s) (one or more) could be applied from about 25-4000 g ae/ha; and pyridyloxyacetates auxin herbicide(s) (one or more) could be applied from 25-2000 g ae/ha. The optimal combination(s) and timing of these application(s) will depend on the particular situation, species, and environment, and will be best determined by a person skilled in the art of weed control and having the benefit of the subject disclosure.

Plantlets are typically resistant throughout the entire growing cycle. Transformed plants will typically be resistant to new herbicide application at any time the gene is expressed. Tolerance is shown herein to 2,4-D across the life cycle using the constitutive promoters tested thus far (primarily CsVMV and AtUbi 10). One would typically expect this, but it is an improvement upon other non-metabolic activities where tolerance can be significantly impacted by the reduced expression of a site of action mechanism of resistance,

for example. One example is Roundup Ready cotton, where the plants were tolerant if sprayed early, but if sprayed too late the glyphosate concentrated in the meristems (because it is not metabolized and is translocated); viral promoters Monsanto used are not well expressed in the flowers. The subject invention provides an improvement in these regards.

Herbicide formulations (*e.g.*, ester, acid, or salt formulation; or soluble concentrate, emulsifiable concentrate, or soluble liquid) and tankmix additives (*e.g.*, adjuvants, surfactants, drift retardants, or compatibility agents) can significantly affect weed control from a given herbicide or combination of one or more herbicides. Any combination of these with any of the aforementioned herbicide chemistries is within the scope of this invention.

One skilled in the art would also see the benefit of combining two or more modes of action for increasing the spectrum of weeds controlled and/or for the control of naturally more tolerant or resistant weed species. This could also extend to chemistries for which herbicide tolerance was enabled in crops through human involvement (either transgenically or non-transgenically) beyond GTCs. Indeed, traits encoding glyphosate resistance (*e.g.*, resistant plant or bacterial *EPSPS* (including *Agro.* strain CP4), glyphosate oxidoreductase (*GOX*), *GAT*), glufosinate resistance (*e.g.*, *Pat*, *bar*), acetolactate synthase (*ALS*)-inhibiting herbicide resistance (*e.g.*, imidazolinone, sulfonylurea, triazolopyrimidine sulfonanilide, pyrimidinylthiobenzoates, and other chemistries = *AHAS*, *Csr1*, *SurA*, *et al.*), bromoxynil resistance (*e.g.*, *Bxn*), resistance to inhibitors of HPPD (4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase) enzyme, resistance to inhibitors of phytoene desaturase (*PDS*), resistance to photosystem II inhibiting herbicides (*e.g.*, *psbA*), resistance to photosystem I inhibiting herbicides, resistance to protoporphyrinogen oxidase IX (*PPO*)-inhibiting herbicides (*e.g.*, *PPO-1*), resistance to phenylurea herbicides (*e.g.*, *CYP76B1*), dicamba-degrading enzymes (*see, e.g.*, US 20030135879), and others could be stacked alone or in multiple combinations to provide the ability to effectively control or prevent weed shifts and/or resistance to any herbicide of the aforementioned classes. *In vivo* modified *EPSPS* can be used in some preferred embodiments, as well as Class I, Class II, and Class III glyphosate resistance genes.

Regarding additional herbicides, some additional preferred *ALS* inhibitors include but are not limited to the sulfonylureas (such as chlorsulfuron, halosulfuron, nicosulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, trifloxysulfuron), imidazolinones (such as imazamox, imazethapyr, imazaquin), triazolopyrimidine sulfonanilides (such as cloransulam-methyl, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, and penoxsulam),

pyrimidinylthiobenzoates (such as bispyribac and pyriithiobac), and flucarbazone. Some preferred HPPD inhibitors include but are not limited to mesotrione, isoxaflutole, and sulcotrione. Some preferred PPO inhibitors include but are not limited to flumiclorac, flumioxazin, flufenpyr, pyraflufen, fluthiacet, butafenacil, carfentrazone, sulfentrazone, and the diphenylethers (such as acifluorfen, fomesafen, lactofen, and oxyfluorfen).

Additionally, *AAD-13* alone or stacked with one or more additional HTC traits can be stacked with one or more additional input (*e.g.*, insect resistance, fungal resistance, or stress tolerance, *et al.*) or output (*e.g.*, increased yield, improved oil profile, improved fiber quality, *et al.*) traits. Thus, the subject invention can be used to provide a complete agronomic package of improved crop quality with the ability to flexibly and cost effectively control any number of agronomic pests.

The subject invention relates in part to the identification of an enzyme that is not only able to degrade 2,4-D, but also surprisingly possesses novel properties, which distinguish the enzyme of the subject invention from previously known *tfdA* proteins, for example. Even though this enzyme has very low homology to *tfdA*, the genes of the subject invention can still be generally classified in the same overall family of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. This family of proteins is characterized by three conserved histidine residues in a "HX(D/E)X₂₃₋₂₆(T/S)X₁₁₄₋₁₈₃HX₁₀₋₁₃R" motif which comprises the active site. The histidines coordinate Fe⁺² ion in the active site that is essential for catalytic activity (Hogan *et al.*, 2000). The preliminary *in vitro* expression experiments discussed herein were tailored to help select for novel attributes. These experiments also indicate the AAD-13 enzyme is unique from another disparate enzyme of the same class, disclosed in a previously filed patent application (PCT US/2005/014737; filed May 2, 2005). The AAD-1 enzyme of that application shares only about 25% sequence identity with the subject AAD-13 protein.

More specifically, the subject invention relates in part to the use of an enzyme that is not only capable of degrading 2,4-D, but also pyridyloxyacetate herbicides. No α -ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme, besides the previously identified AAD-1 and AAD-12 enzymes (subject of patent applications PCT US/2005/014737 (WO 2005/107437) and WO 2007/053482, respectively), has previously been reported to have the ability to degrade herbicides of different chemical classes with different modes of action. Preferred enzymes and genes for use according to the subject invention are referred to herein as AAD-13 (AryloxyAlkanoate Dioxygenase) genes and proteins.

This invention also relates in part to the identification and use of genes encoding aryloxyalkanoate dioxygenase enzymes that are capable of degrading phenoxy auxin and pyridyloxyacetate herbicides. Thus, the subject invention relates in part to the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, other phenoxyacetic acids, and pyridyloxyacetic acid herbicides by a recombinantly expressed AAD-13 enzyme.

The subject proteins tested positive for 2,4-D conversion to 2,4-dichlorophenol ("DCP"; herbicidally inactive) in analytical assays. Partially purified proteins of the subject invention can rapidly convert 2,4-D to DCP *in vitro*. An additional advantage that *AAD-13* transformed plants provide is that parent herbicide(s) are metabolized to inactive forms, thereby reducing the potential for harvesting herbicidal residues in grain or stover.

The subject invention also includes methods of controlling weeds wherein said methods comprise applying a pyridyloxyacetate and/or a phenoxy auxin herbicide to plants comprising an *AAD-13* gene.

In light of these discoveries, novel plants that comprise a polynucleotide encoding this type of enzyme are now provided. Heretofore, there was no motivation to produce such plants, and there was no expectation that such plants could effectively produce this enzyme to render the plants resistant to not only phenoxy acid herbicides (such as 2,4-D) but also pyridyloxyacetate herbicides. Thus, the subject invention provides many advantages that were not heretofore thought to be possible in the art.

Publicly available strains (deposited in culture collections like ATCC or DSMZ) can be acquired and screened, using techniques disclosed herein, for novel genes. Sequences disclosed herein can be used to amplify and clone the homologous genes into a recombinant expression system for further screening and testing according to the subject invention.

As discussed above in the Background section, one organism that has been extensively researched for its ability to degrade 2,4-D is *Ralstonia eutropha* (Streber *et al.*, 1987). The gene that codes for the first enzyme in the degradation pathway is *tfdA*. See U.S. Patent No. 6,153,401 and GENBANK Acc. No. M16730. *TfdA* catalyzes the conversion of 2,4-D acid to herbicidally inactive DCP via an α -ketoglutarate-dependent dioxygenase reaction (Smejkal *et al.*, 2001). *TfdA* has been used in transgenic plants to impart 2,4-D resistance in dicot plants (*e.g.*, cotton and tobacco) normally sensitive to 2,4-D (Streber *et al.*, 1989; Lyon *et al.*, 1989; Lyon *et al.*, 1993). A large number of *tfdA*-type genes that encode proteins capable of degrading 2,4-D have been identified from the environment and deposited

into the NCBI database. Many homologues are quite similar to *tfdA* (>85% amino acid identity) and have similar enzymatic properties to *tfdA*. However, a small collection of α -ketoglutarate-dependent dioxygenase homologues are presently identified that have a low level of homology to *tfdA*.

The subject invention relates in part to surprising discoveries of new uses for and functions of a distantly related enzyme, *sdpA*, from *Sphingobium herbicidovorans* (Westendorf *et al.*, 2002, 2003) with low homology to *tfdA* (35% amino acid identity) and low homology to the recently-identified AAD-1 (27% amino acid identity). This α -ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme purified in its native form had previously been shown to degrade 2,4-D and S-dichlorprop (Westendorf *et al.*, 2002 and 2003). However, no α -ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme has previously been reported to have the ability to degrade a selective herbicide of the pyridyloxyacetate chemical class. *SdpA* (from *Sphingobium herbicidovorans*) has never been expressed in plants, nor was there any motivation to do so in part because development of new HTC technologies has been limited due largely to the efficacy, low cost, and convenience of GTCs (Devine, 2005).

In light of the novel activity, proteins and genes of the subject invention are referred to herein as AAD-13 proteins and genes. AAD-13 was presently confirmed to degrade a variety of phenoxyacetate auxin herbicides *in vitro*. See Table 5.4.4-1 in Example 5, below. Additionally, this enzyme, as reported for the first time herein, was surprisingly found to also be capable of degrading additional substrates of the class of aryloxyalkanoate molecules. Substrates of significant agronomic importance include the pyridyloxyacetate auxin herbicides. This highly novel discovery is the basis of significant Herbicide Tolerant Crop (HTC) and selectable marker trait opportunities. This enzyme is unique in its ability to deliver herbicide degradative activity to a range of broad spectrum broadleaf herbicides (phenoxyacetate and pyridyloxyacetate auxins).

Thus, the subject invention relates in part to the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, other phenoxyacetic auxin herbicides, and pyridyloxyacetate herbicides by a recombinantly expressed aryloxyalkanoate dioxygenase enzyme (AAD-13). This invention also relates in part to identification and uses of genes encoding an aryloxyalkanoate dioxygenase degrading enzyme (AAD-13) capable of degrading phenoxy and/or pyridyloxy auxin herbicides.

The subject enzyme enables transgenic expression resulting in tolerance to combinations of herbicides that would control nearly all broadleaf weeds. *AAD-13* can serve as an excellent herbicide tolerant crop (HTC) trait to stack with other HTC traits [e.g., glyphosate resistance, glufosinate resistance, ALS-inhibitor (e.g., imidazolinone, sulfonylurea, triazolopyrimidine sulfonanilide) resistance, bromoxynil resistance, HPPD-inhibitor resistance, PPO-inhibitor resistance, *et al.*], and insect resistance traits (*Cry1F*, *Cry1Ab*, *Cry 34/45*, other Bt. Proteins, or insecticidal proteins of a non-*Bacillus* origin, *et al.*) for example. Additionally, *AAD-13* can serve as a selectable marker to aid in selection of primary transformants of plants genetically engineered with a second gene or group of genes.

In addition, the subject microbial gene has been redesigned such that the protein is encoded by codons having a bias toward both monocot and dicot plant usage (hemicot). *Arabidopsis*, corn, tobacco, cotton, soybean, canola, and rice have been transformed with *AAD-13*-containing constructs and have demonstrated high levels of resistance to both the phenoxy and pyridyloxy auxin herbicides. Thus, the subject invention also relates to "plant optimized" genes that encode proteins of the subject invention.

Oxyalkanoate groups are useful for introducing a stable acid functionality into herbicides. The acidic group can impart phloem mobility by "acid trapping," a desirable attribute for herbicide action and therefore could be incorporated into new herbicides for mobility purposes. Aspects of the subject invention also provide a mechanism of creating HTCs. There exist many potential commercial and experimental herbicides that can serve as substrates for *AAD-13*. Thus, the use of the subject genes can also result in herbicide tolerance to those other herbicides as well.

HTC traits of the subject invention can be used in novel combinations with other HTC traits (including but not limited to glyphosate tolerance). These combinations of traits give rise to novel methods of controlling weed (and like) species, due to the newly acquired resistance or inherent tolerance to herbicides (e.g., glyphosate). Thus, in addition to the HTC traits, novel methods for controlling weeds using herbicides, for which herbicide tolerance was created by said enzyme in transgenic crops, are within the scope of the invention.

This invention can be applied in the context of commercializing a 2,4-D resistance trait stacked with current glyphosate resistance traits in soybeans, for example. Thus, this invention provides a tool to combat broadleaf weed species shifts and/or selection of

herbicide resistant broadleaf weeds, which culminates from extremely high reliance by growers on glyphosate for weed control with various crops.

The transgenic expression of the subject *AAD-13* gene is exemplified in, for example, *Arabidopsis* and tobacco. Soybeans are a preferred crop for transformation according to the subject invention. However, this invention can be utilized in multiple other monocot (such as pasture grasses or turf grass) and dicot crops like alfalfa, clover, tree species, *et al.* Likewise, 2,4-D (or other AAD-13-substrates) can be more positively utilized in grass crops where tolerance is moderate, and increased tolerance via this trait would provide growers the opportunity to use these herbicides at more efficacious rates and over a wider application timing without the risk of crop injury.

Still further, the subject invention provides a single gene that can provide resistance to herbicides that control broadleaf weed. This gene may be utilized in multiple crops to enable the use of a broad spectrum herbicide combination. The subject invention can also control weeds resistant to current chemicals, and aids in the control of shifting weed spectra resulting from current agronomic practices. The subject AAD-13 can also be used in efforts to effectively detoxify additional herbicide substrates to non-herbicidal forms. Thus, the subject invention provides for the development of additional HTC traits and/or selectable marker technology.

Separate from, or in addition to, using the subject genes to produce HTCs, the subject genes can also be used as selectable markers for successfully selecting transformants in cell cultures, greenhouses, and in the field. There is high inherent value for the subject genes simply as a selectable marker for biotechnology projects. The promiscuity of AAD-13 for other aryloxyalkanoate auxinic herbicides provides many opportunities to utilize this gene for HTC and/or selectable marker purposes.

Proteins (and source isolates) of the subject invention. The present invention provides functional proteins. By "functional activity" (or "active") it is meant herein that the proteins/enzymes for use according to the subject invention have the ability to degrade or diminish the activity of a herbicide (alone or in combination with other proteins). Plants producing proteins of the subject invention will preferably produce "an effective amount" of the protein so that when the plant is treated with a herbicide, the level of protein expression is sufficient to render the plant completely or partially resistant or tolerant to the herbicide (at a typical rate, unless otherwise specified; typical application rates can be found in the well-

known *Herbicide Handbook* (Weed Science Society of America, Eighth Edition, 2002), for example). The herbicide can be applied at rates that would normally kill the target plant, at normal field use rates and concentrations. (Because of the subject invention, the level and/or concentration can optionally be higher than those that were previously used.) Preferably, plant cells and plants of the subject invention are protected against growth inhibition or injury caused by herbicide treatment. Transformed plants and plant cells of the subject invention are preferably rendered resistant or tolerant to an herbicide, as discussed herein, meaning that the transformed plant and plant cells can grow in the presence of effective amounts of one or more herbicides as discussed herein. Preferred proteins of the subject invention have catalytic activity to metabolize one or more aryloxyalkanoate compounds.

One cannot easily discuss the term "resistance" and not use the verb "tolerate" or the adjective "tolerant." The industry has spent innumerable hours debating Herbicide Tolerant Crops (HTC) versus Herbicide Resistant Crops (HRC). HTC is a preferred term in the industry. However, the official Weed Science Society of America definition of resistance is "the inherited ability of a plant to survive and reproduce following exposure to a dose of herbicide normally lethal to the wild type. In a plant, resistance may be naturally occurring or induced by such techniques as genetic engineering or selection of variants produced by tissue culture or mutagenesis." As used herein unless otherwise indicated, herbicide "resistance" is heritable and allows a plant to grow and reproduce in the presence of a typical herbicidally effective treatment by an herbicide for a given plant, as suggested by the current edition of *The Herbicide Handbook* as of the filing of the subject disclosure. As is recognized by those skilled in the art, a plant may still be considered "resistant" even though some degree of plant injury from herbicidal exposure is apparent. As used herein, the term "tolerance" is broader than the term "resistance," and includes "resistance" as defined herein, as well an improved capacity of a particular plant to withstand the various degrees of herbicidally induced injury that typically result in wild-type plants of the same genotype at the same herbicidal dose.

Transfer of the functional activity to plant or bacterial systems can involve a nucleic acid sequence, encoding the amino acid sequence for a protein of the subject invention, integrated into a protein expression vector appropriate to the host in which the vector will reside. One way to obtain a nucleic acid sequence encoding a protein with functional activity is to isolate the native genetic material from the bacterial species which produce the protein

of interest, using information deduced from the protein's amino acid sequence, as disclosed herein. The native sequences can be optimized for expression in plants, for example, as discussed in more detail below. An optimized polynucleotide can also be designed based on the protein sequence.

The subject invention provides classes of proteins having novel activities as identified herein. One way to characterize these classes of proteins and the polynucleotides that encode them is by defining a polynucleotide by its ability to hybridize, under a range of specified conditions, with an exemplified nucleotide sequence (the complement thereof and/or a probe or probes derived from either strand) and/or by their ability to be amplified by PCR using primers derived from the exemplified sequences.

There are a number of methods for obtaining proteins for use according to the subject invention. For example, antibodies to the proteins disclosed herein can be used to identify and isolate other proteins from a mixture of proteins. Specifically, antibodies may be raised to the portions of the proteins that are most conserved or most distinct, as compared to other related proteins. These antibodies can then be used to specifically identify equivalent proteins with the characteristic activity by immunoprecipitation, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), or immuno-blotting. Antibodies to the proteins disclosed herein, or to equivalent proteins, or to fragments of these proteins, can be readily prepared using standard procedures. Such antibodies are an aspect of the subject invention. Antibodies of the subject invention include monoclonal and polyclonal antibodies, preferably produced in response to an exemplified or suggested protein.

One skilled in the art would readily recognize that proteins (and genes) of the subject invention can be obtained from a variety of sources. Since entire herbicide degradation operons are known to be encoded on transposable elements such as plasmids, as well as genomically integrated, proteins of the subject invention can be obtained from a wide variety of microorganisms, for example, including recombinant and/or wild-type bacteria.

Mutants of bacterial isolates can be made by procedures that are well known in the art. For example, asporogenous mutants can be obtained through ethylmethane sulfonate (EMS) mutagenesis of an isolate. The mutant strains can also be made using ultraviolet light and nitrosoguanidine by procedures well known in the art.

A protein "from" or "obtainable from" any of the subject isolates referred to or suggested herein means that the protein (or a similar protein) can be obtained from the isolate.

or some other source, such as another bacterial strain or a plant. "Derived from" also has this connotation, and includes proteins obtainable from a given type of bacterium that are modified for expression in a plant, for example. One skilled in the art will readily recognize that, given the disclosure of a bacterial gene and protein, a plant can be engineered to produce the protein. Antibody preparations, nucleic acid probes (DNA, RNA, or PNA, for example), and the like can be prepared using the polynucleotide and/or amino acid sequences disclosed herein and used to screen and recover other related genes from other (natural) sources.

Standard molecular biology techniques may be used to clone and sequence the proteins and genes described herein. Additional information may be found in Sambrook *et al.*, 1989, which is incorporated herein by reference.

Polynucleotides and probes. The subject invention further provides nucleic acid sequences that encode proteins for use according to the subject invention. The subject invention further provides methods of identifying and characterizing genes that encode proteins having the desired herbicidal activity. In one embodiment, the subject invention provides unique nucleotide sequences that are useful as hybridization probes and/or primers for PCR techniques. The primers produce characteristic gene fragments that can be used in the identification, characterization, and/or isolation of specific genes of interest. The nucleotide sequences of the subject invention encode proteins that are distinct from previously described proteins.

The polynucleotides of the subject invention can be used to form complete "genes" to encode proteins or peptides in a desired host cell. For example, as the skilled artisan would readily recognize, the subject polynucleotides can be appropriately placed under the control of a promoter in a host of interest, as is readily known in the art. The level of gene expression and temporal/tissue specific expression can greatly impact the utility of the invention. Generally, greater levels of protein expression of a degradative gene will result in faster and more complete degradation of a substrate (in this case a target herbicide). Promoters will be desired to express the target gene at high levels unless the high expression has a consequential negative impact on the health of the plant. Typically, one would wish to have the *AAD-13* gene constitutively expressed in all tissues for complete protection of the plant at all growth stages. However, one could alternatively use a vegetatively expressed resistance gene; this would allow use of the target herbicide in-crop for weed control and would subsequently control sexual reproduction of the target crop by application during the

flowering stage. In addition, desired levels and times of expression can also depend on the type of plant and the level of tolerance desired. Some preferred embodiments use strong constitutive promoters combined with transcription enhancers and the like to increase expression levels and to enhance tolerance to desired levels. Some such applications are discussed in more detail below, before the Examples section.

As the skilled artisan knows, DNA typically exists in a double-stranded form. In this arrangement, one strand is complementary to the other strand and vice versa. As DNA is replicated in a plant (for example), additional complementary strands of DNA are produced. The "coding strand" is often used in the art to refer to the strand that binds with the anti-sense strand. The mRNA is transcribed from the "anti-sense" strand of DNA. The "sense" or "coding" strand has a series of codons (a codon is three nucleotides that can be read as a three-residue unit to specify a particular amino acid) that can be read as an open reading frame (ORF) to form a protein or peptide of interest. In order to produce a protein *in vivo*, a strand of DNA is typically transcribed into a complementary strand of mRNA which is used as the template for the protein. Thus, the subject invention includes the use of the exemplified polynucleotides shown in the attached sequence listing and/or equivalents including the complementary strands. RNA and PNA (peptide nucleic acids) that are functionally equivalent to the exemplified DNA molecules are included in the subject invention.

In one embodiment of the subject invention, bacterial isolates can be cultivated under conditions resulting in high multiplication of the microbe. After treating the microbe to provide single-stranded genomic nucleic acid, the DNA can be contacted with the primers of the invention and subjected to PCR amplification. Characteristic fragments of genes of interest will be amplified by the procedure, thus identifying the presence of the gene(s) of interest.

Further aspects of the subject invention include genes and isolates identified using the methods and nucleotide sequences disclosed herein. The genes thus identified can encode herbicidal resistance proteins of the subject invention.

Proteins and genes for use according to the subject invention can be identified and obtained by using oligonucleotide probes, for example. These probes are detectable nucleotide sequences that can be detectable by virtue of an appropriate label or may be made inherently fluorescent as described in International Application No. WO 93/16094. The probes (and the polynucleotides of the subject invention) may be DNA, RNA, or PNA. In

addition to adenine (A), cytosine (C), guanine (G), thymine (T), and uracil (U; for RNA molecules), synthetic probes (and polynucleotides) of the subject invention can also have inosine (a neutral base capable of pairing with all four bases; sometimes used in place of a mixture of all four bases in synthetic probes) and/or other synthetic (non-natural) bases. Thus, where a synthetic, degenerate oligonucleotide is referred to herein, and "N" or "n" is used generically, "N" or "n" can be G, A, T, C, or inosine. Ambiguity codes as used herein are in accordance with standard IUPAC naming conventions as of the filing of the subject application (for example, R means A or G, Y means C or T, *etc.*).

As is well known in the art, if a probe molecule hybridizes with a nucleic acid sample, it can be reasonably assumed that the probe and sample have substantial homology/similarity/identity. Preferably, hybridization of the polynucleotide is first conducted followed by washes under conditions of low, moderate, or high stringency by techniques well-known in the art, as described in, for example, Keller, G.H., M.M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, NY, pp. 169-170. For example, as stated therein, low stringency conditions can be achieved by first washing with 2x SSC (Standard Saline Citrate)/0.1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) for 15 minutes at room temperature. Two washes are typically performed. Higher stringency can then be achieved by lowering the salt concentration and/or by raising the temperature. For example, the wash described above can be followed by two washings with 0.1x SSC/0.1% SDS for 15 minutes each at room temperature followed by subsequent washes with 0.1x SSC/0.1% SDS for 30 minutes each at 55° C. These temperatures can be used with other hybridization and wash protocols set forth herein and as would be known to one skilled in the art (SSPE can be used as the salt instead of SSC, for example). The 2x SSC/0.1% SDS can be prepared by adding 50 ml of 20x SSC and 5 ml of 10% SDS to 445 ml of water. 20x SSC can be prepared by combining NaCl (175.3 g/0.150 M), sodium citrate (88.2 g/0.015 M), and water, adjusting pH to 7.0 with 10 N NaOH, then adjusting the volume to 1 liter. 10% SDS can be prepared by dissolving 10 g of SDS in 50 ml of autoclaved water, then diluting to 100 ml.

Detection of the probe provides a means for determining in a known manner whether hybridization has been maintained. Such a probe analysis provides a rapid method for identifying genes of the subject invention. The nucleotide segments used as probes according to the invention can be synthesized using a DNA synthesizer and standard procedures. These

nucleotide sequences can also be used as PCR primers to amplify genes of the subject invention.

Hybridization characteristics of a molecule can be used to define polynucleotides of the subject invention. Thus the subject invention includes polynucleotides (and/or their complements, preferably their full complements) that hybridize with a polynucleotide exemplified herein. That is, one way to define a gene (and the protein it encodes), for example, is by its ability to hybridize (under any of the conditions specifically disclosed herein) with a known or specifically exemplified gene.

As used herein, "stringent" conditions for hybridization refers to conditions which achieve the same, or about the same, degree of specificity of hybridization as the conditions employed by the current applicants. Specifically, hybridization of immobilized DNA on Southern blots with ³²P-labeled gene-specific probes can be performed by standard methods (see, e.g., Maniatis *et al.* 1982). In general, hybridization and subsequent washes can be carried out under conditions that allow for detection of target sequences. For double-stranded DNA gene probes, hybridization can be carried out overnight at 20-25° C below the melting temperature (T_m) of the DNA hybrid in 6x SSPE, 5x Denhardt's solution, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml denatured DNA. The melting temperature is described by the following formula (Beltz *et al.* 1983):

$$T_m = 81.5^\circ \text{C} + 16.6 \text{ Log}[\text{Na}^+] + 0.41(\% \text{G+C}) - 0.61(\% \text{formamide}) - 600/\text{length of duplex in base pairs}.$$

Washes can typically be carried out as follows:

- (1) Twice at room temperature for 15 minutes in 1x SSPE, 0.1% SDS (low stringency wash).
- (2) Once at T_m-20° C for 15 minutes in 0.2x SSPE, 0.1% SDS (moderate stringency wash).

For oligonucleotide probes, hybridization can be carried out overnight at 10-20° C below the melting temperature (T_m) of the hybrid in 6x SSPE, 5x Denhardt's solution, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml denatured DNA. T_m for oligonucleotide probes can be determined by the following formula:

$$T_m (^\circ \text{C}) = 2(\text{number T/A base pairs}) + 4(\text{number G/C base pairs})$$

(Suggs *et al.*, 1981).

Washes can typically be out as follows:

- (1) Twice at room temperature for 15 minutes 1x SSPE, 0.1% SDS (low stringency wash).
- (2) Once at the hybridization temperature for 15 minutes in 1x SSPE, 0.1% SDS (moderate stringency wash).

In general, salt and/or temperature can be altered to change stringency. With a labeled DNA fragment >70 or so bases in length, the following conditions can be used:

- | | |
|-----------|--------------------------------|
| Low: | 1 or 2x SSPE, room temperature |
| Low: | 1 or 2x SSPE, 42° C |
| Moderate: | 0.2x or 1x SSPE, 65° C |
| High: | 0.1x SSPE, 65° C. |

Duplex formation and stability depend on substantial complementarity between the two strands of a hybrid, and, as noted above, a certain degree of mismatch can be tolerated. Therefore, the probe sequences of the subject invention include mutations (both single and multiple), deletions, insertions of the described sequences, and combinations thereof, wherein said mutations, insertions and deletions permit formation of stable hybrids with the target polynucleotide of interest. Mutations, insertions, and deletions can be produced in a given polynucleotide sequence in many ways, and these methods are known to an ordinarily skilled artisan. Other methods may become known in the future.

PCR technology. Polymerase Chain Reaction (PCR) is a repetitive, enzymatic, primed synthesis of a nucleic acid sequence. This procedure is well known and commonly used by those skilled in this art (*see* Mullis, U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,683,202, and 4,800,159; Saiki *et al.*, 1985). PCR is based on the enzymatic amplification of a DNA fragment of interest that is flanked by two oligonucleotide primers that hybridize to opposite strands of the target sequence. The primers are preferably oriented with the 3' ends pointing towards each other. Repeated cycles of heat denaturation of the template, annealing of the primers to their complementary sequences, and extension of the annealed primers with a DNA polymerase result in the amplification of the segment defined by the 5' ends of the PCR primers. The extension product of each primer can serve as a template for the other primer, so each cycle essentially doubles the amount of DNA fragment produced in the previous cycle. This results in the exponential accumulation of the specific target fragment, up to several million-fold in a few hours. By using a thermostable DNA polymerase such as *Taq*

polymerase, isolated from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*, the amplification process can be completely automated. Other enzymes which can be used are known to those skilled in the art.

Exemplified DNA sequences, or segments thereof, can be used as primers for PCR amplification. In performing PCR amplification, a certain degree of mismatch can be tolerated between primer and template. Therefore, mutations, deletions, and insertions (especially additions of nucleotides to the 5' end) of the exemplified primers fall within the scope of the subject invention. Mutations, insertions, and deletions can be produced in a given primer by methods known to an ordinarily skilled artisan.

Modification of genes and proteins. The subject genes and proteins can be fused to other genes and proteins to produce chimeric or fusion proteins. The genes and proteins useful according to the subject invention include not only the specifically exemplified full-length sequences, but also portions, segments and/or fragments (including contiguous fragments and internal and/or terminal deletions compared to the full-length molecules) of these sequences, variants, mutants, chimerics, and fusions thereof. Proteins of the subject invention can have substituted amino acids so long as they retain desired functional activity. "Variant" genes have nucleotide sequences that encode the same proteins or equivalent proteins having activity equivalent or similar to an exemplified protein.

The terms "variant proteins" and "equivalent proteins" refer to proteins having the same or essentially the same biological/functional activity against the target substrates and equivalent sequences as the exemplified proteins. As used herein, reference to an "equivalent" sequence refers to sequences having amino acid substitutions, deletions, additions, or insertions that improve or do not adversely affect activity to a significant extent. Fragments retaining activity are also included in this definition. Fragments and other equivalents that retain the same or similar function or activity as a corresponding fragment of an exemplified protein are within the scope of the subject invention. Changes, such as amino acid substitutions or additions, can be made for a variety of purposes, such as increasing (or decreasing) protease stability of the protein (without materially/substantially decreasing the functional activity of the protein), removing or adding a restriction site, and the like. Variations of genes may be readily constructed using standard techniques for making point mutations, for example.

In addition, U.S. Patent No. 5,605,793, for example, describes methods for generating additional molecular diversity by using DNA reassembly after random or focused fragmentation. This can be referred to as gene "shuffling," which typically involves mixing fragments (of a desired size) of two or more different DNA molecules, followed by repeated rounds of renaturation. This can improve the activity of a protein encoded by a starting gene. The result is a chimeric protein having improved activity, altered substrate specificity, increased enzyme stability, altered stereospecificity, or other characteristics.

"Shuffling" can be designed and targeted after obtaining and examining the atomic 3D (three dimensional) coordinates and crystal structure of a protein of interest. Thus, "focused shuffling" can be directed to certain segments of a protein that are ideal for modification, such as surface-exposed segments, and preferably not internal segments that are involved with protein folding and essential 3D structural integrity.

Specific changes to the "active site" of the enzyme can be made to affect the inherent functionality with respect to activity or stereospecificity (see alignment **Figure 2**) Muller *et al.* (2006). The known tauD crystal structure was used as a model dioxygenase to determine active site residues while bound to its inherent substrate taurine. Elkins *et al.* (2002) "X-ray crystal structure of *Escherichia coli* taurine/alpha-ketoglutarate dioxygenase complexed to ferrous iron and substrates," *Biochemistry* 41(16):5185-5192. Regarding sequence optimization and designability of enzyme active sites, see Chakrabarti *et al.*, PNAS, (Aug. 23, 2005), 102(34):12035-12040.

Variant genes can be used to produce variant proteins; recombinant hosts can be used to produce the variant proteins. Using these "gene shuffling" techniques, equivalent genes and proteins can be constructed that comprise any 5, 10, or 20 contiguous residues (amino acid or nucleotide) of any sequence exemplified herein. As one skilled in the art knows, the gene shuffling techniques, for example, can be adjusted to obtain equivalents having, for example, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154,

155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, or 288 contiguous residues (amino acid or nucleotide), corresponding to a segment (of the same size) in any of the exemplified or suggested sequences (or the complements (full complements) thereof). Similarly sized segments, especially those for conserved regions, can also be used as probes and/or primers.

Fragments of full-length genes can be made using commercially available exonucleases or endonucleases according to standard procedures. For example, enzymes such as *Bal31* or site-directed mutagenesis can be used to systematically cut off nucleotides from the ends of these genes. Also, genes that encode active fragments may be obtained using a variety of restriction enzymes. Proteases may be used to directly obtain active fragments of these proteins.

It is within the scope of the invention as disclosed herein that proteins can be truncated and still retain functional activity. By "truncated protein" it is meant that a portion of a protein may be cleaved off while the remaining truncated protein retains and exhibits the desired activity after cleavage. Cleavage can be achieved by various proteases. Furthermore, effectively cleaved proteins can be produced using molecular biology techniques wherein the DNA bases encoding said protein are removed either through digestion with restriction endonucleases or other techniques available to the skilled artisan. After truncation, said proteins can be expressed in heterologous systems such as *E. coli*, baculoviruses, plant-based viral systems, yeast, and the like and then placed in insect assays as disclosed herein to determine activity. It is well-known in the art that truncated proteins can be successfully produced so that they retain functional activity while having less than the entire, full-length sequence. For example, *B.t.* proteins can be used in a truncated (core protein) form (*see, e.g., Höfte et al. (1989), and Adang et al. (1985)*). As used herein, the term "protein" can include functionally active truncations.

In some cases, especially for expression in plants, it can be advantageous to use truncated genes that express truncated proteins. Preferred truncated genes will typically encode 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% of the full-length protein.

Certain proteins of the subject invention have been specifically exemplified herein. As these proteins are merely exemplary of the proteins of the subject invention, it should be readily apparent that the subject invention comprises variant or equivalent proteins (and nucleotide sequences coding for equivalents thereof) having the same or similar activity of the exemplified proteins. Equivalent proteins will have amino acid similarity (and/or homology) with an exemplified protein. The amino acid identity will typically be at least 60%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, even more preferably at least 90%, and can be at least 95%. Preferred proteins of the subject invention can also be defined in terms of more particular identity and/or similarity ranges. For example, the identity and/or similarity can be 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% as compared to a sequence exemplified or suggested herein. Any number listed above can be used to define the upper and lower limits.

Unless otherwise specified, as used herein, percent sequence identity and/or similarity of two nucleic acids is determined using the algorithm of Karlin and Altschul, 1990, modified as in Karlin and Altschul 1993. Such an algorithm is incorporated into the NBLAST and XBLAST programs of Altschul *et al.*, 1990. BLAST nucleotide searches are performed with the NBLAST program, score = 100, wordlength = 12. Gapped BLAST can be used as described in Altschul *et al.*, 1997. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (NBLAST and XBLAST) are used. See NCBI/NIH website. To obtain gapped alignments for comparison purposes, the AlignX function of Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., North Bethesda, MD, U.S.A.), was used employing the default parameters. These were: a Gap opening penalty of 15, a Gap extension penalty of 6.66, and a Gap separation penalty range of 8.

Various properties and three-dimensional features of the protein can also be changed without adversely affecting the activity/functionality of the protein. Conservative amino acid substitutions can be tolerated/made to not adversely affect the activity and/or three-

dimensional configuration of the molecule. Amino acids can be placed in the following classes: non-polar, uncharged polar, basic, and acidic. Conservative substitutions whereby an amino acid of one class is replaced with another amino acid of the same type fall within the scope of the subject invention so long as the substitution is not adverse to the biological activity of the compound. Table 2 provides a listing of examples of amino acids belonging to each class.

Table 2	
Class of Amino Acid	Examples of Amino Acids
Nonpolar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Uncharged Polar	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Acidic	Asp, Glu
Basic	Lys, Arg, His

In some instances, non-conservative substitutions can also be made. However, preferred substitutions do not significantly detract from the functional/biological activity of the protein.

As used herein, reference to "isolated" polynucleotides and/or "purified" proteins refers to these molecules when they are not associated with the other molecules with which they would be found in nature. Thus, reference to "isolated" and/or "purified" signifies the involvement of the "hand of man" as described herein. For example, a bacterial "gene" of the subject invention put into a plant for expression is an "isolated polynucleotide." Likewise, a protein derived from a bacterial protein and produced by a plant is an "isolated protein."

Because of the degeneracy/redundancy of the genetic code, a variety of different DNA sequences can encode the amino acid sequences disclosed herein. It is well within the skill of a person trained in the art to create alternative DNA sequences that encode the same, or essentially the same, proteins. These variant DNA sequences are within the scope of the subject invention. This is also discussed in more detail below in the section entitled "Optimization of sequence for expression in plants."

Optimization of sequence for expression in plants. To obtain high expression of heterologous genes in plants it is generally preferred to reengineer the genes so that they are more efficiently expressed in (the cytoplasm of) plant cells. Maize is one such plant where it may be preferred to re-design the heterologous gene(s) prior to transformation to increase the expression level thereof in said plant. Therefore, an additional step in the design of genes

encoding a bacterial protein is reengineering of a heterologous gene for optimal expression, using codon bias more closely aligned with the target plant sequence, whether a dicot or monocot species. Sequences can also be optimized for expression in any of the more particular types of plants discussed elsewhere herein.

Transgenic hosts. The protein-encoding genes of the subject invention can be introduced into a wide variety of microbial or plant hosts. The subject invention includes transgenic plant cells and transgenic plants. Preferred plants (and plant cells) are corn, *Arabidopsis*, tobacco, soybeans, cotton, canola, rice, wheat, turf, legume forages (e.g., alfalfa and clover), pasture grasses, and the like. Other types of transgenic plants can also be made according to the subject invention, such as fruits, vegetables, ornamental plants, and trees. More generally, dicots and/or monocots can be used in various aspects of the subject invention.

In preferred embodiments, expression of the gene results, directly or indirectly, in the intracellular production (and maintenance) of the protein(s) of interest. Plants can be rendered herbicide-resistant in this manner. Such hosts can be referred to as transgenic, recombinant, transformed, and/or transfected hosts and/or cells. In some aspects of this invention (when cloning and preparing the gene of interest, for example), microbial (preferably bacterial) cells can be produced and used according to standard techniques, with the benefit of the subject disclosure.

Plant cells transfected with a polynucleotide of the subject invention can be regenerated into whole plants. The subject invention includes cell cultures including tissue cell cultures, liquid cultures, and plated cultures. Seeds produced by and/or used to generate plants of the subject invention are also included within the scope of the subject invention. Other plant tissues and parts are also included in the subject invention. The subject invention likewise includes methods of producing plants or cells comprising a polynucleotide of the subject invention. One preferred method of producing such plants is by planting a seed of the subject invention.

Although plants are preferred, the subject invention also includes production of highly active recombinant AAD-13 in a *Pseudomonas fluorescens* (Pf) host strain, for example. The subject invention includes preferred growth temperatures for maintaining soluble active AAD-13 in this host and a formulation process that can store and restore AAD-13 activity in

47

solution; and a lyophilization process that can retain AAD-13 activity for long-term storage and shelf life.

Insertion of genes to form transgenic hosts. One aspect of the subject invention is the transformation/transfection of plants, plant cells, and other host cells with polynucleotides of the subject invention that express proteins of the subject invention. Plants transformed in this manner can be rendered resistant to a variety of herbicides with different modes of action.

A wide variety of methods are available for introducing a gene encoding a desired protein into the target host under conditions that allow for stable maintenance and expression of the gene. These methods are well known to those skilled in the art and are described, for example, in U.S. Patent No. 5,135,867.

Vectors comprising an *AAD-13* polynucleotide are included in the scope of the subject invention. For example, a large number of cloning vectors comprising a replication system in *E. coli* and a marker that permits selection of the transformed cells are available for preparation for the insertion of foreign genes into higher plants. The vectors comprise, for example, pBR322, pUC series, M13mp series, pACYC184, *etc.* Accordingly, the sequence encoding the protein can be inserted into the vector at a suitable restriction site. The resulting plasmid is used for transformation into *E. coli*. The *E. coli* cells are cultivated in a suitable nutrient medium, then harvested and lysed. The plasmid is recovered by purification away from genomic DNA. Sequence analysis, restriction analysis, electrophoresis, and other biochemical-molecular biological methods are generally carried out as methods of analysis. After each manipulation, the DNA sequence used can be restriction digested and joined to the next DNA sequence. Each plasmid sequence can be cloned in the same or other plasmids. Depending on the method of inserting desired genes into the plant, other DNA sequences may be necessary. If, for example, the Ti or Ri plasmid is used for the transformation of the plant cell, then at least the right border, but often the right and the left border of the Ti or Ri plasmid T-DNA, has to be joined as the flanking region of the genes to be inserted. The use of T-DNA for the transformation of plant cells has been intensively researched and described in EP 120 516; Hoekema (1985); Fraley *et al.* (1986); and An *et al.* (1985).

A large number of techniques are available for inserting DNA into a plant host cell. Those techniques include transformation with T-DNA using *Agrobacterium tumefaciens* or *Agrobacterium rhizogenes* as transformation agent, fusion, injection, biolistics (microparticle bombardment), silicon carbide whiskers, aerosol beaming, PEG, or electroporation as well as

other possible methods. If *Agrobacteria* are used for the transformation, the DNA to be inserted has to be cloned into special plasmids, namely either into an intermediate vector or into a binary vector. The intermediate vectors can be integrated into the Ti or Ri plasmid by homologous recombination owing to sequences that are homologous to sequences in the T-DNA. The Ti or Ri plasmid also comprises the vir region necessary for the transfer of the T-DNA. Intermediate vectors cannot replicate themselves in *Agrobacteria*. The intermediate vector can be transferred into *Agrobacterium tumefaciens* by means of a helper plasmid (conjugation). Binary vectors can replicate themselves both in *E. coli* and in *Agrobacteria*. They comprise a selection marker gene and a linker or polylinker which are framed by the right and left T-DNA border regions. They can be transformed directly into *Agrobacteria* (Holsters, 1978). The *Agrobacterium* used as host cell is to comprise a plasmid carrying a vir region. The vir region is necessary for the transfer of the T-DNA into the plant cell. Additional T-DNA may be contained. The bacterium so transformed is used for the transformation of plant cells. Plant explants can be cultivated advantageously with *Agrobacterium tumefaciens* or *Agrobacterium rhizogenes* for the transfer of the DNA into the plant cell. Whole plants can then be regenerated from the infected plant material (for example, pieces of leaf, segments of stalk, roots, but also protoplasts or suspension-cultivated cells) in a suitable medium, which may contain antibiotics or biocides for selection. The plants so obtained can then be tested for the presence of the inserted DNA. No special demands are made of the plasmids in the case of injection and electroporation. It is possible to use ordinary plasmids, such as, for example, pUC derivatives.

The transformed cells grow inside the plants in the usual manner. They can form germ cells and transmit the transformed trait(s) to progeny plants. Such plants can be grown in the normal manner and crossed with plants that have the same transformed hereditary factors or other hereditary factors. The resulting hybrid individuals have the corresponding phenotypic properties.

In some preferred embodiments of the invention, genes encoding the bacterial protein are expressed from transcriptional units inserted into the plant genome. Preferably, said transcriptional units are recombinant vectors capable of stable integration into the plant genome and enable selection of transformed plant lines expressing mRNA encoding the proteins.

Once the inserted DNA has been integrated in the genome, it is relatively stable there (and does not come out again). It normally contains a selection marker that confers on the transformed plant cells resistance to a biocide or an antibiotic, such as kanamycin, G418, bleomycin, hygromycin, or chloramphenicol, *inter alia*. Plant selectable markers also typically can provide resistance to various herbicides such as glufosinate (*e.g.*, *PAT/bar*), glyphosate (*EPSPS*), ALS-inhibitors (*e.g.*, imidazolinone, sulfonylurea, triazolopyrimidine sulfonanilide, *et al.*), bromoxynil, HPPD-inhibitor resistance, PPO-inhibitors, ACC-ase inhibitors, and many others. The individually employed marker should accordingly permit the selection of transformed cells rather than cells that do not contain the inserted DNA. The gene(s) of interest are preferably expressed either by constitutive or inducible promoters in the plant cell. Once expressed, the mRNA is translated into proteins, thereby incorporating amino acids of interest into protein. The genes encoding a protein expressed in the plant cells can be under the control of a constitutive promoter, a tissue-specific promoter, or an inducible promoter.

Several techniques exist for introducing foreign recombinant vectors into plant cells, and for obtaining plants that stably maintain and express the introduced gene. Such techniques include the introduction of genetic material coated onto microparticles directly into cells (U.S. Patent Nos. 4,945,050 to Cornell and 5,141,131 to DowElanco, now Dow AgroSciences, LLC). In addition, plants may be transformed using *Agrobacterium* technology, *see* U.S. Patent Nos. 5,177,010 to University of Toledo; 5,104,310 to Texas A&M; European Patent Application 0131624B1; European Patent Applications 120516, 159418B1 and 176,112 to Schilperoot; U.S. Patent Nos. 5,149,645, 5,469,976, 5,464,763 and 4,940,838 and 4,693,976 to Schilperoot; European Patent Applications 116718, 290799, 320500, all to Max Planck; European Patent Applications 604662 and 627752, and U.S. Patent No. 5,591,616, to Japan Tobacco; European Patent Applications 0267159 and 0292435, and U.S. Patent No. 5,231,019, all to Ciba Geigy, now Syngenta; U.S. Patent Nos. 5,463,174 and 4,762,785, both to Calgene; and U.S. Patent Nos. 5,004,863 and 5,159,135, both to Agracetus. Other transformation technology includes whiskers technology. *See* U.S. Patent Nos. 5,302,523 and 5,464,765, both to Zeneca, now Syngenta. Other direct DNA delivery transformation technology includes aerosol beam technology. *See* U.S. Patent No. 6,809,232. Electroporation technology has also been used to transform plants. *See* WO 87/06614 to Boyce Thompson Institute; U.S. Patent Nos. 5,472,869 and 5,384,253, both to

Dekalb; and WO 92/09696 and WO 93/21335, both to Plant Genetic Systems. Furthermore, viral vectors can also be used to produce transgenic plants expressing the protein of interest. For example, monocotyledonous plants can be transformed with a viral vector using the methods described in U.S. Patent No. 5,569,597 to Mycogen Plant Science and Ciba-Geigy (now Syngenta), as well as U.S. Patent Nos. 5,589,367 and 5,316,931, both to Biosource, now Large Scale Biology.

As mentioned previously, the manner in which the DNA construct is introduced into the plant host is not critical to this invention. Any method that provides for efficient transformation may be employed. For example, various methods for plant cell transformation are described herein and include the use of Ti or Ri-plasmids and the like to perform *Agrobacterium* mediated transformation. In many instances, it will be desirable to have the construct used for transformation bordered on one or both sides by T-DNA borders, more specifically the right border. This is particularly useful when the construct uses *Agrobacterium tumefaciens* or *Agrobacterium rhizogenes* as a mode for transformation, although T-DNA borders may find use with other modes of transformation. Where *Agrobacterium* is used for plant cell transformation, a vector may be used which may be introduced into the host for homologous recombination with T-DNA or the Ti or Ri plasmid present in the host. Introduction of the vector may be performed via electroporation, tri-parental mating and other techniques for transforming gram-negative bacteria which are known to those skilled in the art. The manner of vector transformation into the *Agrobacterium* host is not critical to this invention. The Ti or Ri plasmid containing the T-DNA for recombination may be capable or incapable of causing gall formation, and is not critical to said invention so long as the vir genes are present in said host.

In some cases where *Agrobacterium* is used for transformation, the expression construct being within the T-DNA borders will be inserted into a broad spectrum vector such as pRK2 or derivatives thereof as described in Ditta *et al.* (1980) and EPO 0 120 515. Included within the expression construct and the T-DNA will be one or more markers as described herein which allow for selection of transformed *Agrobacterium* and transformed plant cells. The particular marker employed is not essential to this invention, with the preferred marker depending on the host and construction used.

For transformation of plant cells using *Agrobacterium*, explants may be combined and incubated with the transformed *Agrobacterium* for sufficient time to allow transformation

thereof. After transformation, the *Agrobacteria* are killed by selection with the appropriate antibiotic and plant cells are cultured with the appropriate selective medium. Once calli are formed, shoot formation can be encouraged by employing the appropriate plant hormones according to methods well known in the art of plant tissue culturing and plant regeneration. However, a callus intermediate stage is not always necessary. After shoot formation, said plant cells can be transferred to medium which encourages root formation thereby completing plant regeneration. The plants may then be grown to seed and said seed can be used to establish future generations. Regardless of transformation technique, the gene encoding a bacterial protein is preferably incorporated into a gene transfer vector adapted to express said gene in a plant cell by including in the vector a plant promoter regulatory element, as well as 3' non-translated transcriptional termination regions such as Nos and the like.

In addition to numerous technologies for transforming plants, the type of tissue that is contacted with the foreign genes may vary as well. Such tissue would include but would not be limited to embryogenic tissue, callus tissue types I, II, and III, hypocotyl, meristem, root tissue, tissues for expression in phloem, and the like. Almost all plant tissues may be transformed during dedifferentiation using appropriate techniques described herein.

As mentioned above, a variety of selectable markers can be used, if desired. Preference for a particular marker is at the discretion of the artisan, but any of the following selectable markers may be used along with any other gene not listed herein which could function as a selectable marker. Such selectable markers include but are not limited to aminoglycoside phosphotransferase gene of transposon Tn5 (Aph II) which encodes resistance to the antibiotics kanamycin, neomycin and G41; hygromycin resistance; methotrexate resistance, as well as those genes which encode for resistance or tolerance to glyphosate; phosphinothricin (bialaphos or glufosinate); ALS-inhibiting herbicides (imidazolinones, sulfonylureas and triazolopyrimidine herbicides), ACC-ase inhibitors (e.g., aryloxypropionates or cyclohexanediones), and others such as bromoxynil, and HPPD-inhibitors (e.g., mesotrione) and the like.

In addition to a selectable marker, it may be desirable to use a reporter gene. In some instances a reporter gene may be used with or without a selectable marker. Reporter genes are genes that are typically not present in the recipient organism or tissue and typically encode for proteins resulting in some phenotypic change or enzymatic property. Examples of such genes are provided in Weising *et al.*, 1988. Preferred reporter genes include the beta-

glucuronidase (GUS) of the *uidA* locus of *E. coli*, the chloramphenicol acetyl transferase gene from Tn9 of *E. coli*, the green fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Aequorea victoria*, and the luciferase genes from firefly *Photinus pyralis*. An assay for detecting reporter gene expression may then be performed at a suitable time after said gene has been introduced into recipient cells. A preferred such assay entails the use of the gene encoding beta-glucuronidase (GUS) of the *uidA* locus of *E. coli* as described by Jefferson *et al.*, (1987) to identify transformed cells.

In addition to plant promoter regulatory elements, promoter regulatory elements from a variety of sources can be used efficiently in plant cells to express foreign genes. For example, promoter regulatory elements of bacterial origin, such as the octopine synthase promoter, the nopaline synthase promoter, the mannopine synthase promoter; promoters of viral origin, such as the cauliflower mosaic virus (35S and 19S), 35T (which is a re-engineered 35S promoter, *see* U.S. Patent No. 6,166,302, especially Example 7E) and the like may be used. Plant promoter regulatory elements include but are not limited to ribulose-1,6-bisphosphate (RUBP) carboxylase small subunit (*ssu*), beta-conglycinin promoter, beta-phaseolin promoter, ADH promoter, heat-shock promoters, and tissue specific promoters. Other elements such as matrix attachment regions, scaffold attachment regions, introns, enhancers, polyadenylation sequences and the like may be present and thus may improve the transcription efficiency or DNA integration. Such elements may or may not be necessary for DNA function, although they can provide better expression or functioning of the DNA by affecting transcription, mRNA stability, and the like. Such elements may be included in the DNA as desired to obtain optimal performance of the transformed DNA in the plant. Typical elements include but are not limited to Adh-intron 1, Adh-intron 6, the alfalfa mosaic virus coat protein leader sequence, osmotin UTR sequences, the maize streak virus coat protein leader sequence, as well as others available to a skilled artisan. Constitutive promoter regulatory elements may also be used thereby directing continuous gene expression in all cells types and at all times (*e.g.*, actin, ubiquitin, CaMV 35S, and the like). Tissue specific promoter regulatory elements are responsible for gene expression in specific cell or tissue types, such as the leaves or seeds (*e.g.*, zein, oleosin, napin, ACP, globulin and the like) and these may also be used.

Promoter regulatory elements may also be active (or inactive) during a certain stage of the plant's development as well as active in plant tissues and organs. Examples of such

include but are not limited to pollen-specific, embryo-specific, corn-silk-specific, cotton-fiber-specific, root-specific, seed-endosperm-specific, or vegetative phase-specific promoter regulatory elements and the like. Under certain circumstances it may be desirable to use an inducible promoter regulatory element, which is responsible for expression of genes in response to a specific signal, such as: physical stimulus (heat shock genes), light (RUBP carboxylase), hormone (Em), metabolites, chemical (tetracycline responsive), and stress. Other desirable transcription and translation elements that function in plants may be used. Numerous plant-specific gene transfer vectors are known in the art.

Plant RNA viral based systems can also be used to express bacterial protein. In so doing, the gene encoding a protein can be inserted into the coat promoter region of a suitable plant virus which will infect the host plant of interest. The protein can then be expressed thus providing protection of the plant from herbicide damage. Plant RNA viral based systems are described in U.S. Patent No. 5,500,360 to Mycogen Plant Sciences, Inc. and U.S. Patent Nos. 5,316,931 and 5,589,367 to Biosource, now Large Scale Biology.

Means of further increasing tolerance or resistance levels. It is shown herein that plants of the subject invention can be imparted with novel herbicide resistance traits without observable adverse effects on phenotype including yield. Such plants are within the scope of the subject invention. Plants exemplified and suggested herein can withstand 2X, 3X, 4X, and 5X typical application levels, for example, of at least one subject herbicide. Improvements in these tolerance levels are within the scope of this invention. For example, various techniques are known in the art, and can foreseeably be optimized and further developed, for increasing expression of a given gene.

One such method includes increasing the copy number of the subject *AAD-13* genes (in expression cassettes and the like). Transformation events can also be selected for those having multiple copies of the genes.

Strong promoters and enhancers can be used to "supercharge" expression. Examples of such promoters include the preferred 35T promoter which uses 35S enhancers. 35S, maize ubiquitin, Arabidopsis ubiquitin, A.t. actin, and CSMV promoters are included for such uses. Other strong viral promoters are also preferred. Enhancers include 4 OCS and the 35S double enhancer. Matrix attachment regions (MARs) can also be used to increase transformation efficiencies and transgene expression, for example.

Shuffling (directed evolution) and transcription factors can also be used for embodiments according to the subject invention.

Variant proteins can also be designed that differ at the sequence level but that retain the same or similar overall essential three-dimensional structure, surface charge distribution, and the like. See e.g. U.S. Patent No. 7,058,515; Larson et al., *Protein Sci.* 2002 11: 2804-2813, "Thoroughly sampling sequence space: Large-scale protein design of structural ensembles."; Cramer et al., *Nature Biotechnology* 15, 436 - 438 (1997), "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling."; Stemmer, W.P.C. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751; Stemmer, W.P.C. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-391; Stemmer, W.P.C. 1995. Searching sequence space. *Bio/Technology* 13: 549-553; Cramer, A., Cwirla, S. and Stemmer, W.P.C. 1996. Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nature Medicine* 2: 100-103; and Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P.C. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology* 14: 315-319.

The activity of recombinant polynucleotides inserted into plant cells can be dependent upon the influence of endogenous plant DNA adjacent the insert. Thus, another option is taking advantage of events that are known to be excellent locations in a plant genome for insertions. See e.g. WO 2005/103266 A1, relating to *cryIF* and *cryIAC* cotton events; the subject *AAD-13* gene can be substituted in those genomic loci in place of the *cryIF* and/or *cryIAC* inserts. Thus, targeted homologous recombination, for example, can be used according to the subject invention. This type of technology is the subject of, for example, WO 03/080809 A2 and the corresponding published U.S. application (USPA 20030232410), relating to the use of zinc fingers for targeted recombination. The use of recombinases (cre-lox and flp-frt for example) is also known in the art.

AAD-13 detoxification is believed to occur in the cytoplasm. Thus, means for further stabilizing this protein and mRNAs (including blocking mRNA degradation) are included in aspects of the subject invention, and art-known techniques can be applied accordingly. The subject proteins can be designed to resist degradation by proteases and the like (protease cleavage sites can be effectively removed by re-engineering the amino acid sequence of the protein). Such embodiments include the use of 5' and 3' stem loop structures like UTRs from

osmotin, and per5 (AU-rich untranslated 5' sequences). 5' caps like 7-methyl or 2'-O-methyl groups, e.g., 7-methylguanylic acid residue, can also be used. *See, e.g., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 74, No. 7, pp. 2734-2738 (July 1977) Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis.* Protein complexes or ligand blocking groups can also be used.

Computational design of 5' or 3' UTR most suitable for *AAD-13* (synthetic hairpins) can also be conducted within the scope of the subject invention. Computer modeling in general, as well as gene shuffling and directed evolution, are discussed elsewhere herein. More specifically regarding computer modeling and UTRs, computer modeling techniques for use in predicting/evaluating 5' and 3' UTR derivatives of the present invention include, but are not limited to: MFold version 3.1 available from Genetics Corporation Group, Madison, WI (see Zucker et al., Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In *RNA Biochemistry and Biotechnology*, 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker et al., *Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure*. *J. Mol. Biol.* 288, 911-940 (1999); Zucker et al., RNA Secondary Structure Prediction. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* S. Beaucage, D.E. Bergstrom, G.D. Glick, and R.A. Jones eds., John Wiley & Sons, New York, 11.2.1-11.2.10, (2000)), COVE (RNA structure analysis using covariance models (stochastic context free grammar methods)) v.2.4.2 (Eddy & Durbin, *Nucl. Acids Res.* 1994, 22: 2079-2088) which is freely distributed as source code and which can be downloaded by accessing the website genetics.wustl.edu/eddy/software/, and FOLDALIGN, also freely distributed and available for downloading at the website bioinf.au.dk.FOLDALIGN/ (see *Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences*. J. Gorodkin, L. J. Heyer and G. D. Stormo. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, no. 18 pp 3724-3732, 1997; *Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences*. J. Gorodkin, L. J. Heyer, and G. D. Stormo. *ISMB* 5:120-123, 1997).

Embodiments of the subject invention can be used in conjunction with naturally evolved or chemically induced mutants (mutants can be selected by screening techniques, then transformed with *AAD-13* and possibly other genes). Plants of the subject invention can be combined with ALS resistance and/or evolved glyphosate resistance. Aminopyralid resistance, for example, can also be combined or "stacked" with an *AAD-13* gene.

Traditional breeding techniques can also be combined with the subject invention to powerfully combine, introgress, and improve desired traits.

Further improvements also include use with appropriate safeners to further protect plants and/or to add cross resistance to more herbicides. (Safeners typically act to increase plants immune system by activating/expressing cP450. Safeners are chemical agents that reduce the phytotoxicity of herbicides to crop plants by a physiological or molecular mechanism, without compromising weed control efficacy.)

Herbicide safeners include benoxacor, cloquintocet, cyometrinil, dichlormid, dicyclonon, dietholate, fenchlorazole, fenclorim, flurazole, fluxofenim, furilazole, isoxadifen, mefenpyr, mephenate, naphthalic anhydride, and oxabetrinil. Plant activators (a new class of compounds that protect plants by activating their defense mechanisms) can also be used in embodiments of the subject invention. These include acibenzolar and probenazole.

Commercialized safeners can be used for the protection of large-seeded grass crops, such as corn, grain sorghum, and wet-sown rice, against preplant-incorporated or preemergence-applied herbicides of the thiocarbamate and chloroacetanilide families. Safeners also have been developed to protect winter cereal crops such as wheat against postemergence applications of aryloxyphenoxypropionate and sulfonylurea herbicides. The use of safeners for the protection of corn and rice against sulfonylurea, imidazolinone, cyclohexanedione, isoxazole, and triketone herbicides is also well-established. A safener-induced enhancement of herbicide detoxification in safened plants is widely accepted as the major mechanism involved in safener action. Safeners induce cofactors such as glutathione and herbicide-detoxifying enzymes such as glutathione *S*-transferases, cytochrome P450 monooxygenases, and glucosyl transferases. Hatzios KK, Burgos N (2004) "Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners," *Weed Science*: Vol. 52, No. 3 pp. 454–467.

Use of a cytochrome p450 monooxygenase gene stacked with *AAD-13* is one preferred embodiment. There are P450s involved in herbicide metabolism; cP450 can be of mammalian or plant origin, for example. In higher plants, cytochrome P450 monooxygenase (P450) is known to conduct secondary metabolism. It also plays an important role in the oxidative metabolism of xenobiotics in cooperation with NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (reductase). Resistance to some herbicides has been reported as a result of the metabolism by P450 as well as glutathione *S*-transferase. A number of microsomal P450

species involved in xenobiotic metabolism in mammals have been characterized by molecular cloning. Some of them were reported to metabolize several herbicides efficiently. Thus, transgenic plants with plant or mammalian P450 can show resistance to several herbicides.

One preferred embodiment of the foregoing is the use cP450 for resistance to acetochlor (acetochlor-based products include Surpass®, Keystone®, Keystone LA, FulTime® and TopNotch® herbicides) and/or trifluralin (such as Treflan®). Such resistance in soybeans and/or corn is included in some preferred embodiments. For additional guidance regarding such embodiments, *see e.g.* Inui *et al.*, "A selectable marker using cytochrome P450 monooxygenases for Arabidopsis transformation," *Plant Biotechnology* 22, 281-286 (2005) (relating to a selection system for transformation of *Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium tumefaciens* that uses human cytochrome P450 monooxygenases that metabolize herbicides; herbicide tolerant seedlings were transformed and selected with the herbicides acetochlor, amiprofos-methyl, chlorpropham, chlorsulfuron, norflurazon, and pendimethalin); Siminszky *et al.*, "Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides," *PNAS* Vol. 96, Issue 4, 1750-1755, February 16, 1999; Sheldon *et al.*, *Weed Science*: Vol. 48, No. 3, pp. 291-295, "A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*"; and "Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19," *J Agric Food Chem.* 2006 Apr 19;54(8):2985-91 (relating to testing a human cytochrome p450 monooxygenase in rice where the rice plants reportedly showed high tolerance to chloroacetamides (acetochlor, alachlor, metoachlor, pretilachlor, and thenylchlor), oxyacetamides (mefenacet), pyridazinones (norflurazon), 2,6-dinitroanilines (trifluralin and pendimethalin), phosphamidates (amiprofos-methyl, thiocarbamates (pyributicarb), and ureas (chlortoluron)).

There is also the possibility of altering or using different 2,4-D chemistries to make the subject *AAD-13* gene more efficient. Such possible changes include creating better substrates and better leaving groups (higher electronegativity).

Auxin transport inhibitors (e.g. diflufenzopyr) can also be used to increase herbicide activity with 2,4-D.

Unless specifically indicated or implied, the terms “a”, “an”, and “the” signify “at least one” as used herein.

All patents, patent applications, provisional applications, and publications referred to or cited herein are incorporated by reference in their entirety to the extent they are not inconsistent with the explicit teachings of this specification.

Following are examples that illustrate procedures for practicing the invention. These examples should not be construed as limiting. All percentages are by weight and all solvent mixture proportions are by volume unless otherwise noted.

Example 1 – Method for Identifying Genes That Impart Herbicide Resistance *In Planta*

As a way to identify genes which possess herbicide degrading activities *in planta*, it is possible to mine current public databases such as NCBI (National Center for Biotechnology Information). To begin the process, it is necessary to have a functional gene sequence already identified that encodes a protein with the desired characteristics (*i.e.*, α -ketoglutarate dioxygenase activity). This protein sequence is then used as the input for the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) algorithm to compare against available NCBI protein sequences deposited. Using default settings, this search returns upwards of 100 homologous protein sequences at varying levels. These range from highly identical (85-98%) to very low identity (23-35%) at the amino acid level. Traditionally only sequences with high homology would be expected to retain similar properties to the input sequence. In this case, only sequences with $\leq 50\%$ homology were chosen. As exemplified herein, cloning and recombinantly expressing homologues with as little as 35% amino acid conservation (relative to *tfdA* from *Ralstonia eutropha*) can be used to impart commercial levels of resistance not only to the intended herbicide, but also to substrates never previously tested with these enzymes.

A single gene (*sdpA*) was identified from the NCBI database (*see* the ncbi.nlm.nih.gov website; accession #AJ628860) as a homologue with only 35% amino acid identity to *tfdA*. Percent identity was determined by first translating both the *sdpA* and *tfdA* DNA sequences deposited in the database to proteins, then using ClustalW in the VectorNTI software package to perform the multiple sequence alignment.

59

Example 2 – Optimization of Sequence for Expression in Plants and Bacteria

2.1 – Background:

To obtain higher levels of expression of heterologous genes in plants, it may be preferred to re-engineer the protein encoding sequence of the genes so that they are more efficiently expressed in plant cells. Maize is one such plant where it may be preferred to re-design the heterologous protein coding region prior to transformation to increase the expression level of the gene and the level of encoded protein in the plant. Therefore, an additional step in the design of genes encoding a bacterial protein is re-engineering of a heterologous gene for optimal expression.

One reason for the re-engineering of a bacterial gene for expression in maize is due to the non-optimal G+C content of the native gene. For example, the very low G+C content of many native bacterial gene(s) (and consequent skewing towards high A+T content) results in the generation of sequences mimicking or duplicating plant gene control sequences that are known to be highly A+T rich. The presence of some A+T-rich sequences within the DNA of gene(s) introduced into plants (e.g., TATA box regions normally found in gene promoters) may result in aberrant transcription of the gene(s). On the other hand, the presence of other regulatory sequences residing in the transcribed mRNA (e.g., polyadenylation signal sequences such as AAUAAA, or sequences complementary to small nuclear RNAs involved in pre-mRNA splicing) may lead to RNA instability. Therefore, one goal in the design of genes encoding a bacterial protein for maize expression, more preferably referred to as plant optimized gene(s), is to generate a DNA sequence having a G+C content preferably close to that of maize genes coding for metabolic enzymes. Another goal in the design of the plant optimized gene(s) encoding a bacterial protein is to generate a DNA sequence in which the sequence modifications do not hinder translation.

Table Ex2-1 presents the G+C content of maize genes. For the data in **Table Ex2-1**, coding regions of the genes were extracted from GenBank (Release 71) entries, and base compositions were calculated using the MacVector™ program (Accelrys, San Diego, California). Intron sequences were ignored in the calculations.

Table Ex2-1: Compilation of G + C contents of protein coding regions of maize genes		
Protein Class ^a	Range % G + C	Mean % G + C ^b
Metabolic Enzymes (76)	44.4-75.3	59.0 (±8.0)
Structural Proteins (18)	48.6-70.5	63.6 (±6.7)
Regulatory Proteins (5)	57.2-68.8	62.0 (±4.9)
Uncharacterized Proteins (9)	41.5-70.3	64.3 (±7.2)
All Proteins (108)	44.4-75.3	60.8 (±5.2) ^c

^a Number of genes in class given in parentheses.

^b Standard deviations given in parentheses.

^c Combined groups mean ignored in mean calculation

Multiple publicly available DNA sequence databases exist wherein one may find information about the G+C contents of plant genomes or the protein coding regions of various plant genes. One such database is located on the World Wide Web at the URL <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. At this site, one may find that the average G+C content of, for example, tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein coding sequences is 43.3% (analysis of 1268 sequences comprising 453,797 codons). One may also find that the average G+C content of maize (*Zea mays*) protein coding sequences is 54.9% (analysis of 2280 sequences comprising 973,578 codons). In comparison, the G+C content of the *Sphingobium herbicidovorans* AAD-13 protein coding sequence disclosed in SEQ ID NO:2 is 67.2%. Thus, it may be advantageous when designing an *AAD-13* gene for expression in maize or dicots to lower the G+C content of the protein coding region to a range of 40-55%. Therefore, one goal in the design of genes encoding a bacterial protein for plant expression, more preferably referred to as plant optimized gene(s), is to generate a DNA sequence having a G+C content preferably close to that of native host plant genes coding for metabolic enzymes.

Due to the plasticity afforded by the redundancy/degeneracy of the genetic code (*i.e.*, some amino acids are specified by more than one codon), evolution of the genomes in different organisms or classes of organisms has resulted in differential usage of redundant codons. This “codon bias” is reflected in the mean base composition of protein coding regions. For example, organisms with relatively low G+C contents utilize codons having A or T in the third position of redundant codons, whereas those having higher G+C contents utilize codons having G or C in the third position. It is thought that the presence of “minor” codons within an mRNA may reduce the absolute translation rate of that mRNA, especially when the relative abundance of the charged tRNA corresponding to the minor codon is low. An

extension of this is that the diminution of translation rate by individual minor codons would be at least an additive for multiple minor codons. Therefore, mRNAs having high relative contents of minor codons would have correspondingly low translation rates. This rate would be reflected by subsequent low levels of the encoded protein.

5 In engineering genes encoding a bacterial protein for expression in maize (or other plants, such as cotton or soybean), it is helpful if the codon bias of the prospective host plant(s) has been determined. The codon bias can be calculated as the frequency at which a single codon is used relative to the codons for all amino acids. Alternatively, as disclosed in **Table Ex2-2**, Columns C, D, I and J, the codon bias may be calculated as the frequency at
10 which a single codon is used to encode a particular amino acid, relative to all the other codons for that amino acid (synonymous codons). The codon bias for maize is the statistical codon distribution that the plant uses for coding its proteins, and the codon usage calculated from 706 maize genes is shown in **Table Ex2-2**, Columns C and I. In designing coding regions for genes encoding bacterial proteins destined for plant expression, the primary ("first choice") codons preferred by the plant should be determined, as well as the second, third,
15 fourth *etc.* choices of preferred codons when multiple choices exist. A new DNA sequence can then be designed which encodes the amino sequence of the bacterial protein, but the new DNA sequence differs from the native bacterial DNA sequence (encoding the protein) by the substitution of plant (first preferred, second preferred, third preferred, or fourth preferred,
20 *etc.*) codons to specify the amino acid at each position within the protein amino acid sequence. The new sequence is then analyzed for restriction enzyme sites that might have been created by the modifications. The identified sites are further modified by replacing the codons with first, second, third, or fourth choice preferred codons. Other sites in the sequence which could affect transcription or translation of the gene of interest are the exon:intron
25 junctions (5' or 3'), poly A addition signals, or RNA polymerase termination signals. The sequence is further analyzed and modified to reduce the frequency of TA or CG doublets. In addition to the doublets, G or C sequence blocks that have more than about six residues that are the same can affect transcription or translation of the sequence. Therefore, these blocks are advantageously modified by replacing the codons of first or second choice, *etc.* with the
30 next preferred codon of choice.

Thus, in order to design plant optimized genes encoding a bacterial protein, a DNA sequence is designed to encode the amino acid sequence of said protein utilizing a redundant

genetic code established from a codon bias table compiled from the gene sequences for the particular plant or plants. The resulting DNA sequence has a higher degree of codon diversity, a desirable base composition, can contain strategically placed restriction enzyme recognition sites, and lacks sequences that might interfere with transcription of the gene, or translation of the product mRNA. Such synthetic genes that are functionally equivalent to the genes/proteins of the subject invention can be used to transform hosts, including plants. Additional guidance regarding the production of synthetic genes can be found in, for example, U.S. Patent No. 5,380,831 and PCT application WO 97/13402.

To engineer a plant-optimized gene encoding an AAD-13 protein, a DNA sequence was designed to encode the *AAD-13* amino acid sequence, utilizing a redundant genetic code established from codon bias tables compiled from the protein coding sequences for the particular host plants (maize and dicots). In **Table Ex2-2**, Columns C, D, I, and J present the distributions (in % of usage for all codons for that amino acid) of synonymous codons for each amino acid, as found in 706 coding regions of *Zea mays* (maize) and 154 dicot genes [REF: Murray, E. E., Lotzer, J., Eberle, M. (1989) Codon usage in plant genes. Nucl. Acids Res. 17:477-497]. The codons most preferred by each plant type are indicated in bold font, and the second, third, or fourth choices of codons can be identified when multiple choices exist. It is evident that some synonymous codons for some amino acids are found only rarely in plant genes (e.g. AGT in maize and CCG in dicots). Also, maize and dicot plants differ in individual codon usage (e.g. Alanine codon GCG occurs more frequently in maize genes than in dicot genes, while Arginine codon AGA is more often used in dicot genes than in maize genes). Thus, it is obvious that a protein coding region designed to reflect the optimal codon composition of genes of one plant species may have a suboptimal codon composition for expression in another plant species. In the design process of creating a protein-encoding DNA sequence that approximates an average codon distribution of both maize and dicot genes, any codon that is used infrequently relative to the other synonymous codons for that amino acid in either type of plant was excluded (indicated by DNU in Columns F and L of **Table Ex2-2**). Usually, a codon was considered to be rarely used if it is represented at about 10% or less of the time to encode the relevant amino acid in genes of either plant type (indicated by NA in Columns E and K of **Table Ex2-2**). To balance the distribution of the remaining codon choices for an amino acid, a Weighted Average representation for each codon was calculated, using the formula:

Weighted Average % of C1 = 1/(%C1 + %C2 + %C3 + etc.) x %C1 x 100 where C1 is the codon in question and %C2, %C3, etc. represent the % average values for maize and dicots of remaining synonymous codons (% average values for the relevant codons are taken from Columns E and K) of Table Ex2-2.

The Weighted Average % value for each codon is given in Columns F and L of Table Ex2-2.

Table Ex2-2. . Synonymous codon representation in coding regions of 706 *Zea mays* (maize) genes (Columns C and I), and 154 dicot genes (Columns D and J). Values for a balanced-biased codon representation set for a plant-optimized synthetic gene design are in Columns F and L.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Amino Acid	Codon	Maize %	Dicot %	Maize-Dicot Average	Weighted Average	Amino Acid	Codon	Maize %	Dicot %	Maize-Dicot Average	Weighted Average
ALA (A)	GCA	18	25	21.7	25.5	LEU (L)	CTA	8	8	NA	DNU
	GCC	34	27	30.3	35.6		CTC	26	19	22.5	34.3
	GCG	24	6	NA	DNU		CTG	29	9	NA	DNU
	GCT	24	42	33.2	39.0		CTT	17	28	22.5	34.3
ARG (R)	AGA	15	30	22.4	27.4		TTA	5	10	NA	DNU
	AGG	26	25	25.7	31.5		TTG	15	26	20.6	31.4
	CGA	9	8	NA	DNU	LYS (K)	AAA	22	39	30.6	30.6
	CGC	24	11	17.7	21.7		AAG	78	61	69.4	69.4
	CGG	15	4	NA	DNU	MET (M)	ATG	100	100	100	100
	CGT	11	21	15.8	19.4	PHE (F)	TTC	71	55	63.2	63.2
ASN (N)	AAC	68	55	61.4	61.4		TTT	29	45	36.8	36.8
	AAT	32	45	38.6	38.6	PRO (P)	CCA	26	42	33.8	41.4
ASP (D)	GAC	63	42	52.6	52.6		CCC	24	17	20.7	25.3
	GAT	37	58	47.4	47.4		CCG	28	9	NA	DNU
CYS (C)	TGC	68	56	61.8	61.8		CCT	22	32	27.2	33.3
	TGT	32	44	38.2	38.2	SER (S)	AGC	23	18	20.4	26.0
END	TAA	20	48	33.8			AGT	9	14	NA	DNU
	TAG	21	19	20.1			TCA	16	19	17.5	22.4
	TGA	59	33	46.1			TCC	23	18	20.6	26.3
							TCG	14	6	NA	DNU
GLN (Q)	CAA	38	59	48.4	48.4		TCT	15	25	19.9	25.4
	CAG	62	41	51.6	51.6	THR (T)	ACA	21	27	23.8	28.0
GLU (E)	GAA	29	49	38.8	38.8		ACC	37	30	33.6	39.5
	GAG	71	51	61.2	61.2		ACG	22	8	NA	DNU
GLY (G)	GGA	19	38	28.5	28.5		ACT	20	35	27.7	32.5
	GGC	42	16	29.1	29.0	TRP (W)	TGG	100	100	100	100
	GGG	20	12	16.1	16.0						

64

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Amino Acid	Codon	Maize %	Dicot %	Maize-Dicot Average	Weighted Average	Amino Acid	Codon	Maize %	Dicot %	Maize-Dicot Average	Weighted Average
HIS (H)	GGT	20	33	26.7	26.6	TYR (Y)	TAC	73	57	65.0	65.0
	CAC	62	46	54.1	54.1		TAT	27	43	35.0	35.0
	CAT	38	54	45.9	45.9	VAL (V)	GTA	8	12	NA	DNU
ILE (I)	ATA	14	18	15.9	15.9		GTC	32	20	25.8	28.7
	ATC	58	37	47.6	47.9		GTG	39	29	34.1	38.0
	ATT	28	45	36.4	36.4		GTT	21	39	29.9	33.3

A new DNA sequence which encodes essentially the amino acid sequence of the *Sphingobium herbicidovorans* AAD-13 protein of SEQ ID NO:2 was designed for optimal expression in both maize and dicot cells using a balanced codon distribution of frequently used codons found in maize and dicot genes.

2.2 – AAD-13 Plant rebuild analysis.

Extensive analysis of the 861 base pairs (bp) of the coding region of the native DNA sequence of AAD-13 (SEQ ID NO:1) revealed the presence of several sequence motifs that are thought to be detrimental to optimal plant expression, as well as a non-optimal codon composition. The protein encoded by SEQ ID NO:1 (AAD-13) is presented as SEQ ID NO:2. To improve production of the recombinant protein in maize as well as dicots, a “plant-optimized” DNA sequence (AAD-13 v1) (SEQ ID NO:3) was developed that encodes a protein (SEQ ID NO:4) which is the same as the native protein disclosed in SEQ ID NO:2 except for the addition of an alanine residue at the second position (underlined in SEQ ID NO:4). The additional alanine codon (GCT; underlined in SEQ ID NO:3) encodes part of an Neo I restriction enzyme recognition site (CCATGG) spanning the ATG translational start codon. Thus, it serves the dual purpose of facilitating subsequent cloning operations while improving the sequence context surrounding the ATG start codon to optimize translation initiation. The proteins encoded by the native and plant-optimized (v1) coding regions are 99.3% identical, differing only at amino acid number 2. In contrast, the native and plant-optimized (v1) DNA sequences of the coding regions are only 77.3% identical. Table Ex2-3 shows the differences in codon compositions of the native (Columns A and D) and plant-optimized sequences (Columns B and E), and allows comparison to a theoretical plant-

optimized sequence (Columns C and F) that would have precisely the codon composition dictated by columns F and L of Table Ex2-2.

Table Ex2-3. Codon composition comparisons of coding regions of Native *AAD-13*, Plant-Optimized version (v1) and a Theoretical Plant-Optimized version.

		A					D		
		B					E		
		C					F		
Amino Acid	Codon	Native	Plant Opt v1 #	Theor. Plant Opt. #	Amino Acid	Codon	Native	Plant Opt v1 #	Theor. Plant Opt. #
ALA (A)	GCA	1	10	9	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	24	11	13		CTC	11	11	10
	GCG	10	0	0		CTG	17	0	0
	GCT	1	16	14		CTT	0	10	10
ARG (R)	AGA	0	4	4		TTA	0	0	0
	AGG	0	5	5		TTG	2	9	9
	CGA	1	0	0	LYS (K)	AAA	0	3	3
	CGC	10	4	3		AAG	10	7	7
	CGG	4	0	0	MET (M)	ATG	9	9	9
	CGT	1	3	3		PHE (F)	TTC	8	6
ASN (N)	AAC	3	2	2	PHE (F)	TTT	1	3	3
	AAT	1	2	2	PRO (P)	CCA	2	7	7
ASP (D)	GAC	19	13	13		CCC	5	5	5
	GAT	5	11	11		CCG	10	0	0
CYS (C)	TGC	2	1	1		CCT	1	6	6
	TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	9	4	4
END	TAA	0	0			AGT	1	0	0
	TAG	0	0			TCA	1	3	3
	TGA	1	1	1		TCC	1	4	4
GLN (Q)	CAA	0	7	7		TCG	3	0	0
	CAG	14	7	7		TCT	0	4	4
GLU (E)	GAA	3	5	5	THR (T)	ACA	0	3	3
	GAG	11	9	9		ACC	7	4	4
GLY (G)	GGA	1	6	6		ACG	4	0	0
	GGC	16	6	6		ACT	0	4	4
	GGG	3	3	3	TRP (W)	TGG	7	7	7
	GGT	1	6	6		TYR (Y)	TAC	5	4
HIS (H)	CAC	7	7	8	TYR (Y)	TAT	2	3	2
	CAT	7	7	6	VAL (V)	GTA	0	0	0
ILE (I)	ATA	0	2	2		GTC	6	4	4
	ATC	10	5	5		GTG	7	6	6
	ATT	1	4	4		GTT	2	5	5
Totals		157	158	158	Totals		131	131	131

It is clear from examination of Table Ex2-3 that the native and plant-optimized coding regions, while encoding nearly identical proteins, are substantially different from one another. The Plant-Optimized version (v1) closely mimics the codon composition of a theoretical plant-optimized coding region encoding the *AAD-13* protein.

2.3 Rebuild for *E. coli* Expression

Specially engineered strains of *Escherichia coli* and associated vector systems are often used to produce relatively large amounts of proteins for biochemical and analytical studies. It is sometimes found that a native gene encoding the desired protein is not well suited for high level expression in *E. coli*, even though the source organism for the gene may be another bacterial organism. In such cases it is possible and desirable to re-engineer the protein coding region of the gene to render it more suitable for expression in *E. coli*. *E. coli* Class II genes are defined as those that are highly and continuously expressed during the exponential growth phase of *E. coli* cells. [REF: Henaut, A. and Danchin, A. (1996) in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology*, vol. 2, pp. 2047–2066. Neidhardt, F., Curtiss III, R., Ingraham, J., Lin, E., Low, B., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H. (eds.) American Society for Microbiology, Washington, DC]. Through examination of the codon compositions of the coding regions of *E. coli* Class II genes, one can devise an average codon composition for these *E. coli* Class II gene coding regions. It is thought that a protein coding region having an average codon composition mimicking that of the Class II genes will be favored for expression during the exponential growth phase of *E. coli*. Using these guidelines, a new DNA sequence that encodes the *AAD-13* protein (SEQ ID NO:4; including the additional alanine at the second position, as mentioned above), was designed according to the average codon composition of *E. coli* Class II gene coding regions. The initial sequence, whose design was based only on codon composition, was further engineered to include certain restriction enzyme recognition sequences suitable for cloning into *E. coli* expression vectors. Detrimental sequence features such as highly stable stemloop structures were avoided, as were intragenic sequences homologous to the 3' end of the 16S ribosomal RNA (*i.e.* Shine Dalgarno sequences) The *E. coli*-optimized sequence (v2) is disclosed as SEQ ID NO:5 and encodes the protein disclosed in SEQ ID NO:4.

The native and *E. coli*-optimized (v2) DNA sequences are 80.2% identical, while the plant-optimized (v1) and *E. coli*-optimized (v2) DNA sequences are 84.4% identical. Table Ex2-4 presents the codon compositions of the native *AAD-13* coding region; Columns A and D), the *AAD-13* coding region optimized for expression in *E. coli* (v2; Columns B and E) and the codon composition of a theoretical coding region for the *AAD-13* protein having an optimal codon composition of *E. coli* Class II genes (Columns C and F).

Table Ex2-4. Codon composition comparisons of coding regions of Native AAD-13, E. coli-Optimized version (v2) and a Theoretical E. coli Class II-Optimized version.

		A	B	C			D	E	F
Amino Acid	Codon	Native	<i>E. coli</i> Opt v2 #	Theor. Class II #	Amino Acid	Codon	Native	<i>E. coli</i> Opt v2 #	Theor, Class II #
ALA (A)	GCA	1	11	11	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	24	0	0		CTC	11	0	0
	GCG	10	14	14		CTG	17	30	30
	GCT	1	12	12		CTT	0	0	0
ARG (R)	AGA	0	0	0		TTA	0	0	0
	AGG	0	0	0		TTG	2	0	0
	CGA	1	0	0	LYS (K)	AAA	0	8	8
	CGC	10	7	5		AAG	10	2	2
	CGG	4	0	0	MET (M)	ATG	9	9	9
	CGT	1	9	11	PHE (F)	TTC	8	6	6
ASN (N)	AAC	3	4	4		TTT	1	3	3
	AAT	1	0	0	PRO (P)	CCA	2	3	3
ASP (D)	GAC	19	13	13		CCC	5	0	0
	GAT	5	11	11		CCG	10	15	15
CYS (C)	TGC	2	1	1		CCT	1	0	0
	TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	9	4	4
END	TAA	0	1	1		AGT	1	0	0
	TAG	0	0	0		TCA	1	0	0
	TGA	1	0	0		TCC	1	5	5
	GLN (Q)	CAA	0	3		3	TCG	3	0
CAG		14	11	11		TCT	0	6	6
GLU (E)	GAA	3	10	11	THR (T)	ACA	0	0	0
	GAG	11	4	3		ACC	7	7	7
GLY (G)	GGA	1	0	0		ACG	4	0	0
	GGC	16	10	10		ACT	0	4	4
	GGG	3	0	0	TRP (W)	TGG	7	7	7
	GGT	1	11	11		TYR (Y)	TAC	5	5
HIS (H)	CAC	7	10	10	TAT	2	2	2	
	CAT	7	4	4	VAL (V)	GTA	0	3	3
ILE (I)	ATA	0	0	0		GTC	6	0	0
	ATC	10	7	7		GTG	7	5	5
	ATT	1	4	4		GTT	2	7	7
	Totals	157	158	158		Totals	131	131	131

5 It is clear from examination of Table Ex2-4 that the native and E. coli-optimized coding regions, while encoding nearly identical proteins, are substantially different from one another. The E. coli-Optimized version (v2) closely mimics the codon composition of a theoretical E. coli-optimized coding region encoding the AAD-13 protein.

Example 3 – Cloning of expression and transformation vectors

3.1 Construction of E.coli, pET expression vector.

Using the restriction enzymes corresponding to the sites added with the additional cloning linkers (Xba 1, Xho 1) *AAD-13* (v2) was cut out of the picoscript vector, and ligated into a pET280 streptomycin/spectinomycin resistant vector. Ligated products were then transformed into TOP10F' *E. coli*, and plated on to Luria Broth + 50 µg/ml Streptomycin & Spectinomycin (LB S/S) agar plates.

To differentiate between *AAD-13* (v2) : pET280 and pCR2.1 : pET280 ligations, approximately 20 isolated colonies were picked into 6 ml of LB-S/S, and grown at 37 °C for 4 hours with agitation. Each culture was then spotted onto LB + Kanamycin 50 µg/ml plates, which were incubated at 37 °C overnight. Colonies that grew on the LB-K were assumed to have the pCR2.1 vector ligated in, and were discarded. Plasmids were isolated from the remaining cultures as before, and checked for correctness with digestion by Fsp1. The final expression construct was given the designation pDAB4115.

3.3 – Completion of binary vectors.

The plant optimized gene *AAD-13* (v1) was received from Picoscript (the gene rebuild design was completed (see above) and out-sourced to Picoscript for construction) The *AAD-13* (v1) gene was cloned into pDAB4055 as an Nco I – Sac I fragment. The resulting construct was designated pDAB4113, containing: [AtUbi10 promoter: *AAD-13* (v1): AtuORF1 3'UTR] (verified with Nco I and Sac I restriction digests). A Not I-Not I fragment containing the described cassette was then cloned into the Not I site of the binary vector pDAB3038. The resulting binary vector, pDAB4114, containing the following cassette [AtUbi10 promoter: *AAD-13* (v1): AtuORF1 3'UTR: CsVMV promoter: *PAT*: ORF25/26 3'UTR] was restriction digested (with SacI) for verification of the correct orientation. The verified completed construct (pDAB4114) was used for transformation into *Agrobacterium* (see Example 6).

Example 4 – Recombinant AAD-13 Expression and Purification in *Pseudomonas fluorescens*

4.1- *Pseudomonas fluorescens* fermentation

For shake flask experiment, 200 µl of the *Pseudomonas fluorescens* strain glycerol stock carrying the *AAD-13* (v1) construct (sec 3.2) will be used to inoculate 50 ml fresh LB

media supplemented with 30 µg/ml tetracycline/HCl. The culture (in a 250 ml baffled Erlenmeyer flask) will be incubated on a shaker (New Brunswick Scientific Model Innova 44) at 300 rpm and 30 °C for 16 hrs. 20 ml of seed culture will be transferred into 1 L *Pseudomonas fluorescens* culture media (Yeast extract, 5 g/L; K₂HPO₄, 5 g/L; (NH₄)₂PO₄, 7.5 g/L; (NH₄)₂SO₄, 1 g/L; MgSO₄·7H₂O, 1 g/L; KCl, 0.5 g/L; CaCl₂·2H₂O, 0.5 g/L; NaCitrate·2H₂O, 15 g/L; Glycerol, 95 g/L; Trace element solution, 10 ml/L; Trace element solution: FeCl₃·6H₂O, 5.4 g/L; MnCl₂·4H₂O, 1 g/L; ZnSO₄·7H₂O, 1.45 g/L; CuSO₄·5H₂O, 0.25 g/L; H₃BO₃, 0.1 g/L; (NH₄)₆MO₇O₂₄, 0.1 g/L; concentrated HCl, 13 ml/L) supplemented with 20 µg/ml tetracycline/HCl and 250 µl of Pluronic L61(anti-foam) in a 2.8 L baffled Erlenmeyer flask. The cultures are to be incubated at 30 °C and 300 rpm for 24 hrs. Isopropyl β-D-1-thiogalacto-pyranoside (IPTG) will be added to 1 mM final in the cultures and continued to incubate for approximately 48 hrs at 25 °C. Cells are harvested by centrifugation at 7 krpm at 4 °C for 15 min, and cell paste is stored at -80 °C or immediately processed for purification.

For tank experiments, 1 ml each of the glycerol stock will be inoculated a 1 L baffled flask containing 200 ml of LB media supplemented with 30 µg/ml tetracycline/HCl at 300 rpm and 32 °C for 16-24 hrs. The combined culture from three flasks (600 ml) is then aseptically transferred to a 20 L fermentor (B. Braun Bioreactor Systems) containing 10 L of Dow proprietary defined medium (through Teknova, Hollister, CA) designed to support high cell density growth. Growth temperature is maintained at 32 °C and the pH is controlled at the desired set-point through the addition of aqueous ammonia. Dissolved oxygen will be maintained at a positive level in the liquid culture by regulating the sparged air flow and the agitation rates. The fed-batch fermentation process is carried out for approximately 24 hrs till cell density reaches 170-200 OD₅₇₅. IPTG is then added to 1 mM to induce the recombinant protein expression and the temperature is reduced and maintained at 25 °C using circulation of cold-water supply. The induction phase of the fermentation will be allowed to continue for another 24 hrs. Samples (30 ml) are collected for various analyses to determine cell density and protein expression level at 6, 12, and 18 hrs post-induction time points. At the end of a fermentation run, cells are harvested by centrifugation at 10 krpm for 30 min. The cell pellets are then frozen at -80 °C for further processing.

4.2- Purification of AAD-13 for Biochemical Characterization and Antibody Production

Approximately 100-200 g of frozen (or fresh) *Pseudomonas* cells are thawed and resuspended in 1-2 L of extraction buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.5, and 25 ml of Protease inhibitor cocktail (Sigma cat# P8465). The cells are disrupted using Microfluidizer (model M110L or 110Y) (Microfluidics, Newton, MA) on ice with one pass at 11,000-12,000 psi. The lysate is centrifuged at 24,000 rpm for 20 min. The supernatant will be transferred and dialyzed against 10 volumes of 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 overnight at 4 °C, or diafiltrated with this buffer and filtered through a 0.45 µm membrane before applying to the column separations. All subsequent protein separations will be performed using Pharmacia AKTA Explorer 100 and operated at 4 °C. Prior to loading, a Q Sepharose Fast Flow column (Pharmacia XK 50/00, 500 ml bed size) is equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 buffer. The sample is applied to the column at 15 ml/min and then washed with this buffer until the eluate OD₂₈₀ returned to baseline. Proteins are eluted with 2 L of linear gradient from 0 to 0.3 M NaCl at a flow rate of 15 ml/min, while 45 ml fractions are collected. Fractions containing AAD-13 activity as determined by the colorimetric enzyme assay and also corresponding to the predicted molecular weight of AAD-13 protein (about 32 kDa band on SDS-PAGE) are to be pooled. Solid ammonium sulfate to final 0.5 M is added to the sample, and then applied to a Phenyl HP column (Pharmacia XK 50/20, 250 ml bed size) equilibrated in 0.5 M ammonium sulfate in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. This column is washed with the binding buffer at 10 ml/min until the OD₂₈₀ of the eluate returned to baseline, proteins are eluted within 2 column volumes at 10 ml/min by a linear gradient from 0.5 M to 0 Ammonium sulfate in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 12.5 ml fractions are collected. The main peak fractions containing AAD-13 will be pooled, and if necessary, concentrated using a MWCO 10 kDa cut-off membrane centrifugal filter device (Millipore). In some cases the sample is further applied to a Superdex 75 gel filtration column (Pharmacia XK 16/60, 110 ml bed size) with PBS buffer at a flow rate of 1 ml/min. Peak fractions containing pure AAD-13 are pooled and stored at -80 °C for future use.

Example 5 – *In vitro* assays of AAD-13 activity

5.1 – Assay via colorimetric phenol detection.

Enzyme activity will be measured by colorimetric detection of the product phenol using a protocol modified from that of Fukumori and Hausinger (1993) (*J. Biol. Chem.* 268: 24311-24317) to enable deployment in a 96-well microplate format. The colorimetric assay has been described for use in measuring the activity of dioxygenases cleaving 2,4-D and dichlorprop to release the product 2,4-dichlorophenol. The color yield from several phenols was compared to that of 2,4-dichlorophenol using the detection method previously described to ascertain which phenol products could be readily detected. Phenols and phenol analogs were tested at a final concentration of 100 μM in 0.15 ml 20 mM MOPS pH 6.75 containing 200 μM $\text{NH}_4(\text{FeSO}_4)_2$, 200 μM sodium ascorbate. Pyridinols derived from fluroxypyr and triclopyr produced no significant color. The color yield of 2,4-dichlorophenol was linear and proportional to the concentration of phenol in the assay up to $\sim 500 \mu\text{M}$. A calibration curve performed under standard assay conditions (160 μl final assay volume) indicated that an absorbance at 510 nm of 0.1 was obtained from 17.2 μM phenol.

Enzyme assays are performed in a total volume of 0.16 ml 20 mM MOPS pH 6.75 containing 200 μM NH_4FeSO_4 , 200 μM sodium ascorbate, 1 mM α -ketoglutarate, the appropriate substrate (added from a 100 mM stock made up in DMSO), and enzyme. Assays are initiated by addition of the aryloxyalkanoate substrate, enzyme or α -ketoglutarate at time zero. After 5 minutes of incubation at 25° C, the reaction is terminated by addition of 30 μl of a 1:1:1 mix of 50 mM Na EDTA; pH 10 buffer (3.09 g boric acid + 3.73 g KCl + 44 ml 1 N KOH) and 0.2 % 4-aminoantipyrine. Then 10 μl 0.8 % potassium ferricyanide is added and after 5 or 10 min, the absorbance at 510 nm was recorded in a spectrophotometric microplate reader. Blanks contained all reagents except for enzyme to account for the occasional slight contamination of some of the substrates by small amounts of phenols.

5.2 – Assay via detection of chloropyridinol

AAD-13 action on potential substrates such as the herbicide triclopyr containing a substituted pyridine (rather than benzene rings) will release a pyridinol on cleavage of the aryloxyalkanoate bond. Pyridinols were not detected using the aminoantipyrine/ferricyanide phenol detection described in the preceding section. However, it was found that product chloropyridinols absorb strongly in the near UV with λ_{max} of 325 nm at pH 7 (extinction coefficient $\sim 8,400 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). This was used to create a continuous microplate-based

spectrophotometric assay. Assays are performed in a total volume of 0.2 ml 20 mM MOPS pH 6.75 containing 200 μ M NH_4FeSO_4 , 200 μ M sodium ascorbate, 1 mM α -ketoglutarate, the appropriate substrate (added from a 100 mM stock made up in DMSO), and enzyme. Assays are initiated by addition of the aryloxyalkanoate substrate, enzyme or α -ketoglutarate at time zero and the increase in absorbance followed for 10 minutes at 325 nm in a microplate reader. The first 2 minutes of the reaction will be used to determine initial rates.

5.3 – Colorimetric assay using 2-(2-chloro,4-nitrophenoxy)propionate

A convenient assay of AAD-13 was devised using 2-(2-chloro,4-nitrophenoxy)propionate (CNPP) as substrate. Cleavage of CNPP by AAD-13 will release 2-chloro,4-nitrophenol. This phenol has a bright yellow absorbance at 410 nm at pH 7 enabling the reaction to be followed continuously or by endpoint analysis. The presence of AAD-13 activity can be monitored visually without the need for addition of further reagents. Microplate-based spectrophotometric assays were performed in a total volume of 0.2 ml 20 mM MOPS pH 6.75 containing 200 μ M NH_4FeSO_4 , 200 μ M sodium ascorbate, 1 mM α -ketoglutarate, the appropriate amount of CNPP (added from a 10 mM stock made up in DMSO), and enzyme. Assays are initiated by addition of CNPP, enzyme, or α -ketoglutarate at time zero and the increase in absorbance followed for 10 min at 410 nm in a microplate reader. The first 2 min of the reaction will be used to determine initial rates. A calibration curve performed under standard assay conditions (200 μ l final assay volume) indicated that an absorbance at 410 nm of 0.1 was obtained from 25.1 μ M 2-chloro, 4-nitrophenol. Using this assay, the kinetic constants for CNPP as a substrate were determined to be $K_m = 31 \pm 5.5$ μ M and $k_{cat} = 16.2 \pm 0.79$ min^{-1} .

5.4 – Coupled Assay

In order to test a broad range of substrates, the production of succinate from the breakdown of α -ketoglutarate was detected spectrophotometrically using a protocol based on the method of Luo et. al. (2006) (*Anal. Biochem.* 353: 69-74). As depicted in Figure 3, the concomitant breakdown of α -ketoglutarate and the substrate of interest via AAD-13, results in the production of succinate. Succinate is further modified to succinyl-CoA by succinyl-CoA synthetase which consumes ATP and produces ADP. ADP is then consumed by the commonly employed pyruvate kinase/lactate dehydrogenase enzymatic coupling system (Sigma P0294). The resulting conversion of NADH to NAD is monitored spectrophotometrically at 340 nm.

5.4.1 – Cloning and expression of His-tagged succinyl-CoA synthetase and AAD-13 (v2)

The two *E. coli* genes that encode the synthetase, *sucC* and *sucD*, were amplified out of the Top10 strain of *E. coli* from Invitrogen as a single amplicon. Genomic DNA was obtained by boiling an aliquot of cells for 10 min, then centrifuging, and retaining the supernatant containing the DNA. As template for AAD-13 (v2), the previously created pET clone pDAB4115 was used. To amplify the *sucCD* genes, the following primers were used: *suc*-Nde (SEQ ID 9) 5' CATATGAACTTACATGAATATCAGGCAAAC 3' and *suc*-Xho (SEQ ID 10) 5' CTCGAGTTTCAGAACAGTTTTTCAGTGCTTC 3'. For AAD-13 (v2), the following primers were used: *aad*-13F (SEQ ID 11) 5' CATATGGCGAGCCCGGCG 3' and *aad*-13R (SEQ ID 12) 5' CTCGAGGTGTGCCAGTGCGGTCTC 3'. These add suitable restriction sites for downstream cloning and remove the stop codon to permit His-tagging. For the reaction, thermal cycler conditions were: 96 °C 2 min, then 35 cycles of: 96 °C 30 sec, 53 °C 30 sec, 72 °C 1.5 min, followed by a one final cycle of 72 °C 5 min. The resulting amplicons were sub-cloned to verify correct sequence. Clones for each containing the correct insert were digested with Nde1/Xho1 and the inserts were then cloned into the pET-26b(+) expression vector. For expression, a lawn of transformed BL-21 *E. coli* was scraped into 50 ml of LB + Kan (50 µg/ml) and grown at 37 °C for 2 hrs. Two milliliters of this culture were transferred into 100 ml of LB + Kan. These flasks were grown at 37 °C for 4 hrs. Cells were induced with 50 µM IPTG, and grown overnight at 25 °C. Cultures were centrifuged, and cell pellet used for protein purification.

5.4.2 - Purification of AAD-13 and His-tagged succinyl CoA synthetase for *in vitro* substrate identification

His-tagged AAD-13 was purified using metal affinity chromatography protocols based on the column manufacturer's directions. Cell pellets harvested from 1L of culture and stored at -80°C were thawed and resuspended in 20 mL of extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8; 200-300 µL protease inhibitor cocktail (Sigma P8849), 1mg/mL lysozyme, and 1 mM MgCl₂). Resuspended cells incubated at room temperature for 10-15 min prior to treating with DNase to reduce viscosity. All subsequent steps were carried out at 4 °C. The extract was centrifuged for 20 min at 20,000 x g to clarify. Using a flow rate of 1mL/min, the resulting supernatant was applied to 2 consecutive 1mL Co-MAC™ Cartridges (EMD/Novagen 71650) previously equilibrated with buffer A (25 mM Tris pH 8.0, 0.5 M

NaCl). After the extract was loaded, the column was washed with 5 mM imidazole in buffer A until the OD₂₈₀ returned to baseline. Protein was eluted with 50 mM imidazole in buffer A. Fractions containing predominantly AAD-13 as indicated by an approximately 30 kDa band on SDS-PAGE were exchanged into buffer C (20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 2mM DTT) using BG-10 desalting columns (Bio-Rad). AAD-13 in buffer C was then assayed spectrophotometrically according to the *in vitro* coupled assay.

His-tagged succinyl CoA synthetase was purified utilizing consecutive 1mL Co-MACTM Cartridges (EMD/Novagen 71650) and protocols based on the manufacturer's directions. Cell pellets that had been stored at -80°C were thawed and resuspended in 50 mL of extraction buffer (100 mM Tris pH 7.2, 200-300 µL protease inhibitor cocktail (Sigma P8849), 1mg/mL lysozyme, and 1 mM MgCl₂) per L of cell culture. Resuspended cells were incubated at room temperature for 10-15 min prior to treating with DNase to reduce viscosity. All subsequent steps were carried out at 4 °C unless noted otherwise. The extract was centrifuged for 20 min at 20,000 x g to clarify. At this point, supernatant can either be applied directly to Co-MACTM Cartridges pre-equilibrated with binding buffer (0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9 and 5mM imidazole) or brought to 80% ammonium sulfate. The ammonium sulfate treated sample was centrifuged for 20 min at 20,000 x g to pellet protein. Pellet was resuspended in buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0 and 0.5M NaCl) and residual ammonium sulfate was removed using BG-10 desalting columns (Bio-Rad) pre-equilibrated with buffer A. The resulting samples were applied to Co-MACTM Cartridges pre-equilibrated with binding buffer and a flow rate of 1mL/min. Following application of extracted protein, column was rinsed with 10 column volumes of 0.5% buffer B (20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, and 1 M imidazole). This was followed by a 5 column volume step gradient of 6% buffer B and an additional 10 column volume step gradient of 50% buffer B. The majority of the desired protein eluted with the 6% buffer B gradient. Fractions containing succinyl CoA synthetase were identified by the presence of two bands corresponding to the succinyl CoA synthetase subunits (~40 & 33 kDa) via SDS PAGE and the detection of corresponding *in vitro* activity. Succinyl CoA synthetase activity was confirmed using a modified version of the *in vitro* coupled assay below. Briefly, reaction progress was monitored spectrophotometrically at 340 nm in the presence of 100 mM tris pH 8.0, 1 mM PEP 0.4 mM NADH 10 mM MgCl₂, 0.2 mM CoA, 0.2 mM ATP, 3.5 U/mL PK, 5 U/mL LDH, and SCS. Reaction was initiated by the addition of 1 mM succinate.

JS

5.4.3- *In vitro* Coupled assay

Identification of AAD-13 (v2) substrates *in vitro* was based on enzymatic activity detected during continuous spectrophotometric monitoring of a 0.2 mL reaction volume in a 96 well microtiter plate. Reaction conditions were as follows: 100 mM MOPS pH 7.0, 0.4 mM NADH, 0.4 mM ATP, 0.4 mM CoA, 1mM PEP, 10mM MgCl₂, 0.1 mM FeSO₄ (solubilized in HCl), and 0.1 mM ascorbate, 1 mM α -ketoglutarate and sufficient AAD-13 (v2) to produce an observable rate in the presence of 2,4-D. Coupling enzymes (SCS/PK/LDH) were adjusted by batch to ensure adequate coupling, and potential substrates were generally assayed at 1mM. Alterations in substrate concentrations were made as needed to adjust for solubility. Reactions were initiated by either the addition of AAD-13 (v2) or potential substrate. The rate of substrate independent conversion of α -ketoglutarate to succinate by AAD was monitored under the above assay conditions and subtracted from the observed reaction rates. Reaction rates observed with propionate substrates were divided by two to adjust for the production of pyruvate resulting from the cleavage of these compounds via AAD. Additionally, propionate compounds were checked for pyruvate contamination by spectrophotometrically monitoring the consumption of NADH in the presense of compound and PK/LDH.

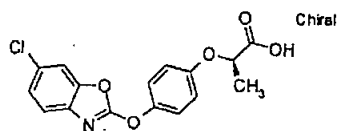
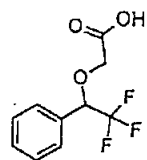
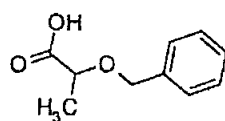
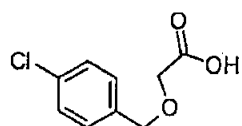
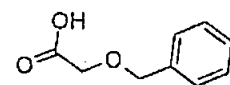
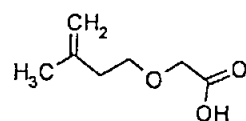
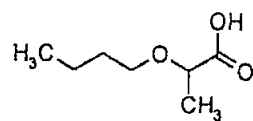
5.4.4 *In vitro* screening results

Table Ex5 displays the AAD-13 (v2) reaction rate observed with multiple chemistries via the *in vitro* coupled assay. Reaction rates are reported as a percentage of the 2,4-D reaction rate obtained in the same sample set. This data can be used to qualitatively segregate substrates from non-substrates, as well as identify trends in substrate efficiency. It should be noted that faster rates can be more difficult to accurately compare depending on the percentage of available substrate consumed. This is particularly true of propionate compounds which display twice the rate as non-propionate compounds for the equivalent number of enzyme turnovers. As a result, highly efficient substrates will be properly grouped when compared to low efficiency substrates. Within the grouping of highly efficient substrates however, compounds may not be quantitatively separated by a screen using single rates of substrate and AAD. Compounds denoted with an asterisk were tested at 0.5 mM instead of 1 mM due to absorbance interference at higher concentrations.

Table Ex5

Name	X#	substrate Y/N	% of 24D activity
	191716		
		y	66
	571320		
		y	39
	93116		
		y	128
	475726		
		y	112
	118942		
		y	46
	470901		
		y	30
	11044492		
R-fenoxaprop		N	2

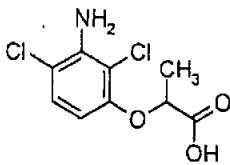
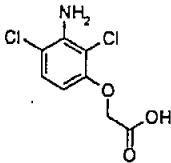
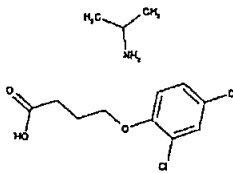
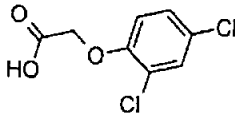
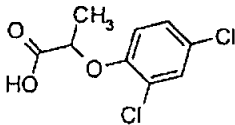
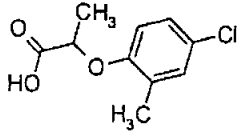
MOL.STRUCTURE



H

Name	X#	substrate Y/N	% of 24D activity
	188874		
Mecoprop		y	169
r dichlorprop			19
	117613		
r,s dichlorprop		Y	195
S-dichlorprop 2,4-D		y	233
	195517 178577	y	100
24DB		N	2
	11263526		
3-amino 24D		y	151
	11113675	y	113

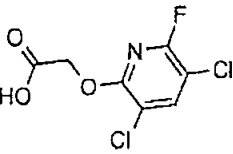
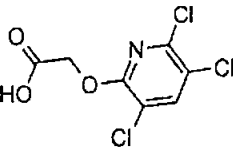
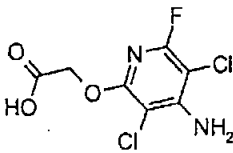
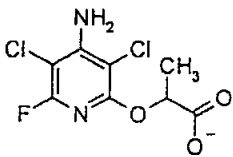
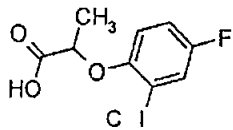
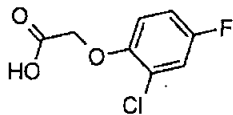
MOL.STRUCTURE



78

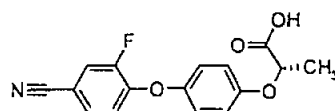
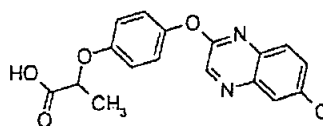
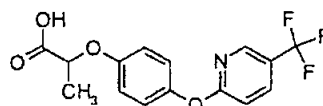
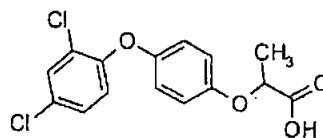
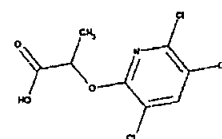
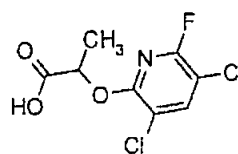
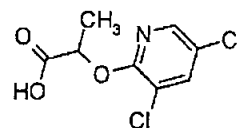
Name	X#	substrate Y/N	% of 24D activity
	124988		
		y	44
	83293		
		y	106
	11182286		
alpha methyl floroxypr		y	43
	68316		
fluoroxypyr		y	67
	156136		
triclopyr		N	6
	93833		
		y	33

MOL.STRUCTURE



Name	X#	substrate Y/N	% of 24D activity
	66357		
		y	24
	91767		
		y	88
	116844		
		y	25
diclofop	460511		
		y	>100
fluazifop	67131		
		y	~50
quizalofop	44936*		
		Y	
	7466		
cyhalofop		y	

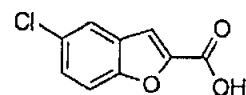
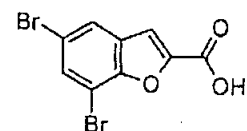
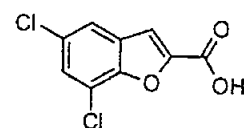
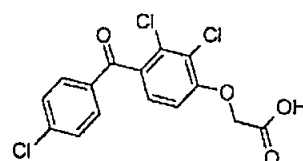
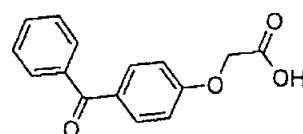
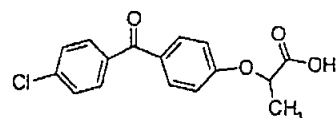
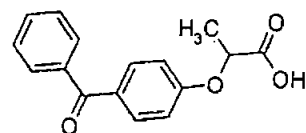
MOL.STRUCTURE



80

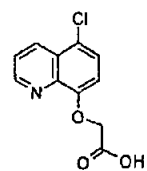
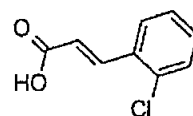
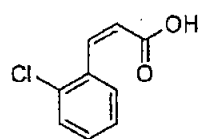
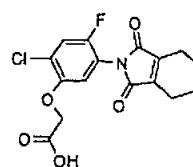
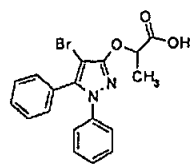
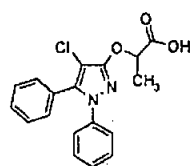
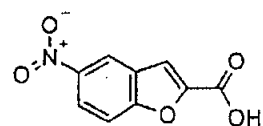
Name	X#	substrate Y/N	% of 24D activity
	66732	y	>100
	8563	y	64
	193908	y	56
	761310*		Not Detected
	11077344*		Not Detected
	198167		Not Detected
	11077347*		Not Detected

MOL.STRUCTURE



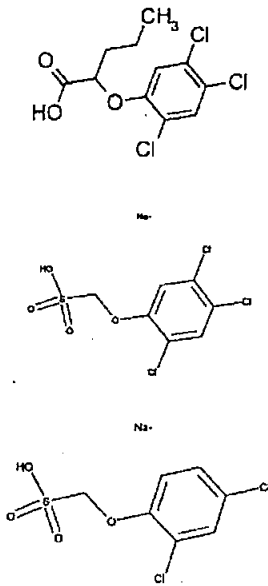
Name	X#	substrate Y/N	% of 24D activity
	238166*		Not Detected
	657338	N	5
	657339	N	5
	11213586	N	2
	11453845	N	13
	187507	N	10
	204558*		Not Detected

MOL.STRUCTURE



Name	X#	substrate Y/N	% of 24D activity
	188495		
		M	19
	187439		Not Detected
	1190305		Not Detected

MOL.STRUCTURE



AAD-13 is unlike other reported a-ketoglutarate-dependent dioxygenases who have 2,4-D-degrading activity. A key distinction is the broad array of aryloxy and alkyloxy-alkanoate substates, but a number of pyridyloxysubstitutes are effective herbicides and substrates (e.g., fluroxypyr) but other herbicides like triclopyr are considerably poorer substrates. This creates a new opportunity to use alternative herbicides for control of transgenic plants with AAD-13 substrates. It also provides opportunity to complement similar genes *in planta* to broaden tolerance or improve the breadth of substrates to which the plants are tolerant.

Example 6 – Transformation into *Arabidopsis* and Selection

6.1 – *Arabidopsis thaliana* growth conditions.

Wildtype *Arabidopsis* seed was suspended in a 0.1% Agarose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) solution. The suspended seed was stored at 4° C for 2 days to complete dormancy requirements and ensure synchronous seed germination (stratification).

Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) was covered with fine vermiculite and sub-irrigated with Hoagland’s solution until wet. The soil mix was allowed to drain for 24 hours. Stratified seed was sown onto the vermiculite and covered with humidity domes (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canada) for 7 days.

Seeds were germinated and plants were grown in a Conviron (models CMP4030 and CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canada) under long day conditions (16 hours light/8 hours dark) at a light intensity of 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ under constant temperature (22° C) and humidity (40-50%). Plants were initially watered with Hoagland's solution and subsequently with deionized water to keep the soil moist but not wet.

6.2 – *Agrobacterium* transformation.

An LB + agar plate with erythromycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (200mg/L) or spectinomycin (100 mg/L) containing a streaked DH5 α colony was used to provide a colony to inoculate 4 ml mini prep cultures (liquid LB + erythromycin). The cultures were incubated overnight at 37° C with constant agitation. Qiagen (Valencia, CA) Spin Mini Preps, performed per manufacturer's instructions, were used to purify the plasmid DNA.

Electro-competent *Agrobacterium tumefaciens* (strains Z707s, EHA101s, and LBA4404s) cells were prepared using a protocol from Weigel and Glazebrook (2002). The competent *Agrobacterium* cells were transformed using an electroporation method adapted from Weigel and Glazebrook (2002). 50 μl of competent agro cells were thawed on ice, and 10-25 ng of the desired plasmid was added to the cells. The DNA and cell mix was added to pre-chilled electroporation cuvettes (2 mm). An Eppendorf Electroporator 2510 was used for the transformation with the following conditions, Voltage: 2.4kV, Pulse length: 5msec.

After electroporation, 1 ml of YEP broth (per liter: 10 g yeast extract, 10 g Bacto-peptone, 5 g NaCl) was added to the cuvette, and the cell-YEP suspension was transferred to a 15 ml culture tube. The cells were incubated at 28° C in a water bath with constant agitation for 4 hours. After incubation, the culture was plated on YEP + agar with erythromycin (200 mg/L) or spectinomycin (100 mg/L) and streptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (250 mg/L). The plates were incubated for 2-4 days at 28° C.

Colonies were selected and streaked onto fresh YEP + agar with erythromycin (200 mg/L) or spectinomycin (100 mg/L) and streptomycin (250 mg/L) plates and incubated at 28°C for 1-3 days. Colonies were selected for PCR analysis to verify the presence of the gene insert by using vector specific primers. Qiagen Spin Mini Preps, performed per manufacturer's instructions, were used to purify the plasmid DNA from selected *Agrobacterium* colonies with the following exception: 4 ml aliquots of a 15 ml overnight

mini prep culture (liquid YEP + erythromycin (200 mg/L) or spectinomycin (100 mg/L)) and streptomycin (250 mg/L)) were used for the DNA purification. An alternative to using Qiagen Spin Mini Prep DNA was lysing the transformed *Agrobacterium* cells, suspended in 10 µl of water, at 100° C for 5 minutes. Plasmid DNA from the binary vector used in the *Agrobacterium* transformation was included as a control. The PCR reaction was completed using Taq DNA polymerase from Takara Mirus Bio Inc. (Madison, Wisconsin) per manufacturer's instructions at 0.5x concentrations. PCR reactions were carried out in a MJ Research Peltier Thermal Cycler programmed with the following conditions; 1) 94° C for 3 minutes, 2) 94° C for 45 seconds, 3) 55° C for 30 seconds, 4) 72° C for 1 minute, for 29 cycles then 1 cycle of 72° C for 10 minutes. The reaction was maintained at 4° C after cycling. The amplification was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. A colony was selected whose PCR product was identical to the plasmid control.

6.3 – *Arabidopsis* transformation.

Arabidopsis was transformed using the floral dip method. The selected colony was used to inoculate one or more 15-30 ml pre-cultures of YEP broth containing erythromycin (200 mg/L) or spectinomycin (100 mg/L) and streptomycin (250 mg/L). The culture(s) was incubated overnight at 28° C with constant agitation at 220 rpm. Each pre-culture was used to inoculate two 500 ml cultures of YEP broth containing erythromycin (200 mg/L) or spectinomycin (100 mg/L) and streptomycin (250 mg/L) and the cultures were incubated overnight at 28° C with constant agitation. The cells were then pelleted at approx. 8700x g for 10 minutes at room temperature, and the resulting supernatant discarded. The cell pellet was gently resuspended in 500 ml infiltration media containing: 1/2x Murashige and Skoog salts/Gamborg's B5 vitamins, 10% (w/v) sucrose, 0.044µM benzylamino purine (10 µl/liter of 1 mg/ml stock in DMSO) and 300 µl/liter Silwet L-77. Plants approximately 1 month old were dipped into the media for 15 seconds, being sure to submerge the newest inflorescence. The plants were then laid down on their sides and covered (transparent or opaque) for 24 hours, then washed with water, and placed upright. The plants were grown at 22° C, with a 16-hour light/8-hour dark photoperiod. Approximately 4 weeks after dipping, the seeds were harvested.

6.4 – Selection of transformed plants.

Freshly harvested T₁ seed [*AAD-13 (vl)* gene] was allowed to dry for 7 days at room temperature. T₁ seed was sown in 26.5 x 51-cm germination trays (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), each receiving a 200 mg aliquots of stratified T₁ seed (~10,000 seed) that had previously been suspended in 40 ml of 0.1% agarose solution and stored at 4° C for 2 days to complete dormancy requirements and ensure synchronous seed germination.

Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) was covered with fine vermiculite and subirrigated with Hoagland's solution until wet, then allowed to gravity drain. Each 40 ml aliquot of stratified seed was sown evenly onto the vermiculite with a pipette and covered with humidity domes (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canada) for 4-5 days. Domes were removed 1 day prior to initial transformant selection using glufosinate postemergence spray (selecting for the co-transformed *PAT* gene).

Seven days after planting (DAP) and again 11 DAP, T₁ plants (cotyledon and 2-4-leaf stage, respectively) were sprayed with a 0.2% solution of Liberty herbicide (200 g ai/L glufosinate, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) at a spray volume of 10 ml/tray (703 L/ha) using a DeVilbiss compressed air spray tip to deliver an effective rate of 280 g ai/ha glufosinate per application. Survivors (plants actively growing) were identified 4-7 days after the final spraying and transplanted individually into 3-inch pots prepared with potting media (Metro Mix 360). Transplanted plants were covered with humidity domes for 3-4 days and placed in a 22° C growth chamber as before or moved to directly to the greenhouse. Domes were subsequently removed and plants reared in the greenhouse (22±5° C, 50±30% RH, 14 h light:10 dark, minimum 500 µE/m²s⁻¹ natural + supplemental light) at least 1 day prior to testing for the ability of *AAD-13 (vl)* to provide phenoxo auxin herbicide resistance.

T₁ plants were then randomly assigned to various rates of 2,4-D. For *Arabidopsis*, 50 g ae/ha 2,4-D is an effective dose to distinguish sensitive plants from ones with meaningful levels of resistance. Elevated rates were also applied to determine relative levels of resistance (280, 560, 1120, or 2240g ae/ha). Tables 11 and 12 show comparisons drawn to an aryloxyalkanoate herbicide resistance gene (*AAD-12 (vl)*) previously described in PCT/US2006/042133.

All auxin herbicide applications were made using the DeVilbiss sprayer as described above to apply 703 L/ha spray volume (0.4 ml solution/3-inch pot) or applied by track sprayer in a 187 L/ha spray volume. 2,4-D used was either technical grade (Sigma, St. Louis, MO) dissolved in DMSO and diluted in water (<1% DMSO final concentration) or the commercial dimethylamine salt formulation (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO). Dichlorprop used was commercial grade formulated as potassium salt of R-dichlorprop (600 g ai/L, AH Marks). As herbicide rates increased beyond 800 g ae/ha, the pH of the spray solution became exceedingly acidic, burning the leaves of young, tender *Arabidopsis* plants and complicating evaluation of the primary effects of the herbicides.

Some T₁ individuals were subjected to alternative commercial herbicides instead of a phenoxy auxin. One point of interest was determining whether the pyridyloxyacetate auxin herbicides, triclopyr and fluroxypyr, could be effectively degraded *in planta*. Herbicides were applied to T₁ plants with use of a track sparyer in a 187 L/ha spray volume. T₁ plants that exhibited tolerance to 2,4-D DMA were further accessed in the T₂ generation.

6.5 – Results of selection of transformed plants.

The first *Arabidopsis* transformations were conducted using *AAD-13 (v1)* (plant optimized gene). T₁ transformants were first selected from the background of untransformed seed using a glufosinate selection scheme. Over 160,000 T₁ seed were screened and 238 glufosinate resistant plants were identified (PAT gene), equating to a transformation/selection frequency of 0.15% which lies in the normal range of selection frequency of constructs where PAT + Liberty are used for selection. T₁ plants selected above were subsequently transplanted to individual pots and sprayed with various rates of commercial aryloxyalkanoate herbicides. Table 11 compares the response of *AAD-13 (v1)* and control genes to impart 2,4-D resistance to *Arabidopsis* T₁ transformants. Response is presented in terms of % visual injury 2 WAT. Data are presented as a histogram of individuals exhibiting little or no injury (<20%), moderate injury (20-40%), or severe injury (>40%). An arithmetic mean and standard deviation is presented for each treatment. The range in individual response is also indicated in the last column for each rate and transformation. *PAT/CryIF*-transformed *Arabidopsis* served as an auxin-sensitive transformed control. The *AAD-13 (v1)* gene imparted herbicide resistance to individual T₁ *Arabidopsis* plants. Within a given treatment, the level of plant response varied greatly and can be attributed to the fact each plant represents an independent transformation event. Of important note, at each 2,4-D rate tested,

there were individuals that were unaffected while some were severely affected. An overall population injury average by rate is presented in Table 11 simply to demonstrate the significant difference between the plants transformed with *AAD-13 (v1)* versus the *AAD-12 (v1)* or *PAT/Cry1F*-transformed controls. At high rates the spray solution becomes highly acidic unless buffered therefore some of the injury may be attributed to the acidity of the spray solution. *Arabidopsis* grown mostly in the growth chamber has a very thin cuticle and severe burning effects can complicate testing at these elevated rates. Nonetheless, many individuals have survived 2,240 g ae/ha 2,4-D with little or no injury.

Table 11. AAD-13 (v1) transformed T1 Arabidopsis response to a range of 2,4-D rates applied postemergence, compared to an AAD-12 v1 (T4) homozygous resistant population, or a Pat-Cry1F transformed, auxin-sensitive control (14 DAT).						
AAD-13 (v1) gene T ₁ plants		% Injury			% Injury	
Averages		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev
0 g ae/ha 2,4-D DMA		20	0	0	0	0
280 g ae/ha 2,4-D DMA		12	4	4	21	31
560 g ae/ha 2,4-D DMA		17	2	0	2	6
1120 g ae/ha 2,4-D DMA		20	0	0	2	4
2240 g ae/ha 2,4-D DMA		14	3	3	15	23
PAT / Cry1F (transformed control)		% Injury			% Injury	
Averages		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev
0 g ae/ha 2,4-D DMA		20	0	0	0	0
280 g ae/ha 2,4-D DMA		0	0	20	100	0
560 g ae/ha 2,4-D DMA		0	0	20	100	0
1120 g ae/ha 2,4-D DMA		0	0	20	100	0
2240 g ae/ha 2,4-D DMA		0	0	20	100	0
Homozygous AAD-12 (v1) gene T ₄ plants		% Injury			% Injury	
Averages		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev
0 g ae/ha 2,4-D DMA		20	0	0	0	0
280 g ae/ha 2,4-D DMA		20	0	0	0	0
560 g ae/ha 2,4-D DMA		20	0	0	1	3
1120 g ae/ha 2,4-D DMA		20	0	0	2	4
2240 g ae/ha 2,4-D DMA		16	3	1	13	13

Table 12 shows a similarly conducted dose response of T₁ *Arabidopsis* to the phenoxypropionic acid, dichlorprop. The data shows that the herbicidally active (R-) isomer of dichlorprop does not serve as a suitable substrate for AAD-13 (v1) or AAD-12 (v1). The fact that AAD-1 (v3) will metabolize R-dichlorprop well enough to impart commercially acceptable tolerance is one distinguishing characteristic that separates the three genes (Table 12 and Example 7 of PCT/US2006/042133 (Wright et al., filed October 27, 2006). AAD-1 and AAD-13 are considered R- and S-specific α -ketoglutarate dioxygenases, respectively.

Table 12. T1 Arabidopsis response to a range of R-dichloroprop rates applied postemergence. (14 DAT)						
AAD-13 (v1) gene T ₁ plants	% Injury			% Injury		
	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	Range (%)
Averages						
0 g ae/ha	20	0	0	0	0	0
800 g ae/ha R-dichloroprop	0	0	20	100	0	100
Wildtype (untransformed control)	% Injury			% Injury		
	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	Range (%)
Averages						
0 g ae/ha	20	0	0	0	0	0
800 g ae/ha R-dichloroprop	0	0	20	100	0	100
Homozygous AAD-12 (v1) gene T ₄ plants	% Injury			% Injury		
	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	Range (%)
Averages						
0 g ae/ha	20	0	0	0	0	0
800 g ae/ha R-dichloroprop	0	0	20	100	0	100

6.6 – *AAD-13 (v1)* as a selectable marker.

The ability to use *AAD-13 (v1)* as a selectable marker using 2,4-D as the selection agent will be analyzed with *Arabidopsis* transformed as described above. Approximately 50 T₄ generation *Arabidopsis* seed (homozygous for *AAD-13 (v1)*) will be spiked into approximately 5,000 wildtype (sensitive) seed. Several treatments will be compared, each tray of plants will receive either one or two application timings of 2,4-D in one of the following treatment schemes: 7 DAP, 11 DAP, or 7 followed by 11 DAP. Since all individuals also contain the *PAT* gene in the same transformation vector, *AAD-13* selected with 2,4-D can be directly compared to *PAT* selected with glufosinate.

Treatments will be applied with a DeVilbiss spray tip as previously described. Plants will be identified as Resistant or Sensitive 17 DAP. The optimum treatment of 75 g ae/ha 2,4-D applied 7 and 11 days after planting (DAP), is equally effective in selection frequency, and results in less herbicidal injury to the transformed individuals than the Liberty selection scheme. These results will indicate that *AAD-13 (v1)* can be effectively used as an alternative selectable marker for a population of transformed *Arabidopsis*.

6.7 – Heritability.

A variety of T₁ events were self-pollinated to produce T₂ seed. These seed were progeny tested by applying Liberty (280 g ae/ha) to 100 random T₂ siblings. Each individual T₂ plant was transplanted to 7.5-cm square pots prior to spray application (track sprayer at 187 L/ha applications rate). Fifty percent of the T₁ families (T₂ plants) segregated in the anticipated 3 Resistant:1 Sensitive model for a dominantly inherited single locus with Mendelian inheritance as determined by Chi square analysis ($P > 0.05$).

Seed were collected from 12 to 20 T₂ individuals (T₃ seed). Twenty-five T₃ siblings from each of eight randomly-selected T₂ families were progeny tested as previously described. Half of the T₂ families tested were homozygous (non-segregating populations) in each line. These data show will show that *AAD-13 (v1)* is stably integrated and inherited in a Mendelian fashion to at least three generations.

6.8 – Additional foliar applications herbicide resistance in *AAD-13 Arabidopsis*.

The ability of *AAD-13 (v1)* to provide resistance to other aryloxyalkanoate auxin herbicides in transgenic *Arabidopsis* was determined by foliar application of various substrates. T₂ generation *Arabidopsis* seed was stratified, and sown into selection trays much like that of *Arabidopsis* (Example 6.4). A transformed-control line containing *PAT* and the insect resistance gene *Cry1F* was planted in a similar manner. Seedlings were transferred to individual 3-inch pots in the greenhouse. All plants were sprayed with the use of a track sprayer set at 187 L/ha. The plants were sprayed with a range of pyridyloxyacetate herbicides: 200-800 g ae/ha triclopyr (Garlon 3A, Dow AgroSciences) and 200-800 g ae/ha fluroxypyr (Starane, Dow AgroSciences). The 2,4-D metabolite resulting from *AAD-13* activity, 2,4-dichlorophenol (DCP, Sigma) (at a molar equivalent to 280-2240 g ae/ha of 2,4-D, technical grade will also be tested. All applications were formulated in water. Each treatment was replicated 3-4 times. Plants were evaluated at 3 and 14 days after treatment.

AAD-13-transformed plants were also clearly protected from the fluroxypyr herbicide injury that was seen in the transformed control line, Pat/Cry1F (see Table 13); however, *AAD-13*-transformed plants were severely injured by triclopyr. These results confirm that *AAD-13 (v1)* in *Arabidopsis* provides resistance to the pyridyloxyacetic auxins tested. The *AAD-13 (v1)* gene provided robust resistance up to 400 g ae/ha fluroxypyr, whereas the *AAD-12 (v1)* gene provided only modest level of tolerance as low as 200 g/ha. The *AAD-13 (v1)* gene provided significantly less tolerance to triclopyr than the *AAD-12 (v1)* gene. The

significantly greater tolerance to fluroxypyr is unexpected and allows distinction of *AAD-13* (*v1*)-type activity from *AAD-12* (*v1*) and is supported by the enzymatic data of Example 5.

Table 13. Comparison of T2 AAD-13 (<i>v1</i>) and transformed control Arabidopsis plant response to various foliar-applied auxinic herbicides.			
Herbicide Treatment	Pyridyloxyacetic auxins		
	Ave. % Injury 14DAT		
	Segregating T2 AAD-13 (<i>v1</i>) plants (pDAB4114.01.094)	Homozygous T4 AAD-12 (<i>v1</i>) plants	Pat/Cry1f - Control
200 g ae/ha triclopyr	75	25	100
400 g ae/ha triclopyr	90	33	100
800 g ae/ha triclopyr	100	79	100
200 g ae/ha fluroxypyr	10	48	100
400 g ae/ha fluroxypyr	16	55	100
800 g ae/ha fluroxypyr	55	60	100

Example 7 – Transformation of additional crop species

Corn may be transformed to provide high levels resistance to 2,4-D and fluroxypyr by utilizing the same techniques previously described in Example #8 of WO 2007/053482 (PCT/US2006/042133 (Wright et al.)).

Soybean may be transformed to provide high levels resistance to 2,4-D and fluroxypyr by utilizing the same techniques previously described in Example #11 or Example #13 of WO 2007/053482 (PCT/US2006/042133 (Wright et al.)).

Cotton may be transformed to provide high levels resistance to 2,4-D and fluroxypyr by utilizing the same techniques previously described in Examples #14 of patent application PCT/US2005/014737 (Wright et al., filed May 2, 2005) or Example #12 of WO 2007/053482 (Wright et al.).

Canola may be transformed to provide high levels resistance to 2,4-D and fluroxypyr by utilizing the same techniques previously described in Example #26 of patent application PCT/US2005/014737 (Wright et al., filed May 2, 2005) or Example #22 of WO 2007/053482 (Wright et al.).

Example 8 – Protein detection from transformed plants via antibody

Antibodies and subsequent ELISA assays can be developed and implemented as described in Example 9 of WO 2007/053482 (Wright et al.), for example.

Example 9 – Tobacco Transformation

Tobacco transformation with *Agrobacterium tumefaciens* was carried out by a method similar, but not identical, to published methods (Horsch *et al.*, 1988). To provide source tissue for the transformation, tobacco seed (*Nicotiana tabacum* cv. KY160) was surface sterilized and planted on the surface of TOB-medium, which is a hormone-free Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962) solidified with agar. Plants were grown for 6-8 weeks in a lighted incubator room at 28-30° C and leaves collected sterilely for use in the transformation protocol. Pieces of approximately one square centimeter were sterilely cut from these leaves, excluding the midrib. Cultures of the *Agrobacterium* strains (EHA101S containing pDAB3278, aka pDAS1580, *AAD-13 (v1)* + *PAT*), grown overnight in a flask on a shaker set at 250 rpm at 28° C, was pelleted in a centrifuge and resuspended in sterile Murashige & Skoog salts, and adjusted to a final optical density of 0.5 at 600 nm. Leaf pieces were dipped in this bacterial suspension for approximately 30 seconds, then blotted dry on sterile paper towels and placed right side up on TOB+ medium (Murashige and Skoog medium containing 1 mg/L indole acetic acid and 2.5 mg/L benzyladenine) and incubated in the dark at 28° C. Two days later the leaf pieces were moved to TOB+ medium containing 250 mg/L cefotaxime (Agri-Bio, North Miami, Florida) and 5 mg/L glufosinate ammonium (active ingredient in Basta, Bayer Crop Sciences) and incubated at 28-30°C in the light. Leaf pieces were moved to fresh TOB+ medium with cefotaxime and Basta twice per week for the first two weeks and once per week thereafter. Four to six weeks after the leaf pieces were treated with the *Agrobacteria*; small plants arising from transformed foci were removed from this tissue preparation and planted into medium TOB-containing 250 mg/L cefotaxime and 10 mg/L Basta in Phytatray™ II vessels (Sigma). These plantlets were grown in a lighted incubator room. After 3 weeks, stem cuttings were taken and re-rooted in the same media. Plants were ready to send out to the greenhouse after 2-3 additional weeks.

Plants were moved into the greenhouse by washing the agar from the roots, transplanting into soil in 13.75 cm square pots, placing the pot into a Ziploc® bag (SC Johnson & Son, Inc.), placing tap water into the bottom of the bag, and placing in indirect light in a 30° C greenhouse for one week. After 3-7 days, the bag was opened; the plants were fertilized and allowed to grow in the open bag until the plants were greenhouse-acclimated, at which time the bag is removed. Plants were grown under ordinary warm greenhouse

conditions (30° C, 16 hour day, 8 hour night, minimum natural + supplemental light = 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$).

Prior to propagation, T₀ plants were sampled for DNA analysis to determine the insert copy number. The *PAT* gene which was molecularly linked to *AAD-13* (*v1*) was assayed for convenience. Fresh tissue was placed into tubes and lyophilized at 4° C for 2 days. After the tissue was fully dried, a tungsten bead (Valenite) was placed in the tube and the samples were subjected to 1 minute of dry grinding using a Kelco bead mill. The standard DNeasy DNA isolation procedure was then followed (Qiagen, DNeasy 69109). An aliquot of the extracted DNA was then stained with Pico Green (Molecular Probes P7589) and read in the fluorometer (BioTek) with known standards to obtain the concentration in ng/ μl .

The DNA samples were diluted to approximately 9 ng/ μl and then denatured by incubation in a thermocycler at 95° C for 10 minutes. Signal Probe mix is then prepared using the provided oligo mix and MgCl₂ (Third Wave Technologies). An aliquot of 7.5 μl is placed in each well of the Invader assay plate followed by an aliquot of 7.5 μl of controls, standards, and 20 ng/ μl diluted unknown samples. Each well was overlaid with 15 μl of mineral oil (Sigma). The plates were incubated at 63° C for 1.5 hours and read on the fluorometer (Biotek). Calculation of % signal over background for the target probe divided by the % signal over background internal control probe will calculate the ratio. The ratio of known copy standards developed and validated with southern blot analysis was used to identify the estimated copy of the unknown events.

All events were also assayed for the presence of the *AAD-13* (*v1*) gene by PCR using the same extracted DNA samples. A total of 100 ng of total DNA was used as template. 20 mM of each primer was used with the Takara Ex Taq PCR Polymerase kit. Primers for the Plant Transcription Unit (PTU) PCR *AAD-13* were (SdpacodF: ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:6) and (SdpacodR: CGGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO:7). The PCR reaction was carried out in the 9700 Geneamp thermocycler (Applied Biosystems), by subjecting the samples to 94° C for 3 minutes and 35 cycles of 94° C for 30 seconds, 64° C for 30 seconds, and 72° C for 1 minute and 45 seconds followed by 72° C for 10 minutes. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with EtBr.

9.1 – Selection of transformed plants.

Following the acclimation in the greenhouse T₀ plants were then randomly assigned to various rates of 2,4-D DMA ranging from 140 to 2240 g ae/ha at 4-fold increments. For tobacco, 140 g ae/ha 2,4-D is an effective dose to distinguish sensitive plants from ones with meaningful levels of resistance. Table 14 shows comparisons drawn to T₀ plants transformed with a glufosinate herbicide resistance gene (*PAT/CryIF*-transformed tobacco). Data demonstrated that AAD-13 (v1) when transformed in tobacco plants provides robust tolerance to 2,4-D DMA to at least 2240 g ae/ha.

Table 14. Comparison of T ₀ AAD-13 (v1) and transformed (PAT) control tobacco plant response to various rates of 2,4-D DMA 14 days after application.						
PAT/CryIF (transformed controls)	% Injury			% Injury		
Averages	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	Range (%)
0 g ae/ha 2,4-D DMA	3	0	0	0.0	0.0	0
140 g ae/ha 2,4-D DMA	0	1	2	47.0	6.0	40-50
560 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	3	75.0	0.0	75
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	3	97.0	8.0	90-100

AAD-13 (v1) gene T ₀ plants	% Injury			% Injury		
Averages	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev	Range (%)
0 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	0.0	0.0	0
140 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	8.0	11.0	0-15
560 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	3.0	4.0	0-5
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	5.0	0.0	5

T₁ seed from individual T₀ transformants were saved and seed was stratified and sown onto selection trays in the greenhouse much like that of Example 5. Prior to testing elevated rates of 2,4-D DMA, each T₁ line were progeny tested by applying 2,4-D DMA (560 g ae/ha) to 100 random T₁ siblings. Spray applications were made as previous described with a track sprayer calibrated to an application rate of 187 L/ha. Forty-three percent of the T₀ families (T₁ plants) segregated in the anticipated 3 Resistant:1 Sensitive model for a dominantly inherited single locus with Mendelian inheritance as determined by Chi square analysis (P > 0.05).

Seed were collected from 12 to 20 T₂ individuals (T₂ seed). Twenty-five T₃ siblings from each of eight randomly-selected T₂ families will be progeny tested as previously described. Approximately one-third of the T₂ families are anticipated to be homozygous (non-segregating populations) in each line. These data show will show that AAD-13 (v1) is stably integrated and inherited in a Mendelian fashion to at least three generations.

Surviving T₁ plants were then randomly assigned to various rates of 2,4-D. For tobacco, 140 g ae/ha 2,4-D is an effective dose to distinguish sensitive plants from ones with

meaningful levels of resistance. Elevated rates were also applied to determine relative levels of resistance (140, 560, or 2240g ae/ha). Table 15 shows the comparisons drawn to an untransformed control (KY160) variety of tobacco.

All auxin herbicide applications were applied by track sprayer in a 187 L/ha spray volume. 2,4-D used was the commercial dimethylamine salt formulation (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO). Some T₁ individuals were subjected to alternative commercial herbicides instead of a phenoxy auxin. One point of interest was determining whether the pyridyloxyacetate auxin herbicides, triclopyr and fluroxypyr, could be effectively degraded *in planta*. Herbicides were applied to T₁ plants with use of a track sparyer in a 187 L/ha spray volume. T₁ plants that exhibited tolerance to 2,4-D DMA were further accessed in the T₂ generation.

9.2 – Results of selection of transformed plants.

T₁ transformants were first selected from the background of untransformed plants using a 2,4-D selection scheme. Table 15 compares the response of *AAD-13 (v1)* and control genes to impart 2,4-D resistance to tobacco T₁ transformants. Response is presented in terms of % visual injury 2 WAT. Data are presented as a histogram of individuals exhibiting little or no injury (<20%), moderate injury (20-40%), or severe injury (>40%). An arithmetic mean and standard deviation is presented for each treatment. The range in individual response is also indicated in the last column for each rate and transformation. KY160 untransformed tobacco served as an auxin-sensitive control. The *AAD-13 (v1)* gene imparted herbicide resistance to individual T₁ tobacco plants.

Table 15. <i>AAD-13 (v1)</i> transformed T ₁ tobacco response to a range of 2,4-D rates applied postemergence, compared to an untransformed, auxin-sensitive control.						
Wildtype (untransformed control)		% Injury			% Injury	
Averages		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev
Untreated control		3	0	0	0.0	0.0
140 g ae/ha 2,4-DMA		0	0	3	80.0	0.0
560 g ae/ha 2,4-DMA		0	0	3	88.0	1.0
2240 g ae/ha 2,4-DMA		0	0	3	92.0	3.0
AAD-13 (v1) gene T ₁ plants		% Injury			% Injury	
Averages		<20%	20-40%	>40%	Ave	Std dev
Untreated control		3	0	0	0.0	0.0
140 g ae/ha 2,4-DMA		3	0	0	0.0	0.0
560 g ae/ha 2,4-DMA		3	0	0	0.0	0.0
2240 g ae/ha 2,4-DMA		3	0	0	2.0	3.0

93

9.3 – Additional foliar applications herbicide resistance in AAD-13 tobacco.

The ability of *AAD-13 (v1)* to provide resistance to other aryloxyalkanoate auxin herbicides in transgenic tobacco was determined by foliar application of various substrates. Extra T₁ generation plants following the T₁ progeny testing were sprayed with the use of a track sprayer set at 187 L/ha. The plants were sprayed with a range of pyridyloxyacetate herbicides: 140-1120 g ae/ha triclopyr (Garlon 3A, Dow AgroSciences) and 280-1120 g ae/ha fluroxypyr (Starane, Dow AgroSciences). All applications were formulated in water. Each treatment was replicated 3 times. Plants were evaluated at 3 and 14 days after treatment.

AAD-13-transformed plants were poorly protected from the triclopyr but were well protected from fluroxypyr herbicide injury that was seen in the untransformed control line (see Table 16). These results confirm that *AAD-13 (v1)* in tobacco provides resistance to certain selected pyridyloxyacetic auxin tested. The *AAD-13 (v1)* gene provided significant tolerance up to 1120 g ae/ha fluroxypyr, whereas the gene provided only modest level of tolerance to triclopyr as low as 280 g/ha. These data confirm that *AAD-13 (v1)* provides a selectivity bias toward fluroxypyr over triclopyr of the pyridyloxy auxins in multiple species. This unexpected observation further distinguishes the *AAD-13 (v1)* gene from other herbicide tolerance enzymes of similar mechanism and is observed in multiple plant species.

Table 16. Comparison of T ₁ <i>AAD-13 (v1)</i> and untransformed control tobacco plant response to various foliar applied auxinic herbicides 14 days after application.		
Pyridyloxyacetic auxins		
Herbicide Treatment	Segregating T ₁ <i>AAD-13 (v1)</i> plants (pDAB4114[1]003.006)	KY160 (untransformed control)
280 g ae/ha triclopyr	53.0	82.0
560 g ae/ha triclopyr	65.0	88.0
1120 g ae/ha triclopyr	75.0	92.0
280 g ae/ha fluroxypyr	7.0	100.0
560 g ae/ha fluroxypyr	25.0	100.0
1120 g ae/ha fluroxypyr	37.0	100.0

Example 10 – *AAD-13 (v1)* in Canola and transformation of other crops

10.1 – Canola transformation.

The *AAD-13 (v1)* gene conferring resistance to 2,4-D can be used to transform *Brassica napus* with *Agrobacterium*-mediated transformation using *PAT* as a selectable marker.

Seeds can be surface-sterilized with 10% commercial bleach for 10 minutes and rinsed 3 times with sterile distilled water. The seeds will be placed on one half concentration of MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) and maintained under growth regime set at 25° C, and a photoperiod of 16 hrs light/8 hrs dark.

5 Hypocotyl segments (3-5 mm) would be excised from 5 - 7 day old seedlings and placed on callus induction medium K1D1 (MS medium with 1 mg/L kinetin and 1 mg/L 2,4-D) for 3 days as pre-treatment. The segments will then be transferred into a petri plate, treated with *Agrobacterium* Z707S or LBA4404 strain containing pDAB3759. The *Agrobacterium* shall be grown overnight at 28° C in the dark on a shaker at 150 rpm and
0 subsequently re-suspended in the culture medium.

After 30 min treatment of the hypocotyl segments with *Agrobacterium*, these would be placed back on the callus induction medium for 3 days. Following co-cultivation, the segments will be placed on K1D1TC (callus induction medium containing 250 mg/L Carbenicillin and 300 mg/L Timentin) for one week or two weeks of recovery. Alternately,
5 the segments would be placed directly on selection medium K1D1H1 (above medium with 1 mg/L Herbiace). Carbenicillin and Timentin antibiotics would be used to kill the *Agrobacterium*. The selection agent Herbiace allows the growth of the transformed cells.

Callused hypocotyl segments would be placed on B3Z1H1 (MS medium, 3 mg/L benzylamino purine, 1 mg/L Zeatin, 0.5 gm/L MES [2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid],
5 5 mg/L silver nitrate, 1 mg/L Herbiace, Carbenicillin and Timentin) shoot regeneration medium. After 2-3 weeks shoots regenerate and hypocotyl segments along with the shoots are transferred to B3Z1H3 medium (MS medium, 3 mg/L benzylamino purine, 1 mg/L Zeatin, 0.5 gm/L MES [2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid], 5 mg/L silver nitrate, 3 mg/L Herbiace, Carbenicillin and Timentin) for another 2-3 weeks.

Shoots would be excised from the hypocotyl segments and transferred to shoot elongation medium MESH5 or MES10 (MS, 0.5 gm/L MES, 5 or 10 mg/L Herbiace, Carbenicillin, Timentin) for 2-4 weeks. The elongated shoots are cultured for root induction on MSI.1 (MS with 0.1 mg/L Indolebutyric acid). Once the plants are well established root system, these will be transplanted into soil. The plants are acclimated under controlled
1 environmental conditions in the Conviron for 1-2 weeks before transfer to the greenhouse.

10.2 – *Agrobacterium* Transformation of Other Crops

In light of the subject disclosure, additional crops can be transformed according to the subject invention using techniques that are known in the art. For *Agrobacterium*-mediated transformation of rye, *see, e.g.*, Popelka and Altpeter (2003)., *see, e.g.*, Hinchee *et al.*, 1988.
5 For *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum, *see, e.g.*, Zhao *et al.*, 2000. For *Agrobacterium*-mediated transformation of barley, *see, e.g.*, Tingay *et al.*, 1997. For *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat, *see, e.g.*, Cheng *et al.*, 1997. For *Agrobacterium*-mediated transformation of rice, *see, e.g.*, Hiei *et al.*, 1997.

The Latin names for these and other plants are given below. It should be clear that
10 these and other (non-*Agrobacterium*) transformation techniques can be used to transform AAD-13 (v1), for example, into these and other plants, including but not limited to Maize (*Zea mays*), Wheat (*Triticum* spp.), Rice (*Oryza* spp. and *Zizania* spp.), Barley (*Hordeum* spp.), Cotton (*Abroma augusta* and *Gossypium* spp.), Soybean (*Glycine max*), Sugar and table beets (*Beta* spp.), Sugar cane (*Arenga pinnata*), Tomato (*Lycopersicon esculentum* and
5 other spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* and other spp., and *Cyphomandra betacea*), Potato (*Solanum tuberosum*), Sweet potato (*Ipomoea batatas*), Rye (*Secale* spp.), Peppers (*Capsicum annuum*, *sinense*, and *frutescens*), Lettuce (*Lactuca sativa*, *perennis*, and *pulchella*), Cabbage (*Brassica* spp), Celery (*Apium graveolens*), Eggplant (*Solanum melongena*), Peanut (*Arachis hypogea*), Sorghum (all *Sorghum* species), Alfalfa (*Medicago sativa*),
10 Carrot (*Daucus carota*), Beans (*Phaseolus* spp. and other genera), Oats (*Avena sativa* and *strigosa*), Peas (*Pisum*, *Vigna*, and *Tetragonolobus* spp.), Sunflower (*Helianthus annuus*), Squash (*Cucurbita* spp.), Cucumber (*Cucumis sativa*), Tobacco (*Nicotiana* spp.), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), Turfgrass (*Lolium*, *Agrostis*, *Poa*, *Cynodon*, and other genera), Clover (*Tifolium*), Vetch (*Vicia*). Such plants, with AAD-13 (v1) genes, for example,
15 are included in the subject invention.

AAD-13 (v1) has the potential to increase the applicability of key auxinic herbicides for in-season use in many deciduous and evergreen timber cropping systems. Triclopyr, 2,4-D, and/or fluroxypyr resistant timber species would increase the flexibility of over-the-top use of these herbicides without injury concerns. These species would include, but not limited
20 to: Alder (*Alnus* spp.), ash (*Fraxinus* spp.), aspen and poplar species (*Populus* spp.), beech (*Fagus* spp.), birch (*Betula* spp.), cherry (*Prunus* spp.), eucalyptus (*Eucalyptus* spp.), hickory (*Carya* spp.), maple (*Acer* spp.), oak (*Quercus* spp.), and pine (*Pinus* spp). Use of auxin

resistance for the selective weed control in ornamental and fruit-bearing species is also within the scope of this invention. Examples could include, but not be limited to, rose (*Rosa spp.*), burning bush (*Euonymus spp.*), petunia (*Petunia spp.*), begonia (*Begonia spp.*), rhododendron (*Rhododendron spp.*), crabapple or apple (*Malus spp.*), pear (*Pyrus spp.*), peach (*Prunus spp.*), and marigolds (*Tagetes spp.*).

Example 11 – Further Evidence of Surprising Results: AAD-13 vs. AAD-2

Freshly harvested T₁ *Arabidopsis* seed transformed with a plant optimized AAD-13 (v1) or native AAD-2 (v1) gene (see PCT/US2005/014737) were planted and selected for resistance to glufosinate as previously described. Plants were then randomly assigned to various rates of 2,4-D (50-3200 g ae/ha). Herbicide applications were applied by track sprayer in a 187 L/ha spray volume. 2,4-D used was the commercial dimethylamine salt formulation (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO) mixed in 200 mM Tris buffer (pH 9.0) or 200 mM HEPES buffer (pH7.5).

AAD-13 (v1) and AAD-2 (v1) did provide detectable 2,4-D resistance versus the transformed and untransformed control lines; however, individuals varied in their ability to impart 2,4-D resistance to individual T₁ *Arabidopsis* plants. Surprisingly, AAD-2 (v1) and AAD-2 (v2) transformants were far less resistant to 2,4-D than the AAD-13 (v1) gene, both from a frequency of highly tolerant plants as well as overall average injury. No plants transformed with AAD-2 (v1) survived 200 g ae/ha 2,4-D relatively uninjured (<20% visual injury), and overall population injury was about 83% (see PCT/US2005/014737). Conversely, AAD-13 (v1) had a population injury average of about 15% when treated with 2,240 g ae/ha 2,4-D (Table 11). Comparison of both AAD-13 and AAD-2 plant optimized genes indicates a significant advantage for AAD-13 (v1) *in planta*.

These results are unexpected given that the *in vitro* comparison of AAD-2 (v1) (see PCT/US2005/014737) and AAD-13 (v2) indicated both were highly efficacious at degrading 2,4-D and both shared an S-type specificity with respect to chiral aryloxyalkanoate substrates. AAD-2 (v1) is expressed in individual T₁ plants to varying levels; however, little protection from 2,4-D injury is afforded by this expressed protein. No substantial difference was evident in protein expression level (*in planta*) for the native and plant optimized AAD-2 genes (see PCT/US2005/014737). These data corroborate earlier findings that make the functional

expression of *AAD-13 (v1)* in *planta*, and resulting herbicide resistance to 2,4-D and selected pyridyloxyacetate herbicides, is unexpected.

Example 12 – Preplant Burndown Applications

5 This and the following Examples are specific examples of novel herbicide uses made possible by the subject AAD-13 invention.

Preplant burndown herbicide applications are intended to kill weeds that have emerged over winter or early spring prior to planting a given crop. Typically these applications are applied in no-till or reduced tillage management systems where physical removal of weeds is not completed prior to planting. An herbicide program, therefore, must control a very wide spectrum of broadleaf and grass weeds present at the time of planting. Glyphosate, gramoxone, and glufosinate are examples of non-selective, non-residual herbicides widely used for preplant burndown herbicide applications. Some weeds, however, are difficult to control at this time of the season due to one or more of the following: inherent insensitivity of the weed species or biotype to the herbicide, relatively large size of winter annual weeds, and cool weather conditions limiting herbicide uptake and activity. Several herbicide options are available to tankmix with these herbicides to increase spectrum and activity on weeds where the non-selective herbicides are weak. An example would be 2,4-D tankmix applications with glyphosate to assist in the control of *Conyza canadensis* (horseweed). Glyphosate can be used from 420 to 1680 g ae/ha, more typically 560 to 840 g ae/ha, for the preplant burndown control of most weeds present; however, 280 – 1120 g ae/ha of 2,4-D can be applied to aid in control of many broadleaf weed species (e.g., horseweed). 2,4-D is an herbicide of choice because it is effective on a very wide range of broadleaf weeds, effective even at low temperatures, and extremely inexpensive. However, if the subsequent crop is a sensitive dicot crop, 2,4-D residues in the soil (although short-lived) can negatively impact the crop. Soybeans are a sensitive crop and require a minimum time period of 7 days (for 280 g ae/ha 2,4-D rate) to at least 30 days (for 2,4-D applications of 1120 g ae/ha) to occur between burndown applications and planting. 2,4-D is prohibited as a burndown treatment prior to cotton planting (see federal labels, most are available through CPR, 2005 or online at cdms.net/manuf/manuf.asp). With *AAD-13 (v1)* transformed cotton or soybeans, these crops should be able to survive 2,4-D residues in the soil from burndown applications applied right up to and even after planting before emergence of the crop. The

increased flexibility and reduced cost of tankmix (or commercial premix) partners will improve weed control options and increase the robustness of burndown applications in important no-till and reduced tillage situations. This example is one of many options that will be available. Those skilled in the art of weed control will note a variety of other applications including, but not limited to gramoxone + 2,4-D or glufosinate + 2,4-D by utilizing products described in federal herbicide labels (CPR, 2005) and uses described in Agrilience Crop Protection Guide (2005), as examples. Those skilled in the art will also recognize that the above example can be applied to any 2,4-D-sensitive (or other phenoxy auxin herbicide) crop that would be protected by the *AAD-13 (v1)* gene if stably transformed. Likewise, the unique attributes of *AAD-13* allowing degradation of fluroxypyr increase utility by allowing substitution or tank mixes of 35-560 g ae/ha fluroxypyr to increase spectrum and/or increase the ability to control perennial or viney weed species.

Example 13 – In-Crop Use of Auxin Herbicides in Soybeans, Cotton, and Other Dicot Crops Transformed Only with *AAD-13 (v1)*

AAD-13 (v1) can enable the use of phenoxy auxin herbicides (e.g., 2,4-D and MCPA) and pyridyloxy auxins (fluroxypyr) for the control of a wide spectrum of broadleaf weeds directly in crops normally sensitive to 2,4-D. Application of 2,4-D at 280 to 2240 g ae/ha would control most broadleaf weed species present in agronomic environments. More typically, 560 – 1120 g ae/ha is used. For fluroxypyr, application rates would typically range from 35-560 g ae/ha, more typically 70-280 ae/ha.

An advantage to this additional tool is the extremely low cost of the broadleaf herbicide component and potential short-lived residual weed control provided by higher rates of 2,4-D and fluroxypyr when used at higher rates, whereas a non-residual herbicide like glyphosate would provide no control of later germinating weeds. This tool also provides a mechanism to combine herbicide modes of action with the convenience of HTC as an integrated herbicide resistance and weed shift management strategy.

A further advantage this tool provides is the ability to tankmix broad spectrum broadleaf weed control herbicides (e.g., 2,4-D and fluroxypyr) with commonly used residual weed control herbicides. These herbicides are typically applied prior to or at planting, but often are less effective on emerged, established weeds that may exist in the field prior to planting. By extending the utility of these aryloxy auxin herbicides to include at-plant,

preemergence, or pre-plant applications, the flexibility of residual weed control programs increases. One skilled in the art would recognize the residual herbicide program will differ based on the crop of interest, but typical programs would include herbicides of the chloracetamide and dinitroaniline herbicide families, but also including herbicides such as clomazone, sulfentrazone, and a variety of ALS-inhibiting, PPO-inhibiting, and HPPD-inhibiting herbicides.

Further benefits could include tolerance to 2,4-D or fluroxypyr required before planting following aryloxyacetic acid auxin herbicide application (*see* previous example); and fewer problems from contamination injury to dicot crops resulting from incompletely cleaned bulk tanks that had contained 2,4-D or fluroxypyr. Dicamba, R-dichlorprop, and many other herbicides can still be used for the subsequent control of *AAD-13 (v1)*-transformed dicot crop volunteers.

Those skilled in the art will also recognize that the above example can be applied to any 2,4-D-sensitive (or other aryloxy auxin herbicide) crop that would be protected by the *AAD-13 (v1)* gene if stably transformed. One skilled in the art of weed control will now recognize that use of various commercial phenoxy or pyridyloxy auxin herbicides alone or in combination with an herbicide is enabled by *AAD-13 (v1)* transformation. Specific rates of other herbicides representative of these chemistries can be determined by the herbicide labels compiled in the CPR (Crop Protection Reference) book or similar compilation or any commercial or academic crop protection references such as the Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-13 (v1)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 14 - In-Crop Use of Phenoxy Auxin and Pyridyloxy Auxin Herbicides in *AAD-13 (v1)* Only Transformed Corn, Rice, and Other Monocot Species

In an analogous fashion, transformation of grass species (such as, but not limited to, corn, rice, wheat, barley, or turf and pasture grasses) with *AAD-13 (v1)* would allow the use of highly efficacious phenoxy and pyridyloxy auxins in crops where normally selectivity is not certain. Most grass species have a natural tolerance to auxinic herbicides such as the phenoxy auxins (i.e., 2,4-D.). However, a relatively low level of crop selectivity has resulted in diminished utility in these crops due to a shortened window of application timing or

unacceptable injury risk. *AAD-13 (v1)*-transformed monocot crops would, therefore, enable the use of a similar combination of treatments described for dicot crops such as the application of 2,4-D at 280 to 2240 g ae/ha to control most broadleaf weed species. More typically, 560 – 1120 g ae/ha is used.. For fluroxypyr, application rates would typically range
5 from 35-560 g ae/ha, more typically 70-280 ae/ha.

An advantage to this additional tool is the extremely low cost of the broadleaf herbicide component and potential short-lived residual weed control provided by higher rates of 2,4-D or fluroxypyr. In contrast, a non-residual herbicide like glyphosate would provide no control of later-germinating weeds. This tool would also provide a mechanism to rotate
10 herbicide modes of action with the convenience of HTC as an integrated-herbicide-resistance and weed-shift-management strategy in a glyphosate tolerant crop/*AAD-13 (v1)* HTC combination strategy, whether one rotates crops species or not.

A further advantage this tool provides is the ability to tankmix broad spectrum broadleaf weed control herbicides (e.g., 2,4-D and fluroxypyr) with commonly used residual
15 weed control herbicides. These herbicides are typically applied prior to or at planting, but often are less effective on emerged, established weeds that may exist in the field prior to planting. By extending the utility of these aryloxy auxin herbicides to include at-plant, preemergence, or pre-plant applications, the flexibility of residual weed control programs increases. One skilled in the art would recognize the residual herbicide program will differ
20 based on the crop of interest, but typical programs would include herbicides of the chloracetmide and dinitroaniline herbicide families, but also including herbicides such as clomazone, sulfentrazone, and a variety of ALS-inhibiting, PPO-inhibiting, and HPPD-inhibiting herbicides.

The increased tolerance of corn, rice, and other monocots to the phenoxy or
25 pyridyloxy auxins shall enable use of these herbicides in-crop without growth stage restrictions or the potential for crop leaning; unfurling phenomena such as “rat-tailing,” growth regulator-induced stalk brittleness in corn, or deformed brace roots. Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-13 (v1)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.
30

Example 15 – AAD-13 (v1) Stacked With Glyphosate Tolerance Trait in Any Crop

The vast majority of cotton, canola, corn, and soybean acres planted in North America contain a glyphosate tolerance (GT) trait, and adoption of GT corn is on the rise. Additional GT crops (e.g., wheat, rice, sugar beet, and turf) have been under development but have not been commercially released to date. Many other glyphosate resistant species are in experimental to development stage (e.g., alfalfa, sugar cane, sunflower, beets, peas, carrot, cucumber, lettuce, onion, strawberry, tomato, and tobacco; forestry species like poplar and sweetgum; and horticultural species like marigold, petunia, and begonias; isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005 on the World Wide Web). GTC's are valuable tools for the sheer breadth of weeds controlled and convenience and cost effectiveness provided by this system. However, glyphosate's utility as a now-standard base treatment is selecting for glyphosate resistant weeds. Furthermore, weeds that glyphosate is inherently less efficacious on are shifting to the predominant species in fields where glyphosate-only chemical programs are being practiced. By stacking AAD-13 (v1) with a GT trait, either through conventional breeding or jointly as a novel transformation event, weed control efficacy, flexibility, and ability to manage weed shifts and herbicide resistance development could be improved. As mentioned in previous examples, by transforming crops with AAD-13 (v1), monocot crops will have a higher margin of phenoxy or pyridyloxy auxin safety, and phenoxy auxins can be selectively applied in dicot crops. Several scenarios for improved weed control options can be envisioned where AAD-13 (v1) and a GT trait are stacked in any monocot or dicot crop species:

- a) Glyphosate can be applied at a standard postemergent application rate (420 to 2160 g ae/ha, preferably 560 to 840 g ae/ha) for the control of most grass and broadleaf weed species. For the control of glyphosate resistant broadleaf weeds like *Coryza canadensis* or weeds inherently difficult to control with glyphosate (e.g., *Commelina* spp, *Ipomoea* spp, etc), 280-2240 g ae/ha (preferably 560-1120 g ae/ha) 2,4-D can be applied sequentially, tank mixed, or as a premix with glyphosate to provide effective control. For fluroxypyr, application rates would typically range from 35-560 g ae/ha, more typically 70-280 ae/ha.
- b) Currently, glyphosate rates applied in GTC's generally range from 560 to 2240 g ae/ha per application timing. Glyphosate is far more efficacious on

grass species than broadleaf weed species. *AAD-13 (v1)* + GT stacked traits would allow grass-effective rates of glyphosate (105-840 g ae/ha, more preferably 210-420 g ae/ha). 2,4-D (at 280-2240 g ae/ha, more preferably 560-1120 g ae/ha) could then be applied sequentially, tank mixed, or as a premix with grass-effective rates of glyphosate to provide necessary broadleaf weed control. Fluroxypyr at rates mentioned above would be acceptable components in the treatment regimen. The low rate of glyphosate would also provide some benefit to the broadleaf weed control; however, primary control would be from the 2,4-D or fluroxypyr.

One skilled in the art of weed control will recognize that use of one or more commercial aryloxy auxin herbicides alone or in combination (sequentially or independently) is enabled by *AAD-13 (v1)* transformation into crops. Specific rates of other herbicides representative of these chemistries can be determined by the herbicide labels compiled in the CPR (Crop Protection Reference) book or similar compilation, labels compiled online (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp), or any commercial or academic crop protection guides such as the Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-13 (v1)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 16 – *AAD-13 (v1)* Stacked with Glufosinate Tolerance Trait in Any Crop

Glufosinate tolerance (*PAT*, *bar*) is currently present in a number of crops planted in North America either as a selectable marker for an input trait like insect resistance proteins or specifically as an HTC trait. Crops include, but are not limited to, glufosinate tolerant canola, corn, and cotton. Additional glufosinate tolerant crops (e.g., rice, sugar beet, soybeans, and turf) have been under development but have not been commercially released to date. Glufosinate, like glyphosate, is a relatively non-selective, broad spectrum grass and broadleaf herbicide. Glufosinate's mode of action differs from glyphosate. It is faster acting, resulting in desiccation and "burning" of treated leaves 24-48 hours after herbicide application. This is advantageous for the appearance of rapid weed control. However, this also limits translocation of glufosinate to meristematic regions of target plants resulting in poorer weed control as evidenced by relative weed control performance ratings of the two compounds in many species (Agrilience, 2005).

By stacking *AAD-13 (v1)* with a glufosinate tolerance trait, either through conventional breeding or jointly as a novel transformation event, weed control efficacy, flexibility, and ability to manage weed shifts and herbicide resistance development could be improved. Several scenarios for improved weed control options can be envisioned where
5 *AAD-13 (v1)* and a glufosinate tolerance trait are stacked in any monocot or dicot crop species:

- a) Glufosinate can be applied at a standard postemergent application rate (200 to 1700 g ae/ha, preferably 350 to 500 g ae/ha) for the control of many grass and broadleaf weed species. To date, no glufosinate-resistant weeds have been confirmed; however, glufosinate has a greater number of weeds that are inherently more tolerant than does glyphosate.
10
- i) Inherently tolerant broadleaf weed species (e.g., *Cirsium arvensis*, *Apocynum cannabinum*, and *Conyza canadensis*) could be controlled by tank mixing 280-2240 g ae/ha, more preferably 560-2240 g ae/ha, 2,4-D for effective control of these more difficult-to-control perennial species and to improve the robustness of control on annual broadleaf weed species. Fluroxypyr would be acceptable components to consider in the weed control regimen. For fluroxypyr, application rates would typically range from 35-560 g ae/ha, more typically 70-280
15 ac/ha.
- b) A multiple combination of glufosinate (200-500 g ae/ha) +/- 2,4-D (280-1120 g ae/ha) +/- fluroxypyr (at rates listed above), for example, could provide more robust, overlapping weed control spectrum. Additionally, the overlapping spectrum provides an additional mechanism for the management or delay of
20 herbicide resistant weeds.

One skilled in the art of weed control will recognize that use of one or more commercial aryloxyacetic auxin herbicides alone or in combination (sequentially or independently) is enabled by *AAD-13 (v1)* transformation into crops. Specific rates of other herbicides representative of these chemistries can be determined by the herbicide labels
25 compiled in the CPR (Crop Protection Reference) book or similar compilation, labels compiled online (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp), or any commercial or academic crop protection guides such as the Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Each alternative

herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-13* (*v1*), whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

The subject invention thus includes a transgenic plant (and plant cells) comprising an *AAD-13* gene of the subject invention "stacked" with a *DSM-2* gene of PCT/US2007/086813 (filed December 7, 2007). Such *DSM-2* genes include SEQ ID NOS:1 and 3 of that application. Those genes encode proteins comprising SEQ ID NOS:2 and 4 of that application. Still further, additional herbicide tolerance genes can be included in multiple "stacks" comprising three or more such genes.

Example 17 - *AAD-13* (*v1*) Stacked with the *AAD-1* (*v3*) Trait in Any Crop

Homozygous *AAD-13* (*v1*) and *AAD-1* (*v3*) plants (see PCT/US2005/014737 for the latter) can be both reciprocally crossed and F₁ seed collected. The F₁ seed from two reciprocal crosses of each gene were stratified and treated 4 reps of each cross were treated under the same spray regime as used for the other testing with one of the following treatments: 70, 140, 280 g ae/ha fluroxypyr (selective for the *AAD-12* (*v1*) gene); 280, 560, 1120 g ae/ha R-dichloroprop (selective for the *AAD-1* (*v3*) gene); or 560, 1120, 2240 g ae/ha 2,4-D DMA (to confirm 2,4-D tolerance). Homozygous T₂ plants of each gene were also planted for use as controls. Plants were graded at 3 and 14 DAT. Spray results are shown in Table 24.

The results confirm *AAD-13* (*v1*) can be successfully stacked with *AAD-1* (*v3*), thus increasing the spectrum herbicides that may be applied to the crop of interest (phenoxyacetic acids + phenoxypropionic acids vs phenoxyacetic acids + pyridyloxyacetic acids for *AAD-1* and *AAD-13*, respectively). The complementary nature of herbicide cross resistance patterns allows convenient use of these two genes as complementary and stackable field-selectable markers. In crops where tolerance with a single gene may be marginal, one skilled in the art recognizes that one can increase tolerance by stacking a second tolerance gene for the same herbicide. Such can be done using the same gene with the same or different promoters; however, as observed here, stacking and tracking two complementary traits can be facilitated by the distinguishing cross protection to phenoxypropionic acids [from *AAD-1* (*v3*)] or pyridyloxyacetic acids [*AAD-13* (*v1*)].

The subject invention thus includes a transgenic plant (and plant cells) comprising an *AAD-13* gene of the subject invention "stacked" with an *AAD-1* gene of WO 2005/107437

(published November 17, 2005; PCT/US2005/014737 (filed May 2, 2005)). Such *AAD-1* genes include SEQ ID NOS:3, 4, 5, and 12 of that application. These genes encode proteins comprising SEQ ID NOS:9, 10, 11, and 13 of that application. Still further, additional herbicide tolerance genes can be included in multiple "stacks" comprising three or more such genes.

Example 18 – *AAD-13* (v1) Stacked with the *AAD-12* (v1) Trait in Any Crop

Homozygous *AAD-13* (v1) and *AAD-12* (v1) plants (see WO 2007/053482 for the latter) can be crossed and F₁ seed was collected. The F₁ seed from two reciprocal crosses of each gene can be sown and F1 plants treated under the same spray regime as used for the other testing with one of the following treatments: 70, 280, 1120 g ae/ha fluroxypyr (selective for the *AAD-12* (v1) gene); 70, 280, 1120 g ae/ha triclopyr (selective for the *AAD-13* (v1) gene); or 560, 1120, 2240 g ae/ha 2,4-D DMA (to confirm 2,4-D tolerance).

AAD-13 (v1) can be stacked with *AAD-12* (v1), thus increasing the spectrum herbicides that may be applied to the crop of interest (phenoxyacetic acids + triclopyr vs phenoxyacetic acids + fluroxypyr for *AAD-12* and *AAD-13*, respectively). The complementary nature of herbicide cross resistance patterns allows convenient use of these two genes as complementary and stackable field-selectable markers. In crops where tolerance with a single gene may be marginal, one skilled in the art recognizes that one can increase tolerance by stacking a second tolerance gene for the same herbicide. Such can be done using the same gene with the same or different promoters; however, as observed here, stacking and tracking two complementary traits can be facilitated by the distinguishing cross protection to fluroxypyr [from *AAD-13* (v1)] and triclopyr [*AAD-12* (v1)].

The subject invention thus includes a transgenic plant (and plant cells) comprising an *AAD-13* gene of the subject invention "stacked" with an *AAD-12* gene of WO 2007/053482 (published May 10, 2007; PCT/US2006/042133 (filed October 27, 2006)). Such *AAD-12* genes include SEQ ID NOS:1, 3, and 5 of that application. Those genes encode proteins comprising SEQ ID NOS:2 and 4 of that application. Still further, additional herbicide tolerance genes can be included in multiple "stacks" comprising three or more such genes.

Example 19 – AAD-13 (v1) Stacked with AHAS Trait in Any Crop

Imidazolinone herbicide tolerance (*AHAS*, *et al.*) is currently present in a number of crops planted in North America including, but not limited to, corn, rice, and wheat. Additional imidazolinone tolerant crops (*e.g.*, cotton and sugar beet) have been under development but have not been commercially released to date. Many imidazolinone herbicides (*e.g.*, imazamox, imazethapyr, imazaquin, and imazapic) are currently used selectively in various conventional crops. The use of imazethapyr, imazamox, and the non-selective imazapyr has been enabled through imidazolinone tolerance traits like *AHAS et al.* This chemistry class also has significant soil residual activity, thus being able to provide weed control extended beyond the application timing, unlike glyphosate or glufosinate-based systems. However, the spectrum of weeds controlled by imidazolinone herbicides is not as broad as glyphosate (Agrilience, 2005). Additionally, imidazolinone herbicides have a mode of action (inhibition of acetolactate synthase, ALS) to which many weeds have developed resistance (Heap, 2007). By stacking *AAD-13 (v1)* with an imidazolinone tolerance trait, either through conventional breeding or jointly as a novel transformation event, weed control efficacy, flexibility, and ability to manage weed shifts and herbicide resistance development could be improved. As mentioned in previous examples, by transforming crops with *AAD-13 (v1)*, monocot crops will have a higher margin of phenoxy or pyridyloxy auxin safety, and these auxins can be selectively applied in dicot crops. Several scenarios for improved weed control options can be envisioned where *AAD-13 (v1)* and an imidazolinone tolerance trait are stacked in any monocot or dicot crop species:

- a) Imazethapyr can be applied at a standard postemergent application rate of (35 to 280 g ae/ha, preferably 70-140 g ae/ha) for the control of many grass and broadleaf weed species.
 - i) ALS-inhibitor resistant broadleaf weeds like *Amaranthus rudis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album* (among others, Heap, 2005) could be controlled by tank mixing 280-2240 g ae/ha, more preferably 560-1120 g ae/ha, 2,4-D. For fluroxypyr, application rates would typically range from 35-560 g ae/ha, more typically 70-280 ae/ha.
 - ii) Inherently more tolerant broadleaf species to imidazolinone herbicides like *Ipomoea spp.* can also be controlled by tank mixing 280-2240 g

ae/ha, more preferably 560-1120 g ae/ha, 2,4-D. See rates above for
triclopyr or fluroxypyr.

- b) A multiple combination of imazethapyr (35 to 280 g ae/ha, preferably 70-140
g ae/ha) +/- 2,4-D (280-1120 g ae/ha) +/- fluroxypyr (at rates listed above), for
example, could provide more robust, overlapping weed control spectrum.
Additionally, the overlapping spectrum provides an additional mechanism for
the management or delay of herbicide resistant weeds.

One skilled in the art of weed control will recognize that use of any of various
commercial imidazolinone herbicides, phenoxyacetic or pyridyloxyacetic auxin herbicides,
alone or in multiple combinations, is enabled by *AAD-13 (v1)* transformation and stacking
with any imidazolinone tolerance trait either by conventional breeding or genetic engineering.
Specific rates of other herbicides representative of these chemistries can be determined by the
herbicide labels compiled in the CPR (Crop Protection Reference) book or similar
compilation, labels compiled online (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp), or any commercial or
academic crop protection guides such as the Crop Protection Guide from Agrilience (2005).
Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-13 (v1)*, whether used alone, tank
mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 20 – *AAD-13 (v1)* Stacked With Insect Resistance (IR) or Other Input Traits in Any Crop

Insect resistance in crops supplied by a transgenic trait is prevalent in corn and cotton
production in North America and across the globe. Commercial products having combined IR
and HT traits have been developed by multiple seed companies. These include Bt IR traits
(e.g. Bt toxins listed at the website lifesci.sussex.ac.uk, 2006) and any or all of the HTC traits
mentioned above. The value this offering brings is the ability to control multiple pest
problems through genetic means in a single offering. The convenience of this offering will be
restricted if weed control and insect control are accomplished independent of each other.
AAD-13 (v1) alone or stacked with one or more additional HTC traits can be stacked with one
or more additional input traits (e.g., insect resistance, fungal resistance, or stress tolerance, *et
al.*) (isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005) either through conventional breeding or jointly
as a novel transformation event. Benefits include the convenience and flexibility described in
previous examples together with the ability to manage insect pests and/or other agronomic
stresses in addition to the improved weed control offered by *AAD-13* and associated herbicide

110

tolerance. Thus, the subject invention can be used to provide a complete agronomic package of improved crop quality with the ability to flexibly and cost effectively control any number of agronomic issues.

5 Combined traits of IR and HT have application in most agronomic and horticultural/ornamental crops and forestry. The combination of *AAD-13* and its commensurate herbicide tolerance and insect resistance afforded by any of the number of Bt or non-Bt IR genes are can be applied to the crop species listed (but not limited to) in Example 13. One skilled in the art of weed control will recognize that use of any of various commercial herbicides described in Examples 18-20, phenoxyacetic or pyridyloxyacetic
0 auxin herbicides, alone or in multiple combinations, is enabled by *AAD-13 (v1)* transformation and stacking with the corresponding HT trait or IR trait either by conventional breeding or genetic engineering. Specific rates of other herbicides representative of these chemistries can be determined by the herbicide labels compiled in the CPR (Crop Protection Reference) book or similar compilation, labels compiled online (e.g.,
5 cdms.net/manuf/manuf.asp), or any commercial or academic crop protection guides such as the Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-13 (v1)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

7 Example 21 – *AAD-13 (v1)* as an *in vitro* Dicot Selectable Marker

Genetic engineering of plant cell, tissue, organ, and plant or organelle such as plastid starts with the process of inserting genes of interest into plant cells using a suitable delivery method. However, when a gene is delivered to plant cells, only an extremely small percentage of cells integrate the heterogeneous gene into their genome. In order to select
5 those few cells that have incorporated the gene of interest, researchers link a selectable or screenable "marker gene" to the gene of interest (GOI) in the vector. Cells that contain these markers are identified from the whole population of cells/ tissue to which the DNA plasmid vector was delivered. By selecting those cells that express the marker gene, researchers are able to identify those few cells that may have incorporated the GOI into their genome. *AAD-13 (v1)* can function as a selectable marker when used as in Example #24 of patent application WO 2007/053482 (Wright et al.).

Claims

We claim:

1. A transgenic plant cell comprising a polynucleotide that encodes a protein having aryloxyalkanoate dioxygenase activity, wherein a nucleic acid molecule that encodes said protein hybridizes under stringent conditions with the full complement of a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:5, wherein hybridization is conducted at 65° C with 0.2x SSPE.
2. The cell of claim 1 wherein expression of said polynucleotide imparts to said cell an ability to convert a phenoxyacetate auxin herbicide to a non-herbicidal molecule.
3. The cell of claim 1 wherein expression of said polynucleotide imparts to said cell an ability to convert a pyridyloxy auxin herbicide to a non-herbicidal molecule.
4. A transgenic plant comprising a plurality of cells according to claim 1, wherein expression of said polynucleotide renders said plant tolerant to said herbicide.
5. A method of protecting a plant of claim 4 from damage by an aryloxyalkanoate herbicide, said method comprising applying said aryloxyalkanoate herbicide to an area where said plant is grown.
6. The method of claim 5 wherein said transgenic plant cell is a plant cell of a transgenic crop plant growing in a field.
7. The plant cell of claim 1, said plant cell further comprising a second, heterologous gene for herbicide tolerance, said second herbicide tolerance gene being selected from the group consisting of an *AAD-1* gene and an *AAD-12* gene.
8. A method of controlling weeds, said method comprising applying a 2,4-D herbicide to a crop plant and to a weed, said crop plant comprising a plurality of plant cells according to claim 1.

MP2

9. The method of claim 8, wherein said crop plant is a soybean plant.
10. The method of claim 8, wherein said weed is resistant to glyphosate.
11. A method of protecting a crop plant from damage by an aryloxyalkanoate herbicide, said method comprising growing a plant comprising an AAD-13 gene, and applying said herbicide to said plant.
12. The method of claim 11 wherein said herbicide is 2,4-D.
13. The method of claim 8 wherein said plant further comprises a glyphosate resistance gene, and said method further comprises applying glyphosate to said plant and to said weed.
14. The method of claim 13, said plant further comprising a third herbicide resistance gene, and said method further comprising applying a third herbicide to said plant and to said weed.
15. A transgenic plant comprising a heterologous polynucleotide that encodes an enzyme conferring resistance to a pyridyloxy auxin herbicide.
16. The transgenic plant of claim 15, said polynucleotide also conferring resistance to a phenoxy auxin herbicide.
17. The plant of claim 16, said phenoxy auxin herbicide selected from the group consisting of 2,4-D and MCPA.
18. The plant of claim 15, said plant further comprising at least one additional herbicide resistance gene.
19. A plant comprising a polynucleotide that encodes a protein having aryloxyalkanoate dioxygenase activity, wherein a nucleic acid molecule that encodes said

LP 3

protein hybridizes under stringent conditions with the full complement of a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:5.

20. A polynucleotide that encodes a protein having aryloxyalkanoate dioxygenase activity, wherein a nucleic acid molecule that encodes said protein hybridizes under stringent conditions with the full complement of a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:5, wherein said polynucleotide comprises a codon composition that is optimized for expression in a plant.

21. The polynucleotide of claim 20 wherein said protein has at least 85% sequence identity with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4.

22. A method of selecting for a transformed plant cell of claim 21 wherein said method comprises subjecting a plurality of plant cells to transformation with said polynucleotide, then growing said cells in a concentration of a herbicide that permits transformed cells that express said polynucleotide to grow while killing or inhibiting the growth of nontransformed cells, wherein said herbicide is selected from the group consisting of a phenoxy auxin and a pyridyloxy auxin herbicide.

23. The method of claim 22 wherein said cells are cells of a plant and said method is used for selecting a transformed plant.

24. A method of controlling at least one weed in a field, said method comprising planting in said field seed of at least one transgenic plant, said plant comprising
a heterologous polynucleotide that encodes an enzyme conferring resistance to a pyridyloxy auxin herbicide, and
a second heterologous polynucleotide encodes an enzyme conferring resistance to at least one other herbicide;
said method further comprising applying to at least a portion of said field a first herbicide selected from the group consisting of a pyridyloxy auxin herbicide and a phenoxy auxin herbicide; and applying said at least one other herbicide to said at least a portion of said field.

25. The method of claim 24 wherein said herbicides are applied sequentially or concurrently.

26. The method of claim 24 wherein said first herbicide is a phenoxy auxin herbicide.

27. The method of claim 24 wherein said at least one other herbicide is selected from the group consisting of acetochlor, acifluorfen, alloxydim, amidosulfuron, aminopyralid, atrazine, beflubutamid, bispyribac, butafenacil, cafenstrole, carfentrazone, chlorimuron, chlorotoluron, cinidon-ethyl, clethodim, clodinafop, clomazone, cloproxydim, clopyralid, cloransulam, cyanazine, cyclosulfamuron, cycloxydim, cyhalofop, daimuron, dicamba, diclofop, diclosulam, diflufenican, dimethenamid, diquat, dithiopyr, diuron, ethalfluralin, fenoxaprop, flazasulfuron, florasulam, fluazifop, flucarbazone, flufenacet, flufenican, flufenpyr, flumetsulam, flumiclorac, flumioxazin, fluroxypyr, fluthiacet, fomesafen, foramsulfuron, glufosinate, glyphosate, halosafen, halosulfuron, haloxyfop, imazamethabenz, imazamox, imazapic, imazapyr, imazaquin, imazethapyr, imazosulfuron, iodosulfuron, ioxynil, isoxaben, isoxaflutole, lactofen, linuron, mefenacet, mefluidide, mesosulfuron, mesotrione, metamifop, metazachlor, metosulam, metribuzin, MSMA, napropamide, nicosulfuron, norflurazon, oryzalin, oxadiazon, oxyfluorfen, paraquat, pebulate, pendimethalin, penoxsulam, picloram, picolinafen, pinoxaden, primisulfuron, profoxydim, propanil, pyraflufen, pyrazosulfuron, pyribenzoxim, pyriminobac, pyriothiac, pyroxasulfone, pyroxsulam, quinclorac, quinmerac, quizalofop, rimsulfuron, sethoxydim, simazine, sulcotrione, sulfentrazone, sulfometuron, tefuryltrione, tembotrione, tepraloxydim, terbacil, thiazopyr, thidiazuron, thiencarbazone, thifensulfuron, thiobencarb, topramezone, tralkoxydim, triasulfuron, tribenuron, triclopyr, trifloxysulfuron, trifluralin, triflusulfuron, and tritosulfuron.

28. A method of assaying a protein for its ability to cleave a pyridyloxyalkanoate herbicide, said method comprising providing a sample comprising said protein and a pyridyloxy auxin herbicide, and assaying said sample for presence of a chloropyridinol.

115

29. A method of assaying a protein for aryloxyalkanoate dioxygenase activity wherein said method comprises providing a sample comprising said protein and 2-(2-chloro,4-nitrophenoxy) propionate and/or acetate, and assaying said sample for presence of a 2-chloro,4-nitrophenol.

30. A heritable expression cassette comprising a nucleic acid molecule encoding a protein that enzymatically degrades at least one herbicide selected from the group consisting of a phenoxy auxin and a pyridyloxy auxin, wherein said nucleic acid molecule hybridizes under stringent conditions with the full complement of a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:5.

31. The expression cassette of claim 30 wherein said promoter is a plant promoter.

32. The expression cassette of claim 30 comprising a promoter selected from a cassava vein mosaic virus promoter, CaMV 35S promoter, Figwort Mosaic Virus promoter, rice actin promoter, phaseolin promoter, *Arabidopsis thaliana* Ubiquitin 10 promoter, maize ubiquitin promoter, *Arabidopsis thaliana* Act2 promoter, *Arabidopsis thaliana* Ubiquitin 11 promoter, and *Arabidopsis thaliana* Ubiquitin 3 promoter.

33. The method of claim 24 wherein said plant is resistant to an herbicide formulation comprising glyphosate.

34. A method of controlling weeds in a field, wherein said method comprises applying a first herbicide to said field and planting a seed in said field within 14 days of applying said first herbicide, wherein said seed comprises a cell of claim 1, and wherein said first herbicide is selected from the group consisting of a phenoxy auxin and a pyridyloxy auxin.

35. The method of claim 34 wherein said first herbicide is an acid, an inorganic salt, an organic salt, or an ester.

126

36. The method of claim 34 wherein said seed comprises a second gene that renders said plant resistant to a second herbicide, and said method further comprises applying said second herbicide to said field prior to said planting.

37. The method of claim 36 wherein said second herbicide is selected from the group consisting of glyphosate, gramoxone, and glufosinate.

38. A method of detecting whether a plant comprises a polynucleotide of claim 20 wherein said method comprises collecting a sample from said plant and assaying said sample for the presence of said polynucleotide.

39. The method of claim 38 wherein said method comprises assaying said sample for the presence of a protein encoded by said polynucleotide.

40. The method of 38 wherein said method comprises using a PCR primer or probe to detect for the presence of said polynucleotide.

41. The method of 39 wherein said method comprises using an antibody to detect for the presence of said protein.

42. The plant of claim 15 wherein said plant further comprises an insect-resistance gene derived from an organism selected from the group consisting of *Bacillus thuringiensis*, *Photorhabdus*, and *Xenorhabdus*.

43. The plant of claim 15 wherein said plant further comprises a gene for an agronomic trait selected from the group consisting of fungal resistance, stress tolerance, increased yield, improved oil profile, improved fiber quality, viral resistance, delayed ripening, cold tolerance, and salt tolerance.

44. A method of controlling at least one weed in a field, said method comprising growing at least one transgenic plant of claim 15 in said field, and applying a pyridyloxy auxin herbicide to at least a portion of said field.

117

45. A method of controlling at least one weed in a field, said method comprising growing at least one plant of claim 16 in said field, and applying a phenoxy auxin herbicide to at least a portion of said field.

46. The method of claim 44, further comprising applying a phenoxy auxin herbicide to at least a portion of said field.

47. The method of claim 44, said pyridyloxy auxin is fluroxypyr.

48. The method of claim 45, said phenoxy auxin herbicide selected from the group consisting of 2,4-D and MCPA.

49. The method of claim 45 wherein said plant is resistant to a herbicide selected from the group consisting of glyphosate, glufosinate, imazethapyr, chlorsulfuron, dicamba, mesotrione, isoxaflutole, and butafenacil.

50. The method of claim 45 wherein said herbicide is an achiral phenoxy auxin.

51. The method of claim 24 wherein said plant is a monocot.

52. The method of claim 51 wherein said monocot is selected from the group consisting of corn, rice, wheat, barley, rye, warm and cool-season turf grass, oats, sorghum, and pasture grasses.

53. The method of claim 24 wherein said first herbicide is a phenoxy auxin and said plant is a dicot.

54. The method of claim 53 wherein said dicot is selected from the group consisting of cotton, tobacco, canola, and soybean.

118

55. A method of conferring herbicide resistance to a crop wherein said method comprises introducing into at least one plant cell of said crop a polynucleotide encoding an enzyme capable of using a pyridyloxy auxin herbicide and a phenoxy auxin herbicide as a substrate.

56. A method of controlling glyphosate-resistant, naturally glyphosate tolerant, and/or naturally glufosinate tolerant weeds in a field of glyphosate and/or glufosinate tolerant crop plants, wherein said plants comprise a polynucleotide of claim 13, and said method comprises applying an aryloxyalkanoate herbicide to at least a portion of said field.

57. The method of claim 56 wherein said herbicide is a phenoxy auxin.

58. The method of claim 57 wherein said phenoxy auxin is 2,4-D.

59. A method of controlling weeds that are resistant to an ALS-inhibiting herbicide in a field of crop plants that comprise a polynucleotide of claim 20, said method comprises applying an aryloxyalkanoate herbicide to at least a portion of said field.

60. The cell of claim 1 wherein said plant cell is selected from the group consisting of dicotyledonous cells and monocotyledonous cells.

61. The cell of claim 60 wherein said plant cell is dicotyledonous and selected from the group consisting of a cotton cell, a tobacco cell, a canola cell, a soybean cell, and an *Arabidopsis* cell.

62. The cell of claim 60 wherein said plant cell is a monocotyledonous cell selected from the group consisting of a rice cell and a maize cell.

63. The cell of claim 61 wherein said pyridyloxy auxin herbicide is selected from the group consisting of fluroxypyr.

64. The plant of claim 4 wherein expression of said polynucleotide renders said plant resistant to both a phenoxyacetate auxin herbicide and a pyridyloxy auxin herbicide.

65. The method of claim 8 wherein said method comprises applying a second herbicide.

66. The method of claim 22 wherein said 2,4-D herbicide and said second herbicide are applied sequentially.

67. The method of claim 22 wherein said first herbicide and said second herbicide are applied concurrently.

68. The method of claim 8 wherein said plant is resistant to glyphosate.

69. The method of claim 24 wherein said second polynucleotide is a modified EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) or *GAT*.

70. The method of claim 24 wherein said first herbicide is a phenoxy auxin and said second herbicide is selected from the group consisting of glyphosate and glufosinate.

71. The method of claim 70 wherein said phenoxy auxin is 2,4-D and said second herbicide is glyphosate.

72. The method of claim 24 wherein said method further comprises applying a third herbicide.

73. A polynucleotide optimized for expression in a plant wherein said polynucleotide encodes a protein having aryloxyalkanoate dioxygenase activity, wherein a nucleic acid molecule that encodes said protein hybridizes under stringent conditions with the full complement of a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:5.

74. The polynucleotide of claim 44 wherein said polynucleotide is optimized for expression in a dicotyledonous plant or a monocotyledonous plant.

75. An isolated polynucleotide that encodes a protein that enzymatically degrades a herbicide selected from the group consisting of a phenoxy auxin and a pyridyloxy auxin, wherein a nucleic acid molecule that encodes said protein hybridizes under stringent conditions with the full complement of a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:5, wherein said polynucleotide is operably linked to a promoter that is functional in a plant cell.

76. The polynucleotide of claim 75 wherein said promoter is a plant promoter.

77. The polynucleotide of claim 76 wherein said promoter is a cassava vein mosaic virus promoter.

78. The method of claim 22 wherein said polynucleotide is used as a selectable marker.

79. A seed comprising a plant cell of claim 1.

80. A plant grown from the seed of claim 79.

81. A regenerable part, progeny, or asexual propagate of the plant of claim 4.

82. The method of claim 8 wherein said method is used to treat or prevent herbicide-resistant weeds.

83. The plant of claim 4 wherein said plant further comprises an insect-resistance gene derived from an organism selected from the group consisting of *Bacillus thuringiensis*, *Photorhabdus*, and *Xenorhabdus*.

84. The plant of claim 4 wherein said plant further comprises a gene for an agronomic trait selected from the group consisting of fungal resistance, stress tolerance, increased yield, improved oil profile, improved fiber quality, viral resistance, delayed ripening, cold tolerance, and salt tolerance.

85. A method of controlling glyphosate-resistant weeds in a field of glyphosate tolerant crop plants, wherein said plants comprise a polynucleotide of claim 20, and said method comprises applying an aryloxyalkanoate herbicide to at least a portion of said field.

86. The method of claim 85 wherein said herbicide is a phenoxy auxin.

87. The method of claim 25 wherein said herbicides are applied from a tank mix.

88. The method of claim 10 wherein said at least one of said weeds comprises at least one glyphosate resistant volunteer plant of a different species than said transgenic crop.

89. A method of selecting for at least one transgenic plant cell of claim 1 wherein said method comprises applying an aryloxyalkanoate herbicide on and/or about said transgenic plant cells and to lacking plant cell that lack said polynucleotide, and allowing said transgenic plant cell and said lacking plant cells to grow.

90. The method of claim 89 wherein said transgenic plant cell is a plant cell of a transgenic crop plant growing in a field, and said lacking cells are cells of a weed growing in said field.

91. The method of claim 89 wherein said transgenic plant cell is a plant cell transformed with said polynucleotide, and said lacking cells are non-transformants, and all of said cells are grown on tissue culture medium.

92. A method of controlling at least one weed in a field, said method comprising growing at least one transgenic plant of claim 4 in said field, and applying a first herbicide to at least a portion of said field, said first herbicide being selected from the group consisting of

2,4-D and fluroxypyr, said plant further comprising a second heterologous gene imparting said plant with

resistance to an inhibitor of an HPPD (4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase) enzyme

and/or

resistance to a protoporphyrinogen oxidase IX (PPO)-inhibiting herbicide,

and applying an HPPD inhibitor and/or a PPO inhibitor to said field before, after, and/or concurrent with said first herbicide.

93. A method of controlling at least one weed in a field, said method comprising growing at least one transgenic plant of claim 4 in said field, and applying a first herbicide to at least a portion of said field, said first herbicide being selected from the group consisting of 2,4-D and fluroxypyr, and applying a second herbicide to said field, wherein said second herbicide is used selectively with said specific plant where a second herbicide tolerance trait is not needed, and wherein said second herbicide is applied before, after, and/or concurrent with said first herbicide.

94. The transgenic plant cell of claim 1, wherein said protein has at least 85% sequence identity with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4.

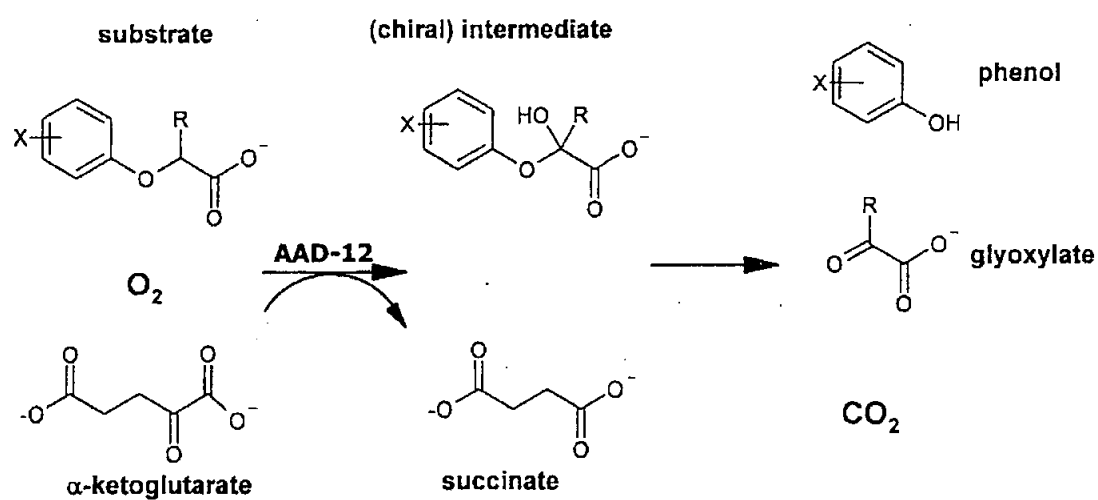
95. The transgenic plant cell of claim 1, wherein said protein has at least 95% sequence identity with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4.

96. The polynucleotide of claim 20 wherein said protein has at least 95% sequence identity with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4.

97. A plant of either of claims 4 or 15, wherein said plant comprises a biological insecticide derived from a source selected from the group consisting of *Bacillus popilliae*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis*

subsp. *tenebrionis*, *Beauveria bassiana*, *Cydia pomonella* granulosus virus, Douglas fir tussock moth NPV, gypsy moth NPV, *Helicoverpa zea* NPV, Indian meal moth granulosus virus, *Metarhizium anisopliae*, *Nosema locustae*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *P. lilacinus*, *Photorhabdus luminescens*, *Spodoptera exigua* NPV, trypsin modulating oostatic factor, *Xenorhabdus nematophilus*, and *X. bovienii*.

98. A plant of either of claims 4 or 15, wherein said plant comprises a plant incorporated protectant insecticide selected from the group consisting of Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3A, mir Cry3A, Cry3Bb1, Cry34, Cry35, and VIP3A.



■ Addition of O_2 is *stereospecific*

■ Breakdown of intermediate to phenol + glyoxylate is spontaneous

FIGURE 1

		10	20	30	40	50	60
aad 13	1	-----	MSPAFDIAEDATFGAVVTCVKLEAD-	DDAGWLDLQAAWLEYAELLVEPDQ			
aad 12	1	-----	MQTTLOITPTGATLGATVTCVHLAT-	DDAGFAALHAAWLOHALLIEPGQ			
aad 1	1		MHAALSPLSQRFERLAVQRTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNETLDAFHTYQVITYFPQG				
aad 2	1	-----	MTTATROIQTHFVGQVSGLDLTKPTPGEAREVESAMDKYAVLVFHDQ				
tfdA	1	-----	MSVYVANEIHLPLFAAGVEDIDLREALGSTEVRETERLMDEKSVLEVERGQ				
tauD	1	-----	MSERESTTEGPGYIGAOTSGADLTRPLSDNQFEQLYHAVLRHOVVFLRDQ				
		70	80	90	100	110	120
aad 13	50	HEITRECOITAFARREGPLE-----	FEMAAISNVRPDGSERVES--DNDD				
aad 12	50	HLSNDOOITFAKREGATER-----	IGGGDIVATISNVKADGTVRQHSAPAEWDD				
aad 1	61	ATTNEOHLAESRRFGPVDP-----	VPLKSTEGYPEVQMIRREA-----				
aad 2	49	DITDEQMAFALNFGQREDARGGTVTKEKDYLQ-	SGINDVSNLGKDGKPLAKD----	SR			
tfdA	49	PLSQDOOITAEARNEGPLEG--	GFIKVNQRPSRFKYAELADISNVSLDGKVAQRD----	AR			
tauD	51	ATTPOQORALACREFGELHI-----	HPVYPHAECYDEIIVLDTHN-----				
		130	140	150	160	170	180
aad 13	91	MMKILKGNMGWHAESTYMPVQAKGAVFSAEVVPSVGGQTGFADMRAAYDALDEDLKARVE					
aad 12	97	MMKVIVGNMAWHAESTYMPVMAQGAVFSAEVVPAVGGRTCFADMRAAYDALDEATRALVH					
aad 1	100	NESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIDVPEHGGDTGFLSMYTAWETLSPTMQATTIE					
aad 2	104	THLFNLGNCLWHSDSSEFPIPAKFSLLSARVWNPTGGNTFADMRAAYDALDDETKAEIE					
tfdA	103	EVVGNFANQLWHSSESFQQAARYSMLSAVVVPPSGGDTFECDMRAAYDALPRDLQSELE					
tauD	90	DNPP--DNNDWHTDVTETETPPAGATLAKELEPSTGGDTLWTSGLAAYEALSVPFRQLLS					
		190	200	210	220	230	240
aad 13	151	THQARHSLHYSSQ---KLGHQTKAADGEYSGYGLHDGVPVPRPLVKIHHPETGRKSTLLIGR					
aad 12	157	QRSARHSLVYSQS---KLGHVQQAGS-AYIGYGMDDTATPERPLVKVHPETGRPSLLIGR					
aad 1	160	GINVVHSATRVFGSLYQAQNRFSNTSVKVMVDVAGDRETVHPVTVTHPGSGRKGUYVNO					
aad 2	164	DLVCEHSLMYSRG---SLGFT-----EYTDEEKQMFKPVQREIVRTHRVHRKSLYESS					
tfdA	163	GLRAEHYALNSRF---LLGDT-----DYSEAQRNAMPPVNWPLVRTHAGSGRKFLFIGA					
tauD	148	GLRAEHDFRKSPF---EYKYRKTEEEHQRWREAVAKNPPLLHPVVVTRTHPVSGKQALFVNE					
		250	260	270	280	290	300
aad 13	207	-HAHAIPGLEPAESERITLOOTIDFACOPPRIYHHDWAPGDAVLWQNRCLLHQATPWDMTQ					
aad 12	212	-HAHAIPGMDAAESERFLEGLVDWACQAPRVHAHOWAAGBVVVWQNRCLLHRAEPWDFKL					
aad 1	220	VYCQRTGEMTDAESKPILQFLYEATRFDFTCRVRWKKDOVTVWQNLCTMHRVAVPDYAGK					
aad 2	214	-HAGKLASMSVPEGRLLLRDLNEHTQPEFVYVHKWKLHDLVMWQNRQTMHRVRRYDQSQ					
tfdA	213	-HASHVEGLPVAEGRMILAELEHATOREFVYRHVWNVGDLVMWQNRQNLHGRYDISA					
tauD	205	GFTRIVDVSEKSEALLSEFFAHITKPEFQVRWRWQPNDAIWDNRVTOHYANADYLPQ					
		310	320				
aad 13	267	KRIMWHSRIAGDPASETALAH-					
aad 12	272	PRVMWHSRIACRPETEGAALV-					
aad 1	280	FRYITRTTVGGVRPAR-----					
aad 2	274	PRDMRRATVAGTEPTVQQAAE					
tfdA	273	RRELRATTLLDDAVV-----					
tauD	265	RRIMHRATTLLGDKPFYRAG---					

FIGURE 2

Coupled enzymatic assay for the detection of AAD-13 substrates.

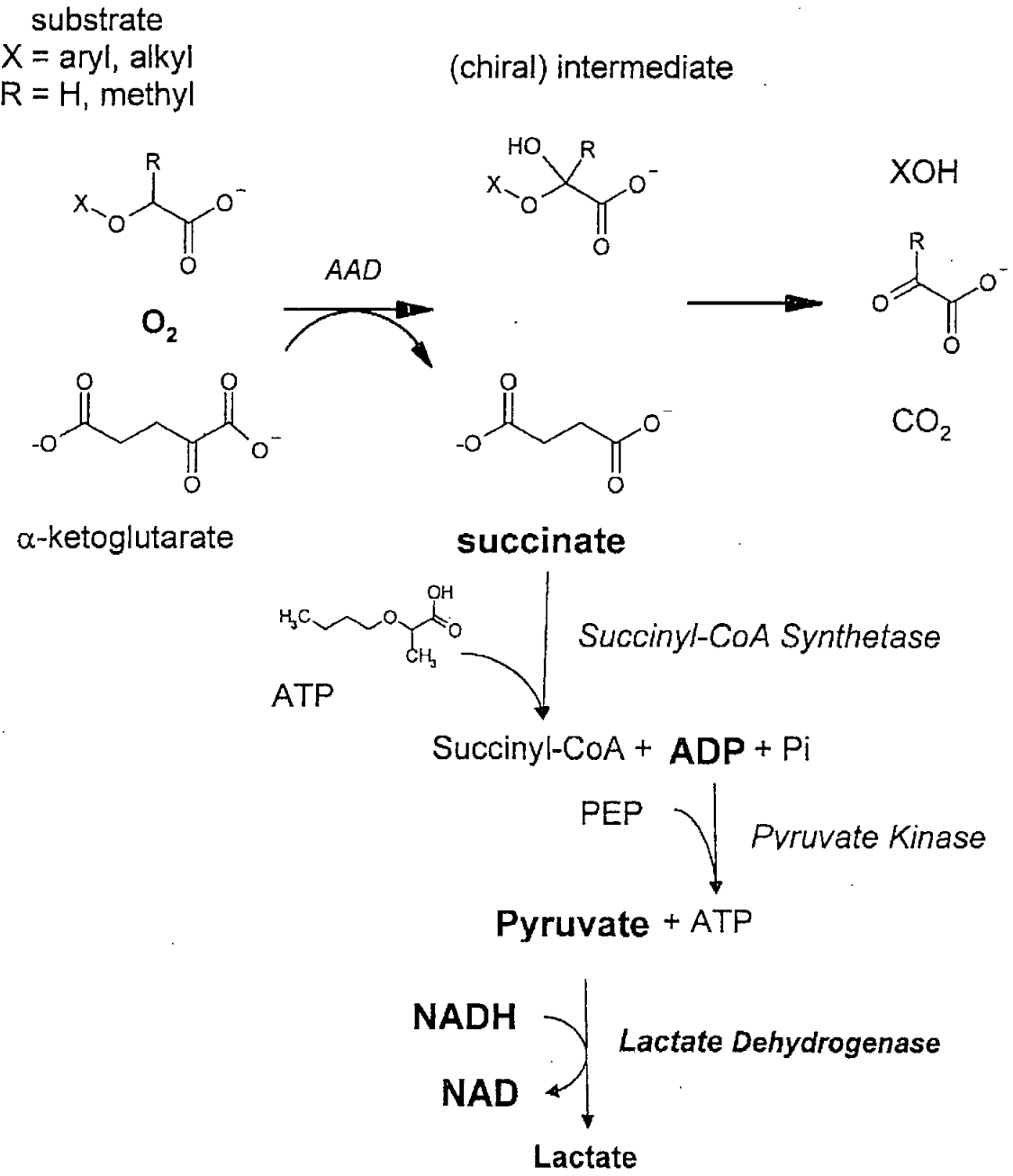


FIGURE 3

SEQUENCE LISTING

<110> Lira, Justin M.
 Snodderley, Erika Megan
 Robinson, Andrew E.
 Wright, Terry R.
 Merlo, Donald J.

<120> Novel Herbicide Resistance Genes

<130> DAS-142XC1 PCT

<140> PCT/US08/63212

<141> 2008-05-09

<150> 60/928,303

<151> 2007-05-09

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 864

<212> DNA

<213> Sphingobium herbicidovorans

<400> 1

```

atgtcaccgc ccttcgacat cgccccgctc gacgccacgt tcggcgccgt cgtcaccggc      60
gtgaagctcg ccgatctcga tgatgccgga tggctcgacc tgcaggctgc ctggctcgag      120
tacgcactcc tcgttttccc cgatcagcat ctacgcgcgc agcagcagat cgcctttgcc      180
cgtcgcttcg ggccactcga gttcgagatg gccgcgatca gcaacgtgcg gcccgacggc      240
agcctgcggg tcgagagcga caacgacgac atgatgaaga tcctgaaggg caacatgggc      300
tggcatgccg acagcaccta catgccggtc caggccaagg gcgcggtggt cagtgcggaa      360
gtgggttccta gcgtcggcgg ccagaccggc ttgcgcgaca tgcgcgcggc ctacgacgcg      420
ctcgacgagg atctgaaggc gcgcgtcgag acgctgcagg ccgggcactc gctgcattac      480
agccagtcga agctcggcca ccagaccaag gcggccgacg gtgaatatag cggctacggg      540
ctgcatgacg ggccggtgcc gctgcggccg ctggtgaaga tccatcccga gaccggccgc      600
aagtcgctgc tgatcggccg ccacgcccac gccattcccg gcttggagcc agccgagtcc      660
gaacgcttgc tgcagcagct gatcgacttc gcctgccagc cgcgcggaat ctatcatcac      720
gactggggcg cgggcgacgc cgtgctgtgg gacaatcgtt gcctgctgca ccaggcgacg      780
ccgtggggaca tgaccagaaa gcgcatcatg tggcacagcc gcatcgccgg cgaccgggcc      840
agcgagaccg cgctggcgca ttga                                     864

```

<210> 2

<211> 287

<212> PRT

<213> Sphingobium herbicidovorans

<400> 2

Met Ser Pro Ala Phe Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ala Thr Phe Gly Ala
1 5 10 15

Val Val Thr Gly Val Lys Leu Ala Asp Leu Asp Asp Ala Gly Trp Leu
20 25 30

Asp Leu Gln Ala Ala Trp Leu Glu Tyr Ala Leu Leu Val Phe Pro Asp
35 40 45

Gln His Leu Thr Arg Glu Gln Gln Ile Ala Phe Ala Arg Arg Phe Gly
50 55 60

Pro Leu Glu Phe Glu Met Ala Ala Ile Ser Asn Val Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ser Leu Arg Val Glu Ser Asp Asn Asp Asp Met Met Lys Ile Leu Lys
85 90 95

Gly Asn Met Gly Trp His Ala Asp Ser Thr Tyr Met Pro Val Gln Ala
100 105 110

Lys Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val Pro Ser Val Gly Gly Gln
115 120 125

Thr Gly Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Glu Asp
130 135 140

Leu Lys Ala Arg Val Glu Thr Leu Gln Ala Arg His Ser Leu His Tyr
145 150 155 160

Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Gln Thr Lys Ala Ala Asp Gly Glu Tyr
165 170 175

Ser Gly Tyr Gly Leu His Asp Gly Pro Val Pro Leu Arg Pro Leu Val
180 185 190

Lys Ile His Pro Glu Thr Gly Arg Lys Ser Leu Leu Ile Gly Arg His
195 200 205

Ala His Ala Ile Pro Gly Leu Glu Pro Ala Glu Ser Glu Arg Leu Leu
210 215 220

Gln Gln Leu Ile Asp Phe Ala Cys Gln Pro Pro Arg Ile Tyr His His
225 230 235 240

Asp Trp Ala Pro Gly Asp Ala Val Leu Trp Asp Asn Arg Cys Leu Leu
245 250 255

His Gln Ala Thr Pro Trp Asp Met Thr Gln Lys Arg Ile Met Trp His

260

265

270

Ser Arg Ile Ala Gly Asp Pro Ala Ser Glu Thr Ala Leu Ala His
 275 280 285

<210> 3
 <211> 867
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Plant optimized (v1)

<400> 3
 atggcttcac ctgccttcga cattgcccc cattgatgcca catttggggc agttgtcact 60
 ggggtcaagt tggctgatct tgatgacgct ggatgggttg acctccaagc tgcttggtt 120
 gaatatgccc tccttgtctt ccttgaccag cacttgacaa ggaacagca aatagctttc 180
 gctcgcagat tcggaccact tgagttcgag atggcagcca tctccaatgt tagaccgat 240
 ggcagcttga gggttgagtc tgacaatgat gacatgatga agatcctcaa aggcaacatg 300
 ggatggcacg ctgacagcac ctacatgcca gtgcaagcaa aggggtgcagt gttctcagct 360
 gaagtgggttc cctctgtggg tggccagact gggtttgtgtg acatgagagc tgcctatgat 420
 gcattgatg aagacttgaa ggctcgtgtc gagacattgc aagcccgta ctcctccat 480
 tactcccaga gcaagctcgg acaccagacc aaggctgcag atggtgagta ctctggttat 540
 ggcctccatg atgggcctgt tcccttgagg ccacttgtga agatccatcc agagactggc 600
 agaaaatccc ttctcatagg cgtcatgcc catgccattc ctggattgga gccagctgag 660
 tcagaaaggt tgctccagca actcattgat ttgtctgtgc aacccctag gatctaccac 720
 catgactggg ctctggaga tgcagtgtc tgggacaacc gctgcctcct tcaccaagcc 780
 actccttggg acatgacca gaaacgcac atgtggcaca gccgcattgc tggtagacca 840
 gcacttgaga cgcacttgc acattga 867

<210> 4
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Plant optimized (v1)

<400> 4
 Met Ala Ser Pro Ala Phe Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ala Thr Phe Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Val Thr Gly Val Lys Leu Ala Asp Leu Asp Asp Ala Gly Trp
 20 25 30
 Leu Asp Leu Gln Ala Ala Trp Leu Glu Tyr Ala Leu Leu Val Phe Pro

35

40

45

Asp Gln His Leu Thr Arg Glu Gln Gln Ile Ala Phe Ala Arg Arg Phe
50 55 60

Gly Pro Leu Glu Phe Glu Met Ala Ala Ile Ser Asn Val Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ser Leu Arg Val Glu Ser Asp Asn Asp Asp Met Met Lys Ile Leu
85 90 95

Lys Gly Asn Met Gly Trp His Ala Asp Ser Thr Tyr Met Pro Val Gln
100 105 110

Ala Lys Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val Pro Ser Val Gly Gly
115 120 125

Gln Thr Gly Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Glu
130 135 140

Asp Leu Lys Ala Arg Val Glu Thr Leu Gln Ala Arg His Ser Leu His
145 150 155 160

Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Gln Thr Lys Ala Ala Asp Gly Glu
165 170 175

Tyr Ser Gly Tyr Gly Leu His Asp Gly Pro Val Pro Leu Arg Pro Leu
180 185 190

Val Lys Ile His Pro Glu Thr Gly Arg Lys Ser Leu Leu Ile Gly Arg
195 200 205

His Ala His Ala Ile Pro Gly Leu Glu Pro Ala Glu Ser Glu Arg Leu
210 215 220

Leu Gln Gln Leu Ile Asp Phe Ala Cys Gln Pro Pro Arg Ile Tyr His
225 230 235 240

His Asp Trp Ala Pro Gly Asp Ala Val Leu Trp Asp Asn Arg Cys Leu
245 250 255

Leu His Gln Ala Thr Pro Trp Asp Met Thr Gln Lys Arg Ile Met Trp
260 265 270

His Ser Arg Ile Ala Gly Asp Pro Ala Ser Glu Thr Ala Leu Ala His
275 280 285

<210> 5
<211> 867
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> E. coli optimized (v2)

<400> 5
atggcgagcc cggcggttcga cattgcgcca ctggatgcta cctttggcgc agttgtaact 60
ggcgtaaaac tggcggatct ggatgacgct ggctggctgg acctgcaggc tgcgtggctg 120
gaatatgcac tgctgggtatt cccggaccag cacctgaccc gtgaacagca gatcgctttc 180
gcacgccgct tcgggtccact ggagttcgaa atggcagcga tctccaacgt tcgtccggat 240
ggcagcctgc gtgttgaatc tgacaacgat gacatgatga aaatcctgaa aggcaacatg 300
ggttggcacg ctgactctac ctacatgcca gttcaggcaa aggggtgcagt gttcagcgct 360
gaagtggttc cgtctgtggg tggccagact ggttttgcgg acatgcgcgc tgcttatgat 420
gcactggatg aagacctgaa agctcgtgtt gaaaccctgc aagcgcgtca ctccctgcat 480
tactcccagt ccaagctggg tcaccagacc aaagctgcgg atggtgagta ctctggttac 540
ggcctgcatg atggtccggt tccgctgcgt ccgctggtga aaatccatcc ggaaactggc 600
cgcaaattccc tgctgatcgg ccgtcatgcg cacgcgattc cgggcctgga accggctgag 660
tctgaacgtc tgctgcaaca gctgattgat tttgcttgtc agccgccgcg tatctaccac 720
cacgactggg cgccgggtga tgcagtgtg tgggacaacc gctgcctgct gcaccaagcg 780
actccgtggg acatgaccca gaaacgcata atgtggcaca gccgcattgc gggtgacccg 840
gcattctgaga ccgcactggc aactaa 867

<210> 6
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AAD-13 PTU primer

<400> 6
Ala Thr Gly Gly Cys Thr Cys Ala Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys
1 5 10 15
Thr Cys Ala Gly Cys Cys
20

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AAD-13 PTU primer

<400> 7
cgggcaggcc taactccacc aa 22

GENES NOVEDOSOS CON RESISTENCIA A HERBICIDAS

Antecedentes de la Invención

5 Las malezas pueden agotar rápidamente el suelo de nutrientes valiosos necesarios para los cultivos y otras plantas deseables. Actualmente existen muchos tipos diferentes de herbicidas utilizados para el control de malezas. Un ejemplo de un herbicida popular es el glifosato.

10 Se han desarrollado cultivos tales como el maíz, la soya, canola, algodón, remolacha azucarera, trigo, césped, y arroz, que son resistentes al glifosato. Así, los campos con soya resistente al glifosato que crecen activamente, por ejemplo, se pueden rosear para controlar plagas sin dañar significativamente las plantas de soya.

15 Con la introducción de cultivos tolerantes al glifosato contruidos con ingeniería genética (GTC) a mediados de la década de 1990, se les dio a los agricultores una herramienta simple, conveniente, flexible, y económica para controlar un amplio espectro de malezas de hoja ancha y gramínea sin paralelo en la agricultura. Por consiguiente, los procedimientos para adoptar el GTC son
20 rápidos y en muchos casos abandonan muchas de las prácticas agronómicas mejor aceptadas tal como la rotación de cultivos, la rotación del modo de acción del herbicida, la mezcla de tanque, la incorporación del control de malezas con químicos y en forma mecánica. Actualmente están disponibles en los Estados
25 Unidos y en cualquier parte en el hemisferio occidental la soya, algodón, maíz y canola, tolerantes al glifosato. La alfalfa es el primer GTC perene introducido, adicionalmente la oportunidad del uso repetido del glifosato en el mismo cultivo y

en campos repetidamente durante un periodo de años. Se preparan más GTC (por ejemplo, trigo, arroz, remolacha azucarera, césped, etc.) para introducción pendiente de aceptación global en el mercado. Muchas otras especies resistentes al glifosato están en etapas de desarrollo a etapas experimentales (por ejemplo, caña de azúcar, girasol, remolacha, guisantes, zanahoria, cohombro, lechuga, cebolla, fresa, tomate y tabaco; especies forestales como y estoraque; y especies hortícolas similares a caléndula, petunia, y begonias; ver sitio red "isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005"). Adicionalmente, el costo del glifosato ha caído dramáticamente en años recientes al punto en que pocos programas de control de plagas convencionales pueden competir efectivamente en precio y desempeño con los sistemas GTC glifosato.

El glifosato se ha utilizado exitosamente en áreas quemadas y otras áreas de no cultivo para control de la vegetación total durante más de 15 años. En muchos casos, como con los GTC, el glifosato se ha utilizado 1-3 veces por año durante 3, 5, 10, hasta 15 años en serie. Estas circunstancias han conducido a una dependencia excesiva del glifosato y la tecnología GTC y han colocado una pesada presión de selección sobre especies de maleza nativas para las plantas que naturalmente son más tolerantes al glifosato o que han desarrollado un mecanismo para resistir la actividad de herbicida del glifosato.

El uso extensivo de programas de control de maleza de solo glifosato es el resultante en la selección de malezas resistentes al glifosato, y es la selección para la propagación de especies de malezas que son inherentemente más tolerantes al glifosato que la mayoría de especies objetivo (es decir, cambios de maleza). (Powles y Preston, 2006, Ng et al, 2003; Simarmata et al, 2003; Lorraine-Colwill et al, 2003; Sfiligoj, 2004; Miller et al, 2003; Heap, 2005; Murphy et al,

2002; Martin et al, 2002.). Aunque el glifosato se ha utilizado ampliamente globalmente durante más de 15 años, solo se ha reportado un manejo de malezas que han desarrollado resistencia al glifosato (Heap, 2005); sin embargo, se han identificado la mayoría de estas en los pasados cinco años. Las malezas
5 resistentes incluyen especies gramíneas y de hoja ancha. *Lolium rigidum*, *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica*, *Sorgo halepense*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Conyza canadensis*, *Conyza bonariensis*, *Plantago lanceolata*, *Amaranthus palmerii*, y *Amaranthus rudis*. Adicionalmente, las malezas que no han sido previamente un problema agronómico antes del amplio uso del GTC ahora llegan a ser más
10 prevalentes y difíciles de controlar en el contexto del GTC, que comprende >80% de las áreas de algodón y soya de los Estados Unidos y >20% de las áreas de maíz de los Estados Unidos (Gianessi, 2005). Estos cambios de maleza ocurren predominantemente con malezas de hoja ancha difíciles de controlar (pero no exclusivamente). Algunos ejemplos de incluyen las especies *Ipomoea*,
15 *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Taraxacum*, y *Commelina species*.

En áreas en donde los cultivadores se encuentran con malezas resistentes al glifosato o un cambio a más especies de malezas de difícil control, los cultivadores pueden compensar la debilidad del glifosato al mezclar en tanques o
20 alternar con otros herbicidas que controlarán las pérdidas de malezas. Un socio de mezcla de tanque popular y eficaz para controlar los escapes de hoja ancha en muchos casos ha sido el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). El 2,4-D se ha utilizado agronómicamente y en situaciones de no cultivo para el control de malezas de hoja ancha, de amplio espectro durante más de 60 años. Se han
25 reportado casos individuales de más especies tolerantes, pero el 2,4-D permanece como uno de los herbicidas más ampliamente utilizados en el mundo. Una limitación para el uso adicional del 2,4-D es que su selectividad en cultivos de

dicotiledóneas como la soya o el algodón es muy pobre, y por lo tanto el 2,4-D no se utiliza típicamente en cultivos de dicotiledóneas sensibles (y generalmente ni cerca). Adicionalmente, el uso del 2,4-D en cultivos de gramíneas es casi limitado por la naturaleza del daño del cultivo que puede ocurrir. El 2,4-D en combinación con el glifosato se ha utilizado para proporcionar un tratamiento para quemadura más robusto antes de plantar soya y algodón. Sin embargo, debido a la sensibilidad de estas especies dicotiledóneas al 2,4-D, estos tratamientos de quemadura deben ocurrir por lo menos 14-30 días antes de plantación (Agrilience, 2005).

10

El 2,4-D es la clase de herbicidas de ácido fenoxi, como lo es el MCPA. El 2,4-D se ha utilizado en muchos cultivos monocotiledóneos (tal como maíz, trigo y arroz) para el control selectivo de malezas de hoja ancha sin dañar severamente las plantas de cultivos deseados. El 2,4-D es un derivado de auxina sintético que actúa para desregular la homeostasis de hormona de célula normal e impedir el crecimiento controlado y balanceado; sin embargo, el modo de acción exacto se desconoce aún. El triclopir y el fluroxipir son herbicidas de ácido piridiloxiacético cuyo modo de acción es como una auxina sintética.

20 Estos herbicidas tienen diferentes niveles de selectividad en ciertas plantas (por ejemplo, las dicotiledóneas son más sensibles que las gramíneas). Metabolismos diferentes por diferentes plantas es una explicación para los niveles de selectividad variantes. En general, las plantas metabolizan lentamente el 2,4-D, variando de ésta manera la respuesta de la planta al 2,4-D que se puede explicar más probablemente por la actividad diferente en el sitio objetivo (WSSA, 2002). El metabolismo de la planta del 2,4-D ocurre típicamente a través de un mecanismo

25

de dos fases, típicamente hidroxilación seguida por conjugación con amino ácidos o glucosa (WSSA, 2002).

Con el tiempo, las poblaciones microbianas han desarrollado una ruta alterna y eficiente para degradación de éste xenobiótico particular, que resulta en la mineralización completa del 2,4-D. Aplicaciones sucesivas del herbicida seleccionado para microbios que pueden utilizar el herbicida como una fuente de carbono para crecimiento, les da una ventaja competitiva en el suelo. Por ésta razón, actualmente el 2,4-D formulado tiene una vida útil en el suelo relativamente corta, y no se encuentran efectos de arrastre significativos a los cultivos posteriores. Esto agrega la utilidad herbicida del 2,4-D.

Un organismo que se ha investigado extensivamente por su capacidad para degradar el 2,4-D es *Ralstonia eutrofa* (Streber *et al.*, 1987). El gen que codifica la primera etapa enzimática en la ruta de mineralización es *tfdA*. Ver Patente Estadounidense No. 6,153,401 y No. de acceso GENBANK M16730. El *tfdA* cataliza la conversión del ácido 2,4-D a diclorofenol (DCP) a través de una reacción de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (Smejkal *et al.*, 2001). El DCP tiene poca actividad de herbicida comparado con el 2,4-D. El *tfdA* se ha utilizado en plantas transgénicas para impartir resistencia al 2,4-D en plantas dicotiledóneas (por ejemplo, algodón y tabaco) normalmente sensibles al 2,4-D (Streber *et al.* (1989), Lyon *et al.* (1989), Lyon (1993), y Patente Estadounidense No. 5,608,147).

Un gran número de genes del tipo *tfdA* que codifican proteínas capaces de degradar el 2,4-D se han identificado a partir del ambiente y depositadas en la base de datos del Genbank. Muchos homólogos son similares al *tfdA* (>85% de

identidad de aminoácido) y tienen similares propiedades enzimáticas al *tfdA*. Sin embargo, existe un número de homólogos que tienen una identidad significativamente menor con el *tfdA* (25-50%), aún tienen los residuos característico asociados con dioxigenasas Fe^{+2} α -cetoglutarato dioxigenasa. Por lo tanto no es obvio que las especificidades de sustrato de estas dioxigenasas sean divergentes.

Un único ejemplo con baja homología para el *tfdA* (35% de identidad de aminoácido) es *sdpA* de *Sphingobium herbicidovorans* (Kohler *et al*, 1999, Westendorf *et al*, 2002, Westendorf *et al*, 2003). Se ha mostrado que esta enzima cataliza la primera etapa en (S)-diclorprop (y otros ácidos (S)-fenoxipropiónicos) así como también la mineralización 2,4-D (un ácido fenoxiacético) (Westendorf *et al*, 2003). Por lo tanto no se ha reportado la transformación de este gen en plantas.

15

El desarrollo de nuevas tecnologías de cultivos tolerantes a herbicidas (HTC) se ha limitado en el éxito debido principalmente a la eficacia, bajo costo, y conveniencia del GTC. Por consiguiente, un muy alto índice de adopción para el GTC ha ocurrido entre los productores. Esto crea poca iniciativa para desarrollar nuevas tecnologías HTC.

20

Las estructuras químicas de ariloxialcanoato son una entidad común de muchos herbicidas comercializados que incluyen las auxinas fenoxiacetato (tal como 2,4-D y diclorprop), auxinas piridiloxiacetato (tal como fluroxipir y triclopir), ariloxifenoxipropionatos (AOPP) inhibidores acetil-coenzima A-carboxilasa (ACCase) (tal como haloxifop, quizalofop, y diclofop), e inhibidores oxidasa IX protoporfirinógeno fenoxiacetato 5-sustituido (tal como piraflufen y flumiclorac). Sin

25

embargo, estas clases de herbicidas son bastante distintas, y no existe evidencia en la bibliografía actual de rutas de degradación comunes entre estas clases químicas. Una enzima funcional para la degradación de los herbicidas que cubre múltiples formas de acción se han descrito recientemente (PCT US/2005/014737; 5 presentado en Mayo 2, 2005). Se describe en adelante otras enzimas multifuncionales únicas y usos potenciales.

Breve Resumen de la Invención

10 La invención objeto proporciona plantas novedosas que no sólo son resistentes al 2,4-D, sino también a herbicidas piridiloxiacetato. Por lo tanto, no hay expectativa o sugerencia de que una planta con ambas de estas propiedades ventajosas se pueda producir por la introducción de un único gen. La invención objeto también incluye produce plantas que producen una o más enzimas de la 15 invención objeto "apilada" junto con uno o más de otros genes resistentes a herbicidas, que incluye, pero no se limita a, glifosato, ALS- (imidazolinona, sulfonilurea), ariloxialcanoato-, HPPD-, PPO-, y genes resistentes al glufosinato, con el fin de proporcionar plantas tolerantes a herbicidas compatibles con control de malezas más robustas y más amplias y opciones de manejo de resistencia de 20 herbicidas. La presente invención incluye adicionalmente métodos y composiciones que utilizan homólogos de los genes y proteínas ejemplificadas aquí.

En algunas realizaciones, la invención proporciona plantas 25 monocotiledóneas o dicotiledóneas tolerantes al 2,4-D, MCPA fluroxipir, y uno o más herbicidas disponibles comercialmente (por ejemplo, glifosato, glufosinato, paraquat, inhibidores ALS (por ejemplo, sulfonilureas, imidazolinonas,

sulfonanilidas triazolopirimidina, *et al.*), inhibidores HPPD (por ejemplo, mesotriona, isoxaflutol, *et al.*), dicamba, bromoxinilo, ariloxifenoxipropionatos, y otros). Los vectores que comprenden secuencias de ácido nucleico responsables para tal tolerancia herbicida también se describen, como son los métodos para utilizar tales plantas tolerantes y combinaciones de herbicidas para el control de malezas y la prevención de cambios de población de maleza. La invención objeto permite combinaciones novedosas de herbicidas para ser utilizadas en nuevas formas. Adicionalmente, la invención objeto proporciona métodos novedosos para prevenir el desarrollo de, y controlar, cepas de malezas que son resistentes a uno o más herbicidas tal como glifosato. La invención objeto permite usos novedosos de combinaciones novedosas de herbicidas y cultivos, que incluyen aplicación preplanta a un área a ser plantada inmediatamente antes de plantar con semillas para plantas que de otra forma serían sensibles a ese herbicida (tal como 2,4-D).

La invención objeto se relaciona en parte con la identificación de una enzima que no sólo es capaz de degradar el 2,4-D, sino también procesar sorprendentemente propiedades novedosas, que distinguen la enzima de la invención objeto de las proteínas tipo *tfdA*, previamente conocidas, por ejemplo. Más específicamente, la invención objeto se relaciona con el uso de una enzima que es capaz de degradar el 2,4-D y herbicidas piridiloxiacetato. No se ha reportado previamente enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato por tener la capacidad de degradar herbicidas de los herbicidas fenoxiacetato y piridiloxiacetato auxina. La enzima preferida y el gen para el uso de acuerdo con la invención objeto se denominan aquí como AAD-13 (AriloxiAlcanoato Dioxigenasa). Este descubrimiento altamente novedoso es la base del rasgo de cultivo tolerante a los herbicidas significativos (HTC) y oportunidades de marcador seleccionables.

Las plantas de la invención objeto pueden ser resistentes a lo largo del ciclo de vida completo.

No hubo motivación anterior para producir plantas que comprenden un gen AAD-13 (preferiblemente un polinucleótido AAD-13 que tenga una secuencia optimizada para expresión en uno o más tipos de plantas, como se ejemplifica aquí), y no hay expectativa de que tales plantas puedan producir efectivamente una enzima AAD-13 para producir las plantas resistentes a un herbicida de ácido fenoxiacético (tal como 2,4-D) y/o uno o más herbicidas de piridiloxiacetatos tal como triclopir o fluroxipir. Así, la invención objeto proporciona muchas ventajas que no se pensaron que fueran posibles en la técnica.

La invención también se relaciona en parte con la identificación y el uso de genes que codifican enzimas dioxigenasa ariloxialcanoato que se han capaces de degradar herbicidas auxina fenoxiacetato y/o auxina piridiloxiacetato. Los métodos para detectar proteínas para estas actividades están dentro del alcance de la invención objeto. Así, la invención objeto incluye la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y otros herbicidas ariloxialcanoato auxina mediante una enzima AAD-13 expresada recombinantemente. La invención objeto también incluye métodos para controlar malezas en donde dicho métodos comprenden aplicar uno o más herbicidas auxina piridiloxiacetato o fenoxiacetato a plantas que comprenden un gen AAD-13. La invención objeto también proporciona métodos para utilizar un gen AAD-13 como un marcador seleccionable para identificar células de plantas y plantas completas transformadas con AAD-13, que incluyen opcionalmente uno, dos, o más genes exógenos insertados simultáneamente en células de plantas objetivo. Los métodos de la invención objeto incluyen seleccionar células transformadas que sean resistentes a niveles apropiados de

un herbicida. La invención objeto incluye adicionalmente métodos para preparar un polipéptido, que tiene la actividad biológica de la dioxigenasa ariloxialcanoato, al cultivar plantas y/o células de la invención objeto.

5

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1 ilustra la reacción química general que se cataliza por Las enzimas AAD-13 de la invención objeto.

10

La figura 2 es una alineación ClustalW de dioxigenasas α -cetoglutarato. Se resaltan los residuos conservados en el 80% de las secuencias. (Se relatan los residuos idénticos o similares.)

15

La figura 3 ilustra la degradación concomitante de α -cetoglutarato y el sustrato de interés a través de AAD-13.

Breve Descripción de las Secuencias

20

La SEQ ID NO:1 es la secuencia de nucleótido nativa de AAD-13 de *Sphingobium herbicidovorans*.

La SEQ ID NO:2 es la secuencia de proteína traducida codificada por la SEQ ID NO:1.

25

La SEQ ID NO:3 es la secuencia de nucleótido optimizada de la planta de AAD-13 (vi).

La **SEQ ID NO: 4** es la secuencia de proteína traducida codificada por la
SEQ ID NO:3.

5 La **SEQ ID NO:5** es la secuencia de nucleótido optimizada de E.coli de la
AAD-13 (v2).

La **SEQ ID NO:6** muestra la secuencia del cebador AAD-13 "sdpacodF" (v1)

10 La **SEQ ID NO:7** muestra la secuencia del cebador AAD-13 "sdpacodF"
(v1).

La **SEQ ID NO:8** muestra la secuencia del cebador "sucCD".

15 La **SEQ ID NO: 9** muestra la secuencia del cebador "sucCD" primer.

La **SEQ ID NO: 10** muestra la secuencia del cebador AAD-13 (v2).

La **SEQ ID NO: 11** muestra la secuencia del cebador AAD-13 (v2).

20

Descripción Detallada de la Invención

El desarrollo objeto de un gen de resistencia 2,4-D y los posteriores cultivos
resistentes proporcionan excelentes opciones para controlar especies de maleza
25 resistentes al glifosato (o altamente tolerantes y cambiadas) para aplicaciones en
cultivo. El 2,4-D es un herbicida para hoja ancha de amplio espectro, relativamente
económico y robusto que proporcionaría excelente utilidad para los cultivadores si

podría proporcionar mayor tolerancia al cultivo en cultivos de dicotiledóneas y monocotiledóneas. Los cultivos de dicotiledóneas transgénicos tolerantes al 2,4-D también tendrían mayor flexibilidad en el tiempo y proporción de aplicación. Una utilidad adicional del rango de tolerancia del herbicida objeto para el 2,4-D es su

5 utilidad para evitar el daño a los cultivos normalmente sensibles del arrastre de 2,4-D drift, volatilización, inversión (u otro fenómeno de movimiento del sitio), mala aplicación, vandalismo, y similares. Un beneficio adicional del gen AAD-13 es que a diferencia de todos los homólogos *tfdA* caracterizados hasta la fecha, el AAD-13 es capaz de degradar las auxina piridiloxiacetatos (por ejemplo, fluroxipir) en

10 adición a las auxinas fenoxi aquirales (por ejemplo, 2,4-D, MCPA, ácido 4-clorofenoxiacético). Ver Tabla 1. Una ilustración general de las reacciones químicas catalizadas por la enzima AAD-13 objeto se muestra en la **figura 1**. (La adición O_2 es estereoespecífica; la degradación del intermedio a fenol y glioxilato es espontánea). Se debe entender que la estructura química en la **figura 1** ilustra

15 los esqueletos moleculares y esos varios grupos R y similares (tal como aquellos mostrados en la Tabla 1) se incluyen pero no necesariamente se ilustran específicamente en la Figura 1. Se han utilizado múltiples mezclas de diferentes combinaciones de auxina fenoxi para dar las condiciones ambientales y el espectro de la maleza específica en varias razones. El uso del gen AAD-13 en

20 plantas proporciona protección a un espectro mucho más amplio de herbicidas auxina, incrementando por lo tanto la flexibilidad y el espectro de las malezas que se pueden controlar. El objeto de la invención también se puede utilizar para protegerse del escape u otra lesión de herbicida auxina sintético fuere del sitio para la amplitud completa de auxinas fenoxi disponibles comercialmente. La Tabla

25 1 define auxinas piridiloxi y fenoxi disponibles comercialmente y proporciona estructuras químicas importantes.

Tabla 1. Auxinas fenoxiacetato y piridiloxiacetato disponibles comercialmente. Se hace generalmente referencia a herbicidas auxina fenoxi y auxina piridiloxi para el ácido activo pero algunas se formulan comercialmente como cualquiera de la variedad de formulaciones éster correspondientes y estas se consideran de la misma forma como sustratos para la enzima AAD-13 *in planta* ya que las esterasas de planta generales convierten estos ésteres a los ácidos activos *in planta*. De la misma manera también se puede hacer referencia a las sales orgánicas e inorgánicas correspondientes del ácido correspondiente. Los rangos de índice de uso posibles pueden ser tratamientos autónomos o en combinación con otros herbicidas en usos de cultivo y no cultivo.

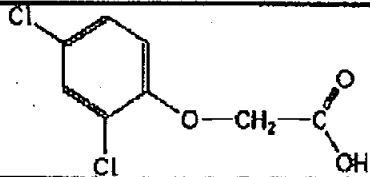
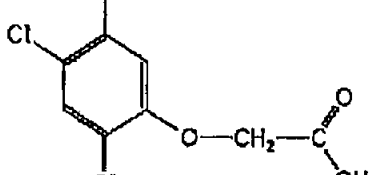
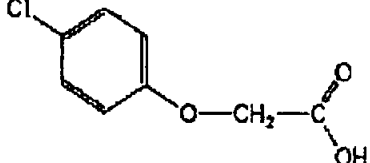
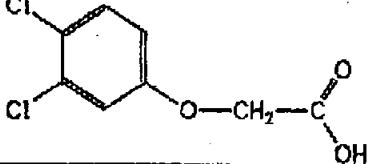
Nombre químico	CAS no	Rangos de índice de uso posible (g ae/ha)	Rangos de índice de uso preferido (g ae/ha)	Estructura
2,4-D	94-75-7	25 – 4000	280 – 1120	
2,4,5-T	93-76-5	25 – 4000	25 – 4000	
4-CPA	122-88-3	25 – 4000	25 – 4000	
3,4-DA	588-22-7	25 – 4000	25 – 4000	

Tabla 1. Auxinas fenoxiacetato y piridiloxiacetato disponibles comercialmente. Se hace generalmente referencia a herbicidas auxina fenoxi y auxina piridiloxi para el ácido activo pero algunas se formulan comercialmente como cualquiera de la variedad de formulaciones éster correspondientes y estas se consideran de la misma forma como sustratos para la enzima AAD-13 *in planta* ya que las esterasas de planta generales convierten estos ésteres a los ácidos activos *in planta*. De la misma manera también se puede hacer referencia a las sales orgánicas e inorgánicas correspondientes del ácido correspondiente. Los rangos de índice de uso posibles pueden ser tratamientos autónomos o en combinación con otros herbicidas en usos de cultivo y no cultivo.

Nombre químico	CAS no	Rangos de índice de uso posible (g ae/ha)	Rangos de índice de uso preferido (g ae/ha)	Estructura
MCPA	94-74-6	25 – 4000	125 – 1550	
Triclopir	55335-06-3	50 – 2000	70 – 840	
Fluoroxipir	69377-81-7	25 – 2000	35 – 560	

Se ha identificado ahora un único gen (AAD-J 3) que, cuando se construye con ingeniería genética para la expresión en plantas, tiene las propiedades que permiten el uso de los herbicidas auxina fenoxi en plantas en donde nunca ha existido tolerancia inherente o no es suficientemente alta para permitir el uso de estos herbicidas. Adicionalmente, el AAD-J 3 puede proporcionar protección en planta a los herbicidas piridiloxiacetato en donde la tolerancia natural tampoco es

suficiente para permitir la selectividad, expandiendo la utilidad potencial de estos herbicidas. Las plantas que contienen AAD-J 3 solo se pueden tratar ahora secuencialmente o mezclar en tanque con uno, dos, o una combinación de varios herbicidas auxina fenoxi. El índice para cada heroicidad auxina fenoxi puede variar
5 de 25 a 4000 g ae/ha, y más típicamente de 100 a 2000 g ae/ha para el control de un amplio espectro de malezas dicotiledóneas. De la misma manera, uno, dos, o una mezcla de varios compuestos auxina piridiloxiacetato se pueden aplicar a las plantas que expresan AAD- 13 con riesgo de lesión reducido por dichos herbicidas. El índice para cada herbicida piridiloxiacetato puede variar de 25 a
10 2000 g ae/ha, y más típicamente de 35-840 g ae/ha para el control de malezas dicotiledóneas adicionales.

El glifosato se utiliza extensivamente debido a que este controla un amplio espectro de especies de maleza gramíneas y de hoja ancha. Sin embargo, el uso
15 repetido de glifosato en GTC y en aplicaciones de no cultivo ha sido, y continuará siendo, seleccionado para cambios de maleza para biotipos resistentes al glifosato o especies naturalmente más tolerantes. Los socios de herbicidas de mezcla de tanque utilizados en proporciones eficaces que ofrecen control de las mismas especies pero que tienen diferentes modos de acción se prescribe en la
20 mayoría de estrategias de manejo de resistencia a herbicidas como un método para retrasar la aparición de malezas resistentes. El apilamiento de AAD-13 con un rasgo de tolerancia al glifosato (y/o con otros rasgos de tolerancia a herbicidas) puede proporcionar un mecanismo que permita el control de especies de malezas dicotiledóneas resistentes al glifosato en GTC al permitir el uso de glifosato,
25 auxinas fenoxi (por ejemplo, 2,4-D) y herbicidas auxina piridiloxiacetatos (por ejemplo, fluroxipir)-selectivamente en el mismo cultivo. Las aplicaciones de estos herbicidas puede ser simultáneamente en un tanque de mezcla que comprende

dos o más herbicidas de diferentes modos de acción; las aplicaciones individuales de la composición herbicida única en aplicaciones secuenciales como preplanta, preemergencia o postemergencia y el tiempo dividido de aplicaciones varia de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 meses; o, alternativamente, cualquier combinación de cualquier número de herbicidas que representan cada clase química se puede aplicar en cualquier tiempo dentro de aproximadamente 7 meses de plantación del cultivo para cosecha del cultivo (o el intervalo de precosecha para el herbicida individual), cualquiera que sea el más corto.

10 Es importante tener flexibilidad en controlar un amplio espectro de malezas de hojas anchas y gramíneas en términos de tiempo de aplicación, proporción de herbicidas individuales, y la capacidad de controlar malezas difíciles o resistentes. Las aplicaciones de glifosato en un cultivo con un gen resistente al glifosato (apilamiento AAD-13 puede variar de aproximadamente 250-2500 g ae/ha; se pueden aplicar herbicidas auxina fenoxi (uno o más) de aproximadamente 25-4000 g ae/ha; y se pueden aplicar herbicidas auxina piridiloxiacetatos (uno o más) de 25-2000 g ae/ha. Las combinaciones óptimas y el tiempo de estas aplicaciones dependerá de la situación particular, especies, y medio ambiente, y se determinará mejor por la persona experta en la técnica del control de maleza y que tiene el beneficio de la descripción objeto.

Las plántulas son típicamente resistentes a través del ciclo completo de crecimiento. Las plantas transformadas serán típicamente resistentes a la nueva aplicación herbicida en cualquier momento que se exprese el gen. La tolerancia se muestra aquí para el 2,4-D a través de ciclo de vida utilizando promotores constitutivos bastante probados (principalmente CsVMV y AtUbi 10). Uno típicamente esperaría esto, pero es una mejora luego de otras actividades no

metabólicas en donde se puede impactar significativamente la tolerancia mediante la expresión reducida de un sitio de acción del mecanismo de resistencia, por ejemplo. Un ejemplo es Roundup Ready cotton, en donde las plantas son tolerantes si se rocían en forma temprana, pero si se rocían muy tarde el glifosato se concentra en el tema (debido a que este no se metaboliza ni se transloca); los promotores víricos de Monsanto utilizados no se expresan bien en las flores. La invención objeto proporciona una mejora a este respecto.

Las formulaciones de herbicidas (por ejemplo, éster, ácido, o formulaciones de sal; o concentrado soluble, concentrado emulsificable, o líquido soluble) y aditivos de mezcla de tanque (por ejemplo, adyuvantes, tensoactivos, retardantes de deslizamiento, o agentes de compatibilidad) pueden afectar significativamente el control de la maleza de un herbicida dado o combinación de uno o más herbicidas. Cualquier combinación de estos con cualquiera de las químicas de herbicidas mencionadas anteriormente está dentro del alcance de la invención.

Un experto en la técnica también podría ver el beneficio de combinar dos o más modos de acción para incrementar el espectro de las malezas controladas y/o para el control de especie de malezas resistentes o naturalmente más tolerantes. Esto también puede extenderse a las químicas para las que la tolerancia al herbicida se permite en cultivos a través del involucramiento humano (ya sea transgénicamente o no transgénicamente) más allá del GTC. De hecho, los rasgos de resistencia al glifosato codificantes (por ejemplo, planta resistente o EPSPS bacteriano (que incluyen *Agro.* cepa CP4), oxidoreductasa glifosato (GOX), GAT), resistencia al glufosinato (por ejemplo, Pat, bar), resistencia al herbicida que inhibe acetolactato sintasa (ALS) (por ejemplo, imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina sulfonanilida, pirimidiniltiobenzoatos, y otros químicos= AHAS,

Csrl, *SurA*, *et al*), resistencia al bromoxinil (por ejemplo, *Bxn*), resistencia a inhibidores de la enzima HPPD (4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa), resistencia a inhibidores de desaturasa fitoeno (PDS), resistencia a herbicidas que inhiben fotosistema II (por ejemplo, *psbA*), resistencia a herbicidas que inhiben fotosistema I, resistencia a herbicidas que inhiben protoporfirinógeno oxidasa IX (PPO)(por ejemplo, *PPO-I*), resistencia a herbicidas fenilurea (por ejemplo, *CYP76B1*), enzimas que degradan dicamba (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense 20030135879), y otros se pueden apilar solos o en múltiples combinaciones para proporcionar la capacidad para controlar efectivamente o prevenir los cambios de maleza y/o la resistencia a cualquier herbicida de las clases mencionadas anteriormente. Se puede utilizar EPSPS modificada in vivo en algunas realizaciones preferidas, así como también genes de resistencia al glifosato Clase I, Clase II, y Clase III.

Con respecto a los herbicidas adicionales, algunos inhibidores de ALS preferidos adicionales incluyen pero no se limitan a las sulfonilureas (tales como clorsulfurón, halosulfurón, nicosulfurón, sulfometuron, sulfosulfurón, trifloxisulfurón), imidazoloninonas (tales como imazamox, imazetapir, imazaquin), sulfonanilidas triazolopirimidina (tales como cloransulam-metil, diclosulam, fiorasulam, flumetsulam, metosulam, y penoxsulam), pirimidiniltiobenzoatos tal como bispiribac y piritiobac), y flucarbazona. Algunos inhibidores HPPD preferidos incluyen pero no se limitan a mesotriona, isoxaflutol, y sulcotriona. Algunos inhibidores PPO preferidos incluyen pero no se limitan a flumiclorac, flumioxazina, flufenpir, piraflufeno, flutiacet, butafenacilo, carfentrazona, sulfentrazona, y difeniléteres (tal como acifluorfen, fomesafen, lactofen, y oxifluorfen).

Adicionalmente AAD-13 solo o apilado con uno o más rasgos HTC adicionales se pueden apilar con uno o más rasgos de entrada adicionales (por ejemplo, resistencia a insectos, resistencia a hongos, o tolerancia a la tensión, et al) o de salida (por ejemplo, rendimiento incrementado, perfil de aceite mejorado, calidad de fibra mejorada, et al.). Así, la invención objeto se puede utilizar para proporcionar un empaque agronómico completo de calidad de cultivo mejorado con la capacidad para controlar flexiblemente y efectivamente en costos cualquier número de plagas agronómicas.

La invención objeto se relaciona en parte con la identificación de una enzima que no solo es capaz de degradar el 2,4-D, sino también posee sorprendentemente propiedades novedosas, que distinguen la enzima de la invención objeto de la proteína *tfdA* previamente conocida, por ejemplo. Aunque esta enzima ha tenido muy baja homología con el *tfdA*, los genes de la invención objeto se pueden clasificar aún en la misma familia general de dioxigenasas dependientes α -cetoglutarato. Esta familia de proteínas se caracteriza por tres residuos histidina conservados en un motivo "HX(D/E)X₂₃₋₂₆(T/S)X₁₁₄₋₁₈₃HX₁₀₋₁₃R" que comprende el sitio activo. El ión Fe^{+2} coordinada histidina en el sitio activo que es esencial para la actividad catalítica (Hogan *et al.*, 2000). Los experimentos de expresión in vitro preliminares discutidos aquí se adaptan para ayudar a seleccionar atributos novedosos. Estos experimentos también indican que la enzima AAD-13 es única de otra enzima dispar de la misma clase, descrita en una solicitud de patente presentada previamente (PCT US/2005/014737; presentada en Mayo 2, 2005). La enzima AAD-1 de esa solicitud solo comparte aproximadamente 25% de identidad de secuencia con la proteína AAD-13 objeto.

Más específicamente, la invención objeto se relaciona en parte con el uso de una enzima que no solo es capaz de degradar el 2,4-D, sino también los herbicidas piridiloxiacetato. Ninguna enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato, a pesar de las enzimas AAD-1 y AAD-12 identificadas previamente (objeto de solicitudes de patente PCT US/2005/014737 (WO 2005/107437) y WO 2007/053482, respectivamente), han sido previamente reportadas por tener la capacidad de degradar herbicidas de las clases químicas diferentes con diferentes modos de acción. Los genes y las enzimas preferidas para uso de acuerdo con la invención objeto se denominan aquí como proteínas y genes AAD-13 (Ari α loxiAlcanoato Dioxigenasa).

Esta invención también se relaciona en parte con la identificación y el uso de genes que codifiquen las enzimas ariloxialcanoato dioxigenasa que son capaces de degradar la fenoxi auxina y los herbicidas piridiloxiacetato. Así, la invención objeto se relaciona en parte con la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros ácidos fenoxiacéticos, y herbicidas de ácido piridiloxiacético mediante una enzima AAD-13 expresada en forma recombinante.

Las proteínas objeto probadas positivas para la conversión 2,4-D para 2,4-diclorofenol ("DCP"; herbicidamente inactivo) en ensayos analíticos. Las proteínas parcialmente purificadas de la invención objeto pueden convertir rápidamente en 2,4-D a DCP in vitro. Una ventaja adicional que las plantas AAD-13 transformadas proporcionan es que los herbicidas parientes se metabolizan a formas inactivas, reduciendo por lo tanto el potencial para reducir los residuos herbicidas en granos o rastrojo.

La invención objeto también incluye métodos para controlar malezas en donde dichos métodos comprenden aplicar un herbicida piridiloxiacetato y/o fenoxi auxina a plantas que comprenden un gen AAD-13.

5 En claridad de los anteriores descubrimientos, se proporcionan ahora las plantas novedosas que comprenden un polinucleótido que codifica este tipo de enzimas. Por lo tanto, no hay motivación para producir tales plantas, y no hay expectativa de que tales plantas puedan producir efectivamente esta enzima para hacer plantas resistentes a no solo los herbicidas de ácido fenoxi (tal como 2,4-D)
10 sino también herbicidas piridiloxiacetato. Así, la invención objeto proporciona muchas ventajas que hasta ahora eran posibles en la técnica.

Las cepas disponibles públicamente (depositadas en colecciones de cultivo como el ATCC o DSMZ) se pueden adquirir y seleccionar, utilizando las técnicas
15 descritas aquí, para genes novedosos. Las secuencias descritas aquí se pueden utilizar para amplificar y clonar los genes homólogos en un sistema de expresión recombinante para prueba y detección adicional de acuerdo con la invención objeto.

20 Como se discutió anteriormente en la sección de Antecedentes, un organismo que se ha investigado extensivamente por su capacidad de degradar el 2,4-D es *Ralstonia eutrofa* (Streber *et al.*, 1987). El gen que codifica la primera enzima en la ruta de degradación es *tfdA*. Ver Patente Estadounidense No. 6,153,401 y No. de Acceso GENBANK M16730. El *tfdA* cataliza la conversión del
25 ácido 2,4-D a DCP herbicidamente inactivo a través de una reacción dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (Smejkal *et al.*, 2001). El *tfdA* se ha utilizado en

plantas transgénicas para impartir resistencia al 2,4-D en plantas dicotiledóneas (por ejemplo, algodón y tabaco) normalmente sensibles al 2,4-D (Streber *et al.*, 1989; Lyon *et al.*, 1989; Lyon *et al.*, 1993). Se ha identificado un gran número de genes del tipo *tfdA* que codifican proteínas capaces de degradar el 2,4-D del medio ambiente y depositadas en la base de datos NCBI. Muchos homólogos son bastante similares al *tfdA* (>85% de identidad de aminoácido) y tienen similares propiedades enzimáticas al *tfdA*. Sin embargo, una pequeña colección de homólogos de oxigenasa dependientes de α -cetoglutarato se identifican actualmente por tener un bajo nivel de homología con el *tfdA*. La invención objeto se relaciona en parte con descubrimientos sorprendentes de nuevos usos para y funciones de una enzima relacionada distantemente, *sdpA*, de *Sphingobium herbicidovorans* (Westendorf *et al.*, 2002, 2003) con baja homología con el *tfdA* (35% de identidad de aminoácido) y baja homología con el AAD-1 identificado recientemente (27% de identidad de aminoácido). Esta enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato purificada en su forma natural se ha mostrado previamente por degradar el 2,4-D y S-diclorprop (Westendorf *et al.*, 2002 y 2003). Sin embargo, no se ha reportado previamente la enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato por tener la capacidad de degradar un herbicida selectivo de la clase química piridiloxiacetato. El *sdpA* (de *Sphingobium herbicidovorans*) nunca se ha expresado en plantas, ni hubo ninguna motivación en parte porque el desarrollo de nuevas tecnologías HTC se ha limitado debido principalmente a la eficacia, bajo costo y conveniencia de los GTC (Devine, 2005).

En claridad de la actividad novedosa, las proteínas y genes de la invención objeto se denominan aquí como proteínas y genes AAD-13. El AAD-13 se confirma actualmente por degradar una variedad de herbicidas fenoxiacetato auxiña in vitro. Ver Tabla 5.4.4-1 en el Ejemplo 5, adelante. Adicionalmente, ésta

enzima, como se reporta por primer vez aquí, se encuentra sorprendentemente que también es capaz de degradar sustratos adicionales de la clase de moléculas ariloxialcanoato. Sustratos de importancia agronómica significativa incluyen los herbicidas auxina piridiloxiacetato. Este descubrimiento altamente novedoso es la base de Cultivos Tolerantes a Herbicidas (HTC) y oportunidades de rasgos de marcador seleccionables. Esta enzima es única en su capacidad para suministrar actividad degradante al herbicida a un rango de herbicidas de hoja ancha de amplio espectro (auxinas fenoxiacetato y piridiloxiacetato).

Así, la invención objeto se relaciona en parte con la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros herbicidas fenoxiacético auxina, y herbicidas piridiloxiacetato mediante una enzima dioxigenasa ariloxialcanoato expresada de manera recombinante (AAD-13). Esta invención también se relaciona en parte con la identificación y uso de genes que codifican una enzima de degradación de dioxigenasa ariloxialcanoato (AAD-13) capaz de degradar herbicidas de fenoxi y/o piridiloxi auxina.

La enzima objeto permite la expresión transgénica que resulta en tolerancia a combinaciones de herbicidas que controlarían casi todas las malezas de hoja ancha. El AAD-13 puede servir como un rasgo excelente de cultivos tolerantes a herbicidas (HTC) para aplicar con otros rasgos HTC [por ejemplo, resistencia a glifosato, resistencia al glufosinato, resistencia al inhibidor ALS (por ejemplo, imidazolinona, sulfonilurea, sulfonanilida triazolopirimidina), resistencia al bromoxinilo, resistencia al inhibidor HPPD, resistencia al inhibidor PPO, *et al.*], y rasgos de resistencia a los insectos (*Cry1F*, *Cry1Ab*, *Cry 34/45*, otras proteínas Bt, o proteínas insecticidas de un origen diferente a Bacilos, *et al.*) por ejemplo. Adicionalmente, el AAD-13 puede servir como un marcador seleccionable para

ayudar en la selección de transformantes de plantas principales contruidos con ingeniería genética con un segundo gen o grupo de gen.

Adicionalmente, el gen microbiano objeto se ha rediseñado de tal manera
5 que la proteína se codifica por codones que tienen una inclinación hacia el uso de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (hemicotiledóneas). La arabidopsis, maíz, tabaco, algodón, soya, canola, y arroz se han transformado con construcciones que contienen AAD-13 y han demostrado altos niveles de resistencia a los herbicidas fenoxi piridiloxi auxina. Así, la invención objeto también
10 se relaciona con genes de "plantas optimizadas" que codifican proteínas de la invención objeto.

Los grupos oxialcanoato son útiles para introducir una funcionalidad de ácido estable en los herbicidas. El grupo ácido puede impartir movilidad al floema
15 mediante "atrapamiento de ácido", un atributo deseable para la acción herbicida y por lo tanto se puede incorporar en nuevos herbicidas para propósitos de movilidad. Los aspectos de la invención objeto también proporcionan un mecanismo para crear HTC. Existen muchos herbicidas experimentales y comerciales potenciales que pueden servir como sustratos para el AAD-13. Así, el
20 uso de los genes objeto también puede resultar en tolerancia al herbicida para aquellos otros herbicidas.

Los rasgos HTC de la invención objeto se pueden utilizar en combinaciones novedosas con otros rasgos HTC (que incluyen pero no se limitan a tolerancia del
25 glifosato). Estas combinaciones de rasgos producen métodos novedosos para controlar especies de malezas (y similares), debido a la nueva resistencia adquirida o tolerancia inherente a los herbicidas (por ejemplo, glifosato). ASÍ, en

adición a los rasgos HTC, los métodos novedosos para controlar malezas utilizando herbicidas, para los que se crea tolerancia en herbicida mediante dichas enzimas en cultivos transgénicos, están dentro del alcance de la invención.

5 Esta invención se puede aplicar en el contexto de comercializar un rasgo de resistencia al 2,4-D apilado con rasgos de resistencia al glifosato actuales en soya, por ejemplo. Así, ésta invención proporciona una herramienta para combatir cambios en las especies de maleza de hoja ancha y/o la selección de malezas de hoja ancha resistentes a herbicidas, que culmina con extremadamente alta
10 dependencia por los cultivadores en el glifosato, para el control de malezas con varios cultivos.

La expresión transgénica del gen AAD-13 objeto se ejemplifica en, por ejemplo, Arabidopsis y tabaco. La soya es un cultivo preferido para transformación
15 de acuerdo con la invención objeto. Sin embargo, ésta invención se puede utilizar en otros múltiples cultivos de monocotiledóneas (tal como pasturas o césped) y cultivos dicotiledóneos similares a alfalfa, trébol, especies de árboles, et al. De la misma manera, el 2,4-D (u otros sustratos AAD-13) pueden ser utilizados más positivamente en cultivos de gramíneas en donde la tolerancia es moderada, y la
20 tolerancia incrementada a través de éste rasgo proporcionaría a los cultivadores la oportunidad de utilizar estos herbicidas en proporciones más eficaces y durante un tiempo de aplicación más amplio sin el riesgo de lesión al cultivo.

Todavía adicionalmente, la invención objeto proporciona un único gen que
25 puede suministrar resistencia a los herbicidas que controlan malezas de hoja ancha. Este gen se puede utilizar en múltiples cultivos para permitir el uso de una combinación de herbicidas de amplio espectro. La invención objeto también puede

controlar malezas resistentes a los químicos actuales, y ayudar en el control de cambiar el espectro de la maleza resultante de las prácticas agronómicas actuales. También se puede utilizar el AAD-13 objeto en esfuerzos para desintoxicar efectivamente sustratos herbicidas adicionales con formas no herbicidas. Así, la invención objeto proporciona el desarrollo de rasgos HTC adicionales y/o tecnología de marcador seleccionable.

Separado de, o en adición a, utilizar los genes objeto para producir HTC, y los genes objeto también se pueden utilizar como marcadores seleccionables para seleccionar transformantes exitosamente en cultivos celulares, invernaderos, y en el camp. Existe un alto valor inherente para los genes objeto simplemente como un marcador seleccionable para proyectos de biotecnología. La promiscuidad de AAD-13 para otros herbicidas ariloxialcanoato auxínicos proporciona muchas oportunidades para utilizar este gen para propósitos de marcador seleccionable y/o HTC.

Proteínas (y fuentes aisladas) de la invención objeto). La presente invención suministra proteínas funcionales. "actividad funcional" (o "activo") significa aquí que la proteína/enzima para uso de acuerdo con la invención objeto tiene la capacidad de degradar o disminuir la actividad de un herbicida (solo o en combinación con otras proteínas). Las plantas que producen proteínas de la invención objeto producirán preferiblemente "una cantidad efectiva" de la proteína de tal manera que cuando la planta se trata con un herbicida, el nivel de expresión de la proteína es suficiente para hacer que la planta sea completamente resistencia, o parcialmente resistente o tolerante al herbicida (en una proporción típica, a menos que se especifique otra cosa; la proporción de aplicación típica se puede encontrar en el *Manual de Herbicidas* bien conocido (Weed Science Society

of America, Vigésima Edición, 2002), por ejemplo). El herbicida se puede aplicar en proporciones que normalmente matarían la planta objetivo, en concentraciones y proporciones de uso de campos normales (Debido a que la invención objeto, el nivel y/o concentración pueden opcionalmente ser mayores que aquellos que se utilizaron anteriormente). Preferiblemente, las plantas y células de la planta de la invención objeto se protegen contra la inhibición del crecimiento o lesión originada por tratamiento con herbicida. Las plantas y las células de plantas transformadas de la invención objeto se vuelven preferiblemente resistentes o tolerantes a un herbicida, como se discute aquí, lo que significa que la célula de la planta y/planta transformada puede crecer en la presencia de cantidades efectivas de uno o más herbicidas como se discute aquí. Proteínas herbicidas de la invención objeto tuene actividad catalítica para metabolizar uno o más compuestos arialoalcanoato.

Uno no puede discutir fácilmente el término "resistencia" y no utilizar el verbo "tolerar" o el adjetivo "tolerante". La industria ha gastado innumerables horas debatiendo cultivos tolerantes a herbicidas (HTC) versus Cultivos Resistentes a Herbicidas (HRC). El HTC es un término preferido en la industria. Sin embargo, la definición de resistencia oficial de la Sociedad Americana para las Ciencias de la Maleza es "la capacidad heredada de una planta para sobrevivir y reproducir luego de exposición a una dosis de herbicida normalmente letal al tipo silvestre. En una planta, la resistencia puede ser de ocurrencia natural o inducida mediante tales técnicas como ingeniería genética o selección de variantes producidas por cultivo de tejidos o mutagenia". Como se utiliza aquí a menos que se indique otra cosa, "resistencia" al herbicida es heredable y permite a una planta crecer y reproducirse en la presencia de un tratamiento herbicidamente efectivo típico por un herbicida para una planta dada, como lo sugiere la actual edición del Manual de Herbicidas como de la presentación de la descripción objeto. Como se reconoce por aquellos

expertos en la técnica, una planta se puede considerar aún "resistente" aunque algún grado de lesión de la planta de la exposición al herbicida es evidente. Como se utiliza aquí, el término "tolerancia" es más amplio que el término "resistencia", se incluye "resistencia" como se define aquí, así como también la capacidad
5 mejorada de una planta particular para resistir los varios grados de lesión inducida herbicidamente que resultan típicamente en plantas de tipo silvestre del mismo genotipo en la misma dosis herbicida.

La transferencia de la actividad funcional a la planta o sistemas bacterianos
10 puede involucrar una secuencia de ácido nucleico, que codifica la secuencia de aminoácido para una proteína de la invención objeto, integrada dentro de un vector de expresión de proteína apropiado para el anfitrión en el que el vector recibirá. Una forma para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína con actividad funcional es aislar el material genético nativo de las
15 especies bacterianas que producen la proteína de interés, utilizando la información deducida de la secuencia de aminoácido de la proteína, como se describe aquí. Las secuencias nativas se pueden optimizar para expresión en plantas, por ejemplo, como se discuten en más detalle adelante. También se puede diseñar un polinucleótido optimizado basado en la secuencia de proteína.

20

La invención objeto proporciona clases de proteínas que tienen actividades novedosas como se identifica aquí. Una forma de caracterizar estas clases de proteínas y los polinucleótidos que las codifican es al definir un polinucleótido por su capacidad de hibridar, bajo un rango de condiciones específicas, con una
25 secuencia de nucleótido de ejemplo (su complemento y/o una sonda o sondas derivadas de su cepa) y/o por su capacidad para ser amplificada por PCR, utilizando cebadores derivados de las secuencias ejemplificadas.

Existe un número de métodos para obtener proteínas para uso de acuerdo con la invención objeto. Por ejemplo, anticuerpos para las proteínas descritas aquí se pueden utilizar para identificar y aislar otras proteínas de una mezcla de proteínas. Específicamente, se puede hacer surgir anticuerpos para las porciones de las proteínas que se conservan más o son más distintas, según se compara con otras proteínas relacionadas. Estos anticuerpos se pueden utilizar luego para identificar específicamente proteínas equivalentes con la actividad característica mediante inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado enzima (ELISA), o inmunotransferencia. Los anticuerpos para proteínas descritas aquí, o para proteínas equivalentes, o para fragmentos de estas proteínas, se pueden preparar fácilmente utilizando procedimientos estándar. Tales anticuerpos son un aspecto de la invención objeto. Los anticuerpos de la invención objeto incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, producidos preferiblemente en respuesta a una proteína ejemplificada o sugerida. Un experto en la técnica reconocería fácilmente que las proteínas (y genes) de la invención objeto se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes. Debido a que se conocen operones de degradación de herbicida completos para ser codificados en elementos transposables, así como también integrados genómicamente, se pueden obtener proteínas de la invención objeto de una amplia variedad de microorganismos, por ejemplo, que incluyen bacterias recombinantes y o de tipo silvestre.

Los mutantes de aislados bacterianos se pueden hacer por procedimientos que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener mutantes asporogénicos a través de mutagenia de sulfonato etilmetano (EMS) de un aislado. Las cepas mutantes también se pueden hacer utilizando luz ultravioleta y nitrosoguanidina mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Una proteína "de" u "obtenible de" cualquiera de los aislados objetos denominados como o sugeridos aquí significa que la proteína (o una proteína similar) se puede obtener del aislado o alguna otra fuente, tal como otra cepa bacteriana o una planta. "Derivado de" también tiene ésta connotación, e incluye proteínas que se pueden obtener a partir de un tipo de bacteria dado que se modifican para expresión en una planta, por ejemplo. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que, dada la descripción de un gen bacteriano y proteína, se puede construir con ingeniería una plana para producir la proteína. Las preparaciones de anticuerpo, sondas de ácido nucleico (ADN, ARN o ANP, por ejemplo), y similares se pueden preparar utilizando las secuencias de aminoácido y/o polinucleótido descritas aquí y utilizadas para detectar y recuperar otros genes relacionados de otras fuentes (naturales).

Se pueden utilizar técnicas de biología molecular estándar para clonar y secuenciar las proteínas y genes descritos aquí. La información adicional se puede encontrar en Sambrook *et al.*, 1989, que se incorpora aquí como referencia.

Polinucleótidos y sondas. La invención objeto proporciona adicionalmente secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas para uso de acuerdo con la invención objeto. La invención objeto proporciona adicionalmente métodos para identificar y caracterizar genes que codifican proteínas que tienen la actividad herbicida deseada. En una realización, la invención objeto suministra secuencias de nucleótido únicas que son útiles como sondas de hibridación y/o cebadores para técnicas PCR. Los cebadores producen fragmentos de genes característicos que se pueden utilizar en la identificación, caracterización, y/o aislamiento de

genes de interés específico. Las secuencias de nucleótido de la invención objeto codifican proteínas que son distintas de las proteínas descritas previamente.

Los polinucleótidos de la invención objeto se pueden utilizar para formar

5 "genes" completos para codificar proteínas o péptidos en una célula anfitriona deseada. Por ejemplo, como el experto reconocería fácilmente, los polinucleótidos objeto se pueden colocar apropiadamente bajo el control de un promotor en un anfitrión de interés, como se conoce fácilmente en la técnica. El nivel de expresión génica y expresión específica de tejidos/temporal puede impactar grandemente en

10 la utilidad de la invención. De manera general, mayores niveles de expresión de proteína de un gen degenerativo resultará en degradación más rápida y más completa de un sustrato (en éste caso un herbicida objetivo). Se desea que los promotores expresen el gen objetivo a altos niveles a menos que la alta expresión tenga un impacto negativo por consiguiente en la salud de la planta. Típicamente,

15 uno desearía tener el gen AAD-13 expresado constitutivamente en todos los tejidos para una expresión completa de la planta en todas las etapas del crecimiento. Sin embargo, uno podría utilizar alternativamente un gen de resistencia expresado vegetativamente; esto permitiría el uso del herbicida objetivo en cultivo para el control de malezas y controlaría posteriormente la

20 reproducción sexual del cultivo objetivo mediante la aplicación durante la etapa de fluorescencia. En adición, tiempos y niveles de expresión deseados también pueden depender del tipo de planta y el nivel de tolerancia deseado. Algunas realizaciones preferidas utilizan fuertes promotores constitutivos combinados con mejoradores de transcripción y similares para incrementar los niveles de expresión

25 y para mejorar la tolerancia a niveles deseados. Algunas de tales aplicaciones se discuten en más detalle adelante, antes de la sección de ejemplos.

Como conoce el experto, existe ADN típicamente en una forma bicatenaria. En ésta disposición, una hebra es complementaria con la otra hebra y viceversa. Cuando se replica el ADN en una planta (por ejemplo), se producen hebras de ADN complementarias adicionales. La "hebra codificante" se utiliza
5 frecuentemente en la técnica para referirse a la hebra que se une con la hebra anticodificante. El mRNA se transcribe de la hebra "anticodificante" del ADN. La "codificación" o hebra "codificante" tiene una serie de codones (un codón son tres nucleótidos que se pueden leer como una unidad de tres residuos para especificar un aminoácido particular) que se puede leer como un cuadro de lectura abierto
10 (ORF) para formar una proteína o péptido de interés. Con el fin de producir una proteína *in vivo*, una hebra de ADN se transcribe típicamente adentro de una hebra complementaria de mRNA que se utiliza como la plantilla para la proteína. Así, la invención objeto incluye el uso de polinucleótidos ejemplificados mostrados en la lista de secuencias adjunta y/o equivalentes que incluyen las hebras
15 complementarias. ARN y ANP (ácidos nucleicos de péptido) que son funcionalmente equivalentes a las moléculas de ADN ejemplificadas se incluyen en la invención objeto.

En una realización de la invención objeto, los aislados bacterianos se
20 pueden cultivar bajo condiciones que resultan en alta multiplicación de los microbios. Después de reatar el microbio para suministrar ácido nucleico genómico monocatenario, se puede poner en contacto el ADN con los cebadores de la invención y someter a amplificación PCR. Los fragmentos de genes característicos de interés se amplificarán mediante el procedimiento, identificando
25 así la presencia de genes de interés.

Aspectos adicionales de la invención objeto incluyen genes y aislados identificados utilizando los métodos y secuencias de nucleótidos descritas aquí. Los genes así identificados pueden codificar proteínas de resistencias herbicida a la invención objeto.

5

Las proteínas y genes para uso de acuerdo con la invención objeto se pueden identificar y obtener al utilizar sondas de oligonucleótidos, por ejemplo. Estas sondas son secuencias en el polinucleótido detectables que se pueden detectar por virtud de una etiqueta apropiada o se pueden hacer fluorescentes inherentemente como se describe en la Solicitud Internacional No. WO 93/16094. Las sondas (y los polinucleótidos de la invención objeto) pueden ser ADN, ARN, i ARP. En adición a adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), y uracilo (U; para moléculas de ARN), sondas sintéticas (y polinucleótidos) de la invención objeto también pueden tener inosina (una base neutra capaz de aparearse con todas las cuatro bases; algunas veces utilizado en lugar de una mezcla de todas las cuatro bases en sondas sintéticas) y/o otras bases sintéticas (no naturales). Así, cuando un oligonucleótido sintético, degenerado se denomina aquí, y "N" o "n" se utiliza genéricamente "N" o "n" puede G, A, T, C, o inosina. La ambigüedad de códigos como se utiliza aquí están de acuerdo con las convenciones de nomenclatura IUPAC estándar como la presentación de la solicitud objeto (por ejemplo, R significa A o G, Y significa C o T, etc.).

10
15
20

Como se conoce bien en la técnica, si una molécula de sonda hibrida una muestra de ácido nucleico, se puede asumir razonablemente que la sonda y la muestra tienen sustancial homología/similitud/identidad. Preferiblemente, la hibridación del polinucleótido se conduce primero seguido por lacados bajo condiciones de bajo, moderada, o alta sigencia por las técnicas bien conocidas en

25

el arte, como se describe en, por ejemplo, Keller, G.H., M. M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, NY, pp. 169-170. Por ejemplo, como se establece aquí, se pueden alcanzar condiciones de baja exigencia al lavar primero con 2X SSC (Citrato Salino Estándar)/0.1% SDS (Sulfato Dodecil Sodio) durante 5 15 minutos a temperatura ambiente. Se desarrollan dos lavados típicos. La mayor exigencia se puede alcanzar al reducir la concentración de sal y/o al elevar la temperatura. Por ejemplo, el lavado descrito anteriormente puede estar seguido por dos lavados con 0.1x SSC/0.1% SDS durante 15 minutos cada uno a temperatura ambiente seguidos por lavados posteriores con 0.1x SSC/0.1% SDS 10 durante 30 minutos cada uno a 55° C. Estas temperaturas se pueden utilizar con otros protocolos de lavado e hibridación establecidos aquí y como se conocerá por aquellos expertos en la técnica del arte (SSPE se pueden utilizar como la sal en cambio de SSC, por ejemplo). Se pueden preparar 2x SSC/0.1% SDS al agregar 50 ml de 20x SSC y 5 ml de 10% SDS a 445 ml de agua. 20x SSC se pueden 15 preparar al combinar NaCl (175.3 g/0.150 M), citrato de sodio (88.2 g/0.015 M), y agua, ajustando el pH a 7.0 con 10 N NaOH, luego ajustando el volumen a 1 litro. Se pueden preparar 10% SDS para disolver 10g de SDS en 50 ml de agua de autoclave, luego se diluye a 100 ml.

20 La detección de la sonda proporciona unos medios para determinar en una forma conocida si se ha mantenido la hibridación. Tal un análisis de sonda proporciona un método rápido para identificar genes de la invención objeto. Los segmentos de nucleótido utilizados como sonda de acuerdo con la invención se pueden sintetizar utilizando procedimientos estándar y de sintetizador de ADN. 25 Estas secuencias de nucleótido también se pueden utilizar como cebadores PCR para amplificar genes de la invención objeto.

Las características de hibridación de una molécula se pueden definir polinucleótidos de la invención objeto. Así la invención objeto incluye polinucleótidos (y/o sus complementos, preferiblemente sus complementos completos) que hibridan con un polinucleótido ejemplificado aquí. Esto es, una
5 forma para definir un gen (y la proteína que codifica), por ejemplo, es mediante su capacidad para hibridar (bajo cualquiera de las condiciones descritas específicamente aquí) con un gen conocido o ejemplificado específicamente.

Como se utiliza aquí, condiciones "estrictas" para hibridación se refiere a
10 condiciones que alcanzan el mismo, o aproximadamente el mismo, grado de especificidad de hibridación como las condiciones empleadas por las actuales solicitantes. Específicamente, la hibridación de ADN inmovilizado en transferencias Southern con sondas específicas de gen ³²P-etiquetadas se pueden desarrollar por métodos estándar (por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1982). En general,
15 la hibridación y posterior lavado se puede llevar a cabo bajo condiciones que permitan la detección de secuencias objetivo. Para sondas de genes de ADN bicatenario, la hibridación se puede llevar a cabo durante la noche a 20-25° C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido ADN en solución 6x SSPE, 5x Denhardt, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml de ADN desnaturalizado. La temperatura de
20 fusión se describe mediante la siguiente fórmula (Beltz *et al.* 1983):

$$T_m = 81.5^\circ \text{ C} + 16.6 \text{ Log}[\text{Na}^+] + 0.41 (\% \text{G+C}) - 0.61 (\% \text{formamida}) - 600 / \text{longitud del dúplex en pares base.}$$

25 Los lavados se pueden llevar a cabo típicamente como sigue:

- (1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en 1x SSPE, 0.1% SDS (lavado de baja exigencia).

- (2) Una vez a $T_m - 20^\circ \text{C}$ durante 15 minutos en 0.2x SSPE, 0.1% SDS (lavado de exigencia moderada).

Para las sondas de oligonucleótidos, la hibridación se puede llevar a cabo durante la noche a $10-20^\circ \text{C}$ por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido en 6x SSPE, 5x solución de Denhardt, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml de ADN desnaturalizado. T_m para las sondas de oligonucleótido se puede determinar por la siguiente fórmula:

$$T_m (^\circ\text{C}) = 2(\text{números de pares base T/A}) + 4(\text{números de pares base G/C})$$

(Suggs *et al*, 1981).

Los lavados se pueden llevar a cabo típicamente como sigue:

- (1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en 1x SSPE, 0.1% SDS (lavado de baja exigencia).
- (2) Una vez a temperatura de hibridación durante 15 minutos en 1x SSPE, 0.1% SDS (lavado de exigencia moderada).

En general, se puede alterar la sal y/o la temperatura para cambiar la exigencia. Con un fragmento de ADN >70 o con bases de longitud, se pueden utilizar las siguientes condiciones:

Bajo: 1 o 2x SSPE₅ a temperatura ambiente

Bajo: 1 o 2x SSPE, 42°C

Moderado : 0.2x o 1x SSPE, 65°C

Alto: 0.1x SSPE, 65°C .

La formación de dúplex y estabilidad dependen de la complementariedad sustancial entre dos hebras de un híbrido, y, como se anotó anteriormente, se puede tolerar un cierto grado de fase. Por lo tanto, las secuencias de sonda, de la invención objeto incluyen mutaciones (sencillas y múltiples), eliminaciones, inserciones de las secuencias descritas, y sus combinaciones, en donde dichas mutaciones, inserciones y eliminaciones permiten la formación de híbridos estables con el polipéptido objetivo de interés. Se pueden producir mutaciones, inserciones, y eliminaciones en una secuencia de polinucleótido dada en muchas formas, y estos métodos se conocen por el experto en la técnica. Otros métodos pueden llegar a ser conocidos en el futuro.

Tecnología PCR. La Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) es una síntesis repetitiva, enzimática, cebada, de una secuencia de ácido nucleico. Este procedimiento es bien conocido y utilizado comúnmente por aquellos expertos en esta técnica. (ver Mullis, Patente Estadounidense Nos. 4,683,195, 4,683,202, y 4,800,159; Saiki *et al*, 1985). El PCR se basa en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN de interés que se flanquea por dos cebadores oligonucleótido que hibridan a hebras opuestas de la secuencia objetivo. Los cebadores se orientan preferiblemente con los extremos 3' señalando uno al otro. Ciclos repetidos de desnaturalización por calor de la plantilla, hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias, y extensión de los cebadores hibridados con una polimerasa de ADN resultan en amplificación del segmento definido por los extremos 5' de los cebadores PCR. El producto de extensión de cada cebador puede servir como una plantilla para el otro cebador, de tal que cada ciclo esencialmente dobla la cantidad de fragmento de ADN producido en el ciclo anterior. Esto resulta en la acumulación exponencial del fragmento objetivo

específico, hasta varios millones de veces en unas pocas horas. Al utilizar una polimerasa de ADN termoestable, tal como polimerasa *Taq*, aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, el proceso de amplificación se puede automatizar completamente. Se pueden utilizar otras enzimas que se conocen por aquellos
5 expertos en la técnica.

Secuencias de ADN ejemplificadas, o sus fragmentos, se pueden utilizar como cebadores para amplificación PCR. En el desarrollo de la amplificación PCR, se puede tolerar un cierto grado de desfase entre el cebador y la plantilla. Por lo
10 tanto, las mutaciones, eliminaciones e inserciones (especialmente adiciones de los nucleótidos al extremo 5') de los cebadores ejemplificados caen dentro del alcance de la invención objeto. Las mutaciones, inserciones, y eliminaciones se pueden producir en un cebador dado por los métodos conocidos por un persona medianamente versada en la técnica.

15

Modificación de genes y proteínas. Los genes y las proteínas objeto se pueden fusionar a otros genes y proteínas para producir proteínas quiméricas o de fusión. Los genes y proteínas útiles de acuerdo con la invención objeto incluyen no solo las secuencias de longitud completa específicamente ejemplificadas, sino
20 también porciones, segmentos y/o fragmentos (que incluyen fragmentos contiguos e internos y/o eliminaciones terminales comparadas con moléculas de longitud completa) de éstas secuencias, variantes, mutantes, quiméricos, y sus fusiones. Las proteínas de la invención objeto pueden tener aminoácidos sustituidos mientras que ellas retengan la actividad funcional deseada. Los genes "variantes"
25 tienen secuencias nucleótidos que codifiquen las mismas proteínas o proteínas equivalentes que tienen actividad equivalente o similar a una proteínas ejemplificada.

Los términos "proteínas variantes" y "proteínas equivalentes" se refiere a proteínas que tienen el mismo o esencialmente la misma actividad biológica/funcional contra los sustratos objetivo y las secuencias equivalentes como las proteínas ejemplificadas. Como se utiliza aquí, la referencia a una secuencia "equivalente" se refiere a secuencias que tienen sustituciones de aminoácidos, eliminaciones, adiciones o inserciones que mejoran o no afectan adversamente la actividad a un grado significativo. Los fragmentos que retienen la actividad también se incluyen en esta definición. Los fragmentos y otros equivalentes que retienen la misma función o función similar o actividad como un fragmento correspondiente de una proteína ejemplificada están dentro del alcance de la invención objeto. Cambios, tal como sustituciones de aminoácido o adiciones, se pueden hacer para una variedad de propósitos, tal como incrementar (o reducir) la estabilidad de proteasa de la proteína (sin reducir materialmente/sustancialmente la actividad funcional de la proteína), remover o agregar un sitio de restricción y similares. Las variaciones de los genes se pueden constituir fácilmente utilizando técnicas estándar para elaborar mutaciones de punto, por ejemplo.

En adición, la Patente Estadounidense 5,605,793, por ejemplo, describe métodos para generar diversidad molecular adicional al utilizar reensamble de ADN después de fragmentación aleatoria o enfocada. Esto se puede denominar como "mezcla" génica, que involucra típicamente mezclar fragmentos (de un tamaño deseado) de dos o más moléculas de ADN diferentes seguido por series de renaturalización repetidas. Esto puede mejorar la capacidad de una proteína codificada por un gen de partida. El resultado es una proteína quimérica que tiene

actividad mejorada, especificidad de sustrato alterada, estabilidad de enzima incrementada, estereoespecificidad alterada, u otras características.

“Mezcla” se puede diseñar y objetivar después de obtener y examinar las
5 coordinadas 3D atómicas (tridimensional) y la estructura de cristal de una proteína de interés. Así, la “mezcla enfocada” se puede dirigir a ciertos segmentos de una proteína que son ideales para modificación, tal como segmentos de superficie expuesta, y preferiblemente segmentos no internos que están involucrados con el plegamiento de la proteína y la integridad estructural 3D
10 esencial.

Los cambios específicos para el “sitio activo” de la enzima se pueden hacer para afectar la funcionalidad inherente con respecto a la actividad o estereo especificidad (ver alineamiento **Figura 2**) Muller *et. al.* (2006). La estructura de
15 cristal tauD conocida se utiliza como un modelo de dioxigenasa para determinar residuos de sitio activos unidos a su taurina de sustrato. Elkins *et al.* (2002) "X-ray crystal structure of *Escherichia coli* taurine/alpha-ketoglutarate dioxygenase complexed to ferrous iron y substrates," *Biochemistry* 41 (16):5185-5192. Con respecto a la optimización secuencia y la capacidad de diseño de los sitios activos
20 de enzima, ver Chakrabarti *et al.*, PNAS, (Aug. 23, 2005), 102(34): 12035-12040.

Se pueden utilizar genes variantes para producir proteínas variantes; se pueden utilizar anfitriones recombinantes para producir proteínas variantes. Utilizar éstas técnicas de “mezcla de genes” se pueden construir proteínas y genes
25 equivalentes que comprenden cualquiera de 5, 10, o 20 residuos contiguos (aminoácido o nucleótido) de cualquier secuencia ejemplificada aquí. Como lo sabe un experto, la técnica de mezcla de genes por ejemplo, se puede ajustar

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

Los fragmentos de los genes de longitud completa se pueden hacer utilizando exonucleasas o endonucleasas disponible comercialmente de acuerdo con los procedimientos estándar. Por ejemplo, las enzimas tal como *Bal31* o mutagenia dirigida al sitio se pueden utilizar para cortar sistemáticamente los nucleótidos de

los extremos de estos genes. También, los genes que codifican los fragmentos activos se pueden obtener utilizando una variedad de enzimas de restricción. Las proteasas se pueden utilizar para obtener directamente fragmentos activos de estas proteínas.

5

Esta dentro del alcance de la invención como se describe aquí que las proteínas se pueden truncar y aún retener la actividad funcional. "proteína truncada" significa que una porción de una proteína se puede dividir aunque la proteína truncada restante retiene y exhibe la actividad deseada después de división. La división se puede lograr mediante varias proteasas. Adicionalmente, las proteínas divididas efectivamente se pueden producir utilizando técnicas de biología molecular donde las bases de ADN que codifica dicha proteína se remueven a través de la digestión con endonucleasas de restricción u otras técnicas disponibles para el experto. Después de truncación, dichas proteínas también se pueden expresar en sistemas heterólogos tal como E. coli, baculovirus, sistemas víricos basados en plantas, levadura, y similares y luego colocadas en ensayos de insectos como se describe aquí para determinar la actividad. Se sabe bien en la técnica que las proteínas truncadas pueden ser producidas exitosamente de tal manera que ellas retengan la actividad funcional aunque tengan menos que la secuencia completa, longitud completa. Por ejemplo, se pueden utilizar proteínas B.t. en una forma truncada (proteína de núcleo) (ver, por ejemplo, Höfte et al. (1989), and Adang et al. (1985)). Como se utiliza aquí, el término "proteína" puede incluir truncaciones funcionalmente activas.

25 En algunos casos, especialmente para la expresión en plantas, puede ser ventajoso utilizar genes truncados que expresan proteínas truncadas. Los genes truncados preferidos codificarán típicamente 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49,

50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% es de la longitud completa de la proteína.

5 Ciertas proteínas de la invención objeto se han ejemplificado aquí específicamente. Como estas proteínas son únicamente de ejemplo de las proteínas de la invención objeto, sería fácilmente evidente que la invención objeto comprenda variantes o proteínas equivalentes (y secuencias de nucleótidos que codifican sus equivalentes) que tienen la misma actividad o tiene actividad similar
10 a las proteínas ejemplificadas. Las proteínas equivalentes tendrán similitud de aminoácidos (y/o homología) con una proteína ejemplificada. La identidad del aminoácido será típicamente de por lo menos 60%, preferiblemente por lo menos de 75%, más preferiblemente por lo menos de 80%, aún más preferiblemente por lo menos de 90%, y pueden ser por lo menos el 95%. Las proteínas preferidas de
15 la invención objeto también pueden definir en términos de más identidad particular y/o rangos de similitud. Por ejemplo, la identidad y/o la similitud puede ser 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% comparado con una secuencia ejemplificada o sugerida
20 aquí. Cualquier número listado anteriormente se puede utilizar para definir los límites superiores e inferiores.

A menos que se especifique otra cosa, como se utiliza aquí, el porcentaje de identidad de secuencia y/o similitud de dos ácidos nucleicos se determina
25 utilizando el algoritmos de Karlin y Altschul, 1990, modificado como en Karlin and Altschul 1993. Tal un algoritmo se incorpora dentro de los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al, 1990. Se desarrolla búsqueda de nucleótidos BLAST

con el programa NBLAST, clasificación = 100, longitud de palabra = 12. Gapped BLAST se pueden utilizar como se describe en Altschul et al, 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros por defectos de los programas respectivos (NBLAST y XBLAST). Ver el sitio de red

5 NCBI/NIH. Para obtener las alineaciones de espacios para propósitos de comparación, la función AlignX del Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., North Bethesda, MD, U.S.A.), se utiliza para emplear los parámetros por defectos. Estos son: una penalidad de abertura Gap de 15, una penalidad de extensión Gap de 6.66, y un rango de penalidad de separación Gap de 8.

10

También se pueden cambiar varias propiedades y características tridimensionales de la proteína sin afectar adversamente la actividad /funcionalidad de la proteína. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se pueden tolerar/ hacer para no afectar adversamente la actividad y/o configuración tridimensional de la molécula.

15 Los aminoácidos se pueden colocar en las siguientes clases: no polares, polares no cargados, básicos, y ácidos. Las sustituciones conservadoras con las cuales un aminoácido de una clase se reemplaza con otro aminoácido del mismo tipo caen dentro del alcance de la invención objeto mientras que la sustitución no sea adversa a la actividad biológica del compuesto. La tabla 2 proporciona una lista de

20 aminoácidos que pertenecen a cada clase.

Tabla 2	
Clase de Aminoácidos	Ejemplos de Aminoácidos
No polar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polar no cargado	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp, Gln
ácido	Asp, Glu
Básico	Lys, Arg, His

En algún caso, también se pueden hacer sustituciones no conservadoras. Sin embargo, las sustituciones preferidas no se deduzcan significativamente de la actividad funcional/biológica de la actividad de la proteína.

5

Como se utiliza aquí, la referencia a poli nucleótidos "asolados" y/o proteínas "purificadas" se refiere a aquellas moléculas cuando ellas no se asocian con las otras moléculas con las que se podrían encontrar en la naturaleza. Así, la referencia a "aislados" y/o "purificado" significa el involucramiento de la "mano del
10 hombre" como se describe aquí. Por ejemplo, un "gene" bacteriano de la invención objeto colocado en una planta para expresión es un "polinucleótido aislado". De la misma manera, una proteína derivada de una proteína bacteriana y producida por una planta es una "proteína aislada".

15 Debido a la degeneración/ redundancia del código genético, una variedad de diferentes secuencias de ADN pueden codificar las secuencias de aminoácidos descritas aquí. Está bien dentro de la experticia de una persona entrenada en la técnica crear secuencias de ADN alternas que codifiquen las mismas, o esencialmente las mismas proteínas. Estas secuencias de ADN variantes están
20 dentro del alcance de la invención objeto. Esto también se discute en más detalles adelante en la sección titulada "Optimización de la secuencia para expresión en plantas".

Optimización de la secuencia para expresión en plantas. Para obtener alta
25 expresión de los genes heterólogos en las plantas se prefiere generalmente reconstruir con ingeniería los genes de tal manera que ellos se expresen más eficientemente en las células de la planta (el citoplasma de ellas). El maíz es una

de tales plantas en donde se puede preferir rediseñar los genes heterólogos antes de la transformación para incrementar el nivel de la expresión de la misma en dicha planta. Por lo tanto, una etapa adicional en el diseño de los genes que codifican una proteína bacteriana es reconstruir con ingeniería un gen heterólogo para expresión óptima, utilizando preferencia codónica alineada más cercanamente con la secuencia de planta objetivo, ya sea una especie dicotiledénea o monocotiledénea. Las secuencias también se pueden optimizar para expresión en cualquiera de los tipos más particulares de planta discutidos en cualquier parte aquí.

10

Anfitriones transgénicos. Los genes que codifican proteínas de la invención objeto se pueden introducir en una amplia variedad de anfitriones microbianos o de plantas. La invención objeto incluye células de plantas transgénicas y plantas transgénicas. Las plantas preferidas (y células de plantas) son Maíz, *Arabidopsis*, tabaco, granos de soya, algodón, canola, arroz, trigo, césped, leguminosas forrajeras (por ejemplo, alfalfa y trébol), césped de pastura, y similares. También se pueden hacer otros tipos de plantas transgénicas de acuerdo con la invención objeto, tal como frutas, vegetales, plantas ornamentales, y arboles. Más generalmente, se pueden utilizar dicotiledóneas y/o monocotiledóneas en varios aspectos de la invención objeto.

20

En las realizaciones preferidas, la expresión de los genes resulta, directamente o indirectamente, en la producción intracelular (y mantenimiento) de las proteínas de interés. De esta manera se pueden producir plantas resistentes a herbicidas. Tales anfitriones se pueden denominar como anfitriones y/o células transgénicas, recombinantes, transformadas y/o transfectadas. En algunos aspectos de esta invención (cuando se clona y prepara el gen de interés, por ejemplo), las células

25

microbianas (preferiblemente bacterianas) se pueden producir y utilizar de acuerdo con técnicas estándar, con el beneficio de la descripción objeto.

Las células de plantas transfectadas con un polinucleótido de la invención objeto se pueden regenerar en plantas completas. La invención objeto incluye cultivos
5 celulares que incluyen cultivos de células de tejido, cultivos líquidos, y cultivos en placas. Las semillas producidas por y/o utilizadas para generar plantas de la invención objeto también están incluidas dentro del alcance de la invención objeto.

También se incluyen otras partes y tejidos de plantas en la invención objeto. La
10 invención objeto incluye de la misma forma métodos para producir plantas y células que comprenden un polinucleótido de la invención objeto. Un método preferido para producir tales plantas es plantar una semilla de la invención objeto.

Aunque se prefieren plantas, la invención objeto también incluye la producción de
15 AAD-13 altamente recombinante activo en una cepa anfitriona de *Pseudomonas fluorescens* (Pf), por ejemplo. La invención objeto incluye temperaturas de crecimiento preferidas para mantener el AAD-13 activo soluble en este anfitrión y un proceso de formulación que puede almacenar y re almacenar la actividad AAD-13 en la solución; y un proceso de liofilización que puede retener la actividad AAD-
20 13 para vida útil y almacenamiento a largo plazo.

Inserción de genes para formar anfitriones transgénicos. Un aspecto de la invención objeto es la transformación /transfección de plantas, células de plantas y otras células anfitrionas con polinucleótidos de la invención objeto que expresan
25 proteínas de la invención objeto. Las plantas transformadas en esta forma se pueden volver resistentes a una variedad de herbicidas con diferentes modos de acción.

Una amplia variedad de métodos están disponibles para introducir un gen que codifica una proteína deseada en un anfitrión objetivo bajo condiciones que permitan el mantenimiento estable y la expresión del gen. Estos métodos se conocen bien por aquellos expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5,135,867.

Los vectores que comprenden un polinucleótido AAD-13 se incluyen en el alcance de la invención objeto. Por ejemplo, un gran número de vectores de clonación que comprenden un sistema de replicación en *E. coli* y un marcador que permita la selección de las células transformadas están disponibles para la preparación para la inserción de los genes externos en plantas mayores. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, serie pUC, serie M13mp, pACYC184, etc. De acuerdo con lo anterior, la secuencia que codifica la proteína se puede insertar en el vector en un sitio de restricción adecuado. El plásmido resultante se utiliza para la transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio de nutriente adecuado, luego se cosechan y lisan. El plásmido se recupera por purificación lejos del ADN genómico. El análisis de secuencia, análisis de restricción, electroforesis, y otros métodos biológicos de bioquímica-molecular se llevan a cabo generalmente como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN utilizada puede ser digerida por restricción y unida a la siguiente secuencia de ADN. Cada secuencia de plásmido se puede clonar en el mismo u otros plásmidos. Dependiendo del método para insertar los genes deseados en la planta, pueden ser necesarias otras secuencias de ADN. Si, por ejemplo, se utiliza plásmido Ti o Ri para la transformación de célula de planta, entonces por lo menos el borde derecho, pero frecuentemente el borde derecho y el izquierdo del T-ADN del plásmido Ti o Ri, se ha unido a la región de flanco de

genes a ser insertados. El uso de T-ADN para la transformación de las células de plantas se ha investigado intensivamente y descrito en la EP 120 516; Hoekema (1985); Fraley et al (1986); y An et al. (1985).

- 5 Hay disponible un gran número de técnicas para insertar ADN en una célula anfitriona de planta. Aquellas técnicas incluyen la transformación de T-ADN utilizando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformación, fusión, inyección, biolísticas (bombardeo de micropartículas), filamentos de carburo de silicio, radiación con aerosol, PEG, o electroporación. Así
- 10 como también otros métodos posibles. Si se utiliza *Agrobacteria* para la transformación, el ADN a ser insertado se tiene que clonar en plásmidos especiales, a saber en un vector intermedio o en un vector binario. Los vector intermedios se pueden integrar en el plásmido Ti o Ri por recombinación homóloga debido a las secuencias que son homologas a las secuencias en el T-
- 15 ADN. El plásmido Ti o Ri también comprenden la región vir necesaria para la transferencia del T-ADN. Los vectores intermedios no se pueden replicar ellos mismos en *Agrobacteria*. El vector intermedio se pueden transferir en *Agrobacterium tumefaciens* por medio de un plásmido auxiliar (conjugación). Los vectores binarios se pueden replica ellos mismos en *E. coli* y en *Agrobacteria*.
- 20 Ellos comprenden un gen marcador de selección y un ligador poliligador que se encuadra por las regiones del límite derecho e izquierdo del T-ADN. Ellas se pueden transformar directamente en *Agrobacteria* (Holsters, 1978). La *Agrobacterium* utilizada como célula anfitriona es para comprender un plásmido que ella una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia del T-ADN
- 25 en la célula de la planta. Se puede contener T-ADN adicional. La bacteria así transformada se utiliza para la transformación de células de planta. Los explantes de la planta se pueden cultivar ventajosamente con *Agrobacterium tumefaciens* o

Agrobacterium rhizogenes para la transferencia de ADN en la célula de la planta.

Las plantas completas se pueden regenerar luego a partir del material de planta infectado (por ejemplo, piezas de hoja, segmentos de tallo, raíces, pero también protoplastos o células cultivadas en suspensión) en un medio adecuado que puede contener antibióticos o biocidas para selección. Las plantas así obtenidas se pueden probar luego para la presencia de ADN insertado. No se hacen demandas especiales de plásmido en el caso de inyección y eletroporación. Es posible utilizar plásmidos ordinarios, tal, por ejemplo, derivados pUC.

Las células transformadas crecen dentro de las plantas en la forma habitual. Ellas pueden formar células germinales y transmitir los rasgos transformados a las plantas progenie. Tales plantas pueden crecer en la forma normal y cruzar con plantas que tienen los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las propiedades fenotípicas correspondientes.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, los genes que codifican la proteína bacteriana se expresan a partir de unidades transcripcionales insertadas en el genoma de la planta. Preferiblemente, dichas unidades transcripcionales son vectores recombinantes capaces de integraciones estables en el genoma de la planta y permitir la selección de estirpes de plantas transformadas que expresan mRNA que codifica la proteína.

Una vez se ha insertado el ADN integrado en el genoma, es relativamente inestable allí (y no sale de nuevo). Esta contiene normalmente un marcador de selección que confiere a las células de la planta transformada resistencia a una biocida o a un antibiótico, tal como kanamicina, G418, bleomicina, higromicina, o

cloramfenicol, inter alia. Los marcadores seleccionables de la planta también pueden proporcionar típicamente resistencia a varios herbicidas tal como lufosinato (por ejemplo, PAT/bar), glifosato (EPSPS), inhibidores ALS (por ejemplo, imidazolinona, sulfonilurea, sulfonanilida triazolopirimidina, et al), bromoxinilo, resistencia al inhibidor HPPD, inhibidores PPO, inhibidores ACC-ase, y muchos otros. El marcador empleado individualmente debe de acuerdo con lo anterior permitir la selección de células transformadas a diferencias de células que no contienen el ADN insertado. Los genes de interés se expresan preferiblemente mediante promotores constitutivos o inducibles en la célula de la planta. Una vez expresado, el mRNA se traduce en proteínas, incorporando por lo tanto aminoácidos de interés en la proteína. Los genes que codifican una proteína expresada en la célula de la planta pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido, o un promotor inducible.

Existen varias técnicas para introducir vectores recombinantes externos en células de la planta, y para obtener plantas que mantienen establemente y expresan el gen introducido. Tales técnicas incluyen la introducción del material genético recubierto en macropartículas directamente en las células (Patentes Estadounidenses Nos. 4,945,050 otorgada a Cornell y 5,141,131 otorgada a DowElanco, ahora Dow AgroSciences, LLC). Adicionalmente, las plantas se pueden transformar utilizando tecnología de Agrobacterium, ver Patentes Estadounidenses Nos. 5,177,010 otorgada a University of Toledo; 5,104,310 otorgada a Texas A&M; Solicitudes de Patente Europea 0131624B1; Solicitudes de Patentes Europea 120516, 159418B1 y 176,112 otorgada a Schilperoot; Patentes Estadounidenses Nos. 5,149,645, 5,469,976, 5,464,763 y 4,940,838 y 4,693,976 otorgada a Schilperoot; Solicitudes de Patentes Europea 1 16718, 290799, 320500, todas otorgada a Max Planck; Solicitudes de Patentes Europea

604662 y 627752, y Patentes Estadounidenses No. 5,591,616, otorgadas a Japan Tobacco; Solicitudes de Patentes Europea 0267159 y 0292435; y Patentes Estadounidenses No. 5,231,019, todas otorgadas a Ciba Geigy, ahora a Syngenta; Patentes Estadounidenses Nos. 5,463,174 y 4,762,785, ambas otorgada a Calgene; y Patentes Estadounidenses Nos. 5,004,863 y 5,159,135, ambas otorgada a Agracetus. Otra tecnología de transformación incluye tecnología de filamentos. Ver Patentes Estadounidenses Nos. 5,302,523 y 5,464,765, ambas otorgada a Zeneca, ahora Syngenta. Otra tecnología de transformación de suministro de ADN directa incluye tecnología de irradiación por aerosol. Ver Patentes Estadounidenses No. 6,809,232. La tecnología de Electroporación también se ha utilizado para transformar plantas. Ver WO 87/06614 otorgada a Boyce Thompson Institute; Patentes Estadounidenses Nos. 5,472,869 y 5,384,253, ambas otorgada a Dekalb; y WO 92/09696 y WO 93/21335, ambas otorgada Plant Genetic Systems. adicionalmente, los vectores víricos también se pueden utilizar para producir plantas transgénicas que expresan la proteína de interés. Por ejemplo, las plantas monocotiledoneas se pueden transformar con un vector vírico utilizando los métodos descritos en Patentes Estadounidenses No. 5,569,597 otorgada a Mycogen Plant Science y Ciba-Geigy (ahora Syngenta), así como también las Patentes Estadounidenses Nos. 5,589,367 y 5,316,931, ambas otorgada a Biosource, ahora Large Scale Biology.

Como se mencionó previamente, la forma en la que la construcción de ADN se introduce en el anfitrión de la planta no es crítica para esta invención. Se puede emplear cualquier método que proporcione transformación eficiente. Por ejemplo, se describen varios métodos para transformación de células de plantas aquí e incluye el uso de plásmidos Ti o Ri y similares para desarrollar transformación mediada por Agrobacterium. En muchos casos, será deseable tener la

construcción utilizada para la transformación límite en uno o en ambos lados por los límites del T-ADN, más específicamente el límite derecho. Esto es particularmente útil cuando la construcción utiliza *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como un modo para transformación, aunque los límites del T-ADN pueden encontrar uso con otros modos de transformación. Cuando se utiliza *Agrobacterium* para la transformación de célula de planta se puede utilizar un vector que se puede introducir en el anfitrión para recombinación homologa con T-ADN o el plásmido Ti o Ri presente en el anfitrión. La introducción del vector se puede desarrollar por vía de electroporación, cruzamiento tri-parental y otras técnicas para transformar bacterias gran-negativas que se conocen por aquellos expertos en la técnica. La forma de la transformación de vector en el anfitrión *Agrobacterium* no es crítica para esta invención. El plásmido Ti o Ri que contiene el T-ADN para recombinación puede ser capaz o incapaz de originar información gall, y no es crítico para dicha invención mientras que los genes vir estén presentes en dicho anfitrión.

En algunos casos cuando se utiliza *Agrobacterium* para transformación, la construcción de expresión esta dentro de los límites del T-ADN que se insertarán en un vector de amplio espectrum tal como pRK2 o sus derivados como se describe en Ditta et al (1980) y EPO 0 120 515. Incluido dentro de la construcción de la expresión el T-ADN será uno o más marcadores como se describen aquí que permitirá la selección de *Agrobacterium* transformado y células de plantas transformadas. El marcador particular empleado no es esencial para esta invención, con el marcador preferido dependiendo de la construcción y anfitrión utilizado.

Para la transformación de célula de planta utilizando *Agrobacterium*, se pueden combinar explantes e incubar con el *Agrobacterium* transformado durante el tiempo suficiente para permitir la transformación misma.

5 Después de transformación, se mata la *Agrobacteria* mediante selección con el antibiótico apropiado y se cultivan células de la planta con el medio selectivo apropiado. Una vez se forman los cayos, la formación de los vástagos se puede fomentar al emplear las hormonas de plantas apropiadas de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica de cultivo de tejidos de plantas y
10 regeneración de plantas. Sin embargo, no siempre es necesaria una etapa intermedia de cayo. Después de la formación del vástago, dichas células de planta se pueden transferir a un medio que fomenta la formación de raíz complementando por lo tanto la regeneración de la planta. Las plantas se pueden hacer crecer luego para semilla y dicha semilla se puede utilizar para establecer
15 generaciones futuras. Independiente de la técnica de transformación, el gen que codifica una proteína bacteriana incorporada preferiblemente en un gen de transferencia de vector adaptado para expresar dicho gen en una célula de planta al incluir en el vector un elemento regulador promotor de planta, así como también regiones de terminación transcripcionales no traducidas 3' tal como Nos y
20 similares.

En adición a las numerosas tecnologías para transformar plantas, el tipo de tejidos que se pone en contacto con los genes externos también puede variar. Tal tejido incluiría pero no se limitaría a tejido embriogénico, tejido de cayo tipo I, II y
25 III, hipocotilo, meristema, tejido de raíz, tejido para expresión en floema, y similares. Casi todos los tejidos de plantas se pueden transformar durante la diferenciación utilizando las técnicas apropiadas descritas aquí.

Como se mencionó anteriormente, se puede utilizar una variedad de marcadores seleccionables, si se desea. La preferencia para un marcador particular está a discreción del experto, pero cualquiera de los siguientes marcadores seleccionables se pueden utilizar junto con cualquier otro gen no listado aquí que pueda funcionar como un marcador seleccionable. Tales marcadores seleccionables incluyen pero no se limitan a gen de fosfotransferasa aminoglicosida de transposon Tn5 (Aph II) que codifica la resistencia a los antibióticos canamicina, neomicina y G41; resistencia a la higromicina; resistencia al metotrexato, así como también aquellos genes que codifican para la resistencia o tolerancia al glifosato; fosfinotricina (bialafos o glufosinato); herbicidas que inhiben el ALS (imidazolinonas, sulfonilureas y herbicidas triazolopirimidina), inhibidores ACC-asa (por ejemplo, airiloxipropionatos o ciclohexanodionas), y otros tal como bromoxinil, e inhibidores HPPD (por ejemplo, mesotriona) y similares.

En adición a un marcador seleccionable, puede ser deseable utilizar un gen indicador. En algunos casos un gen indicador se puede utilizar con o sin un marcador seleccionable. Los genes indicadores son genes que no están típicamente presentes en el organismo receptor o tejido y codifican típicamente para proteínas que resultan en algún cambio fenotípico o propiedad enzimática. Ejemplos de tales genes se suministran en Weising *et al.*, 1988. Los genes indicadores preferidos incluyen beta-glucuronidasa (GUS) el locus *uidA* de *E. coli*, el gen acetil transferasa cloramfenicol de Tn9 de *E. coli*, la proteína fluorescente verde de la medusa bioluminescente *Aequorea victoria*, y los genes luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*. Un ensayo para detectar la expresión del gen indicador se puede desarrollar luego en un momento adecuado después que dicho

gen se ha introducido en células receptoras. Un ensayo preferido implica el uso del gen que codifica la beta-glucuronidasa (GUS) del locus *uidA* de *E. coli* como se describe por Jefferson *et al.*, (1987) para identificar células transformadas.

5 En adición a los elementos reguladores promotores de plantas, se pueden utilizar elementos reguladores promotores de una variedad de fuentes de manera eficiente en células de plantas para expresar genes externos. Por ejemplo, los elementos reguladores promotores de origen bacteriano, tal como el promotor de sintasa octopina, el promotor de sintasa nopalina, el promotor de sintasa
10 mannopina; promotores de origen vírico, tal como virus mosaico del coliflor (35S y 19S), 35T (que es un promotor 35S construido con reingeniería, ver Patente Estadounidense No. 6,166,302, especialmente Ejemplo 7E) y se pueden utilizar similares. Los elementos reguladores promotores de plantas incluyen pero no se limitan a subunidad pequeña carboxilasa (ssu) de ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP),
15 promotor de beta-conglicinina, promotor de beta-faseolina, promotor ADH, promotores de choque térmico, y promotores específicos de tejido. Otros elementos tales como regiones de unión de matriz, regiones de unión de andamio, intrones, mejoradores, secuencias de poliadenilación y similares pueden estar presentes y así pueden mejorar la eficiencia de la transcripción o integración de
20 ADN. Tales elementos pueden o no pueden ser necesarios para la función del ADN, aunque ellos proporcionan mejor expresión o funcionamiento del ADN al efectuar la transcripción, estabilidad del mRNA, y similares. Tales elementos se pueden incluir en el ADN según se desee para obtener el desempeño óptimo del ADN transformado en la planta. Los elementos típicos incluyen pero no se limitan
25 a Adh-intrón 1, Adh-intrón 6, secuencia líder de proteína de recubrimiento de virus de mosaico de la alfalfa, secuencias UTR osmotina, secuencia líder de la proteína de recubrimiento del virus de estrias de maíz, así como también otras disponibles

al experto. Los elementos reguladores promotores constitutivos también se pueden utilizar por lo tanto dirigiendo la expresión génica continua en todos los tipos celulares y en todos los momentos (por ejemplo, actina, ubiquitina, CaMV 35S, y similares). Los elementos reguladores promotores específicos de tejido son
5 responsables de la expresión génica en los tipos de tejidos o células específicas, tal como hojas o semillas (por ejemplo, zeína, oleosina, napina, ACP, globulina y similares) y estas también se pueden utilizar.

Los elementos reguladores promotores también se pueden activar (o
10 inactivar durante una cierta etapa del desarrollo de las plantas así como también es activo en órganos y tejidos de plantas. Ejemplos de tales incluyen pero no se limitan a elementos reguladores promotores específicos de polen, específicos de embriones, específicos de maíz, específicos de seda de maíz, específicos de fibra de algodón, específicos de raíz, específicos de endosperma de semilla, o
15 específicos de fase vegetativa. Bajo ciertas circunstancias puede ser deseable utilizar un elemento regulador promotor inducible, que es responsable de la expresión de los genes en respuesta a una señal específica, tal como: estímulo físico (genes de choque térmico), luz (carboxilasa RUBP), hormona (Em), metabolitos, químicos (sensibilidad a la tetraciclina), y tensión. Otros elementos de
20 traducción y transcripción deseables que funcionan en las plantas se pueden utilizar. Se conocen en la técnica numerosos vectores de transferencia génica específica de planta.

También se pueden utilizar sistemas basados en ARN vírico de plantas
25 para expresar proteína bacteriana. Al hacer esto, el gen que codifica una proteína se puede insertar en la región promotora de cubierta de un virus de planta adecuado que infectara la planta anfitriona de interés. La proteína se puede

expresar luego suministrando así protección de la planta del daño por herbicidas.

Los sistemas basados en ARN vírico de plantas se describen en la Patente Estadounidense No. 5,500,360 otorgada a Mycogen Plant Sciences, Inc. y Patentes Estadounidenses Nos. 5,316,931 y 5,589,367 otorgada a Biosource, ahora Large Scale Biology.

Medios para incrementar adicionalmente los niveles de tolerancia o resistencia. Se muestra aquí que las plantas de la invención objeto se les puede impartir rasgos de resistencia a los herbicidas novedosos sin efectos adversos observables sobre rendimiento incluyendo el fenotipo. Tales plantas están dentro del alcance de la invención objeto. Las plantas ejemplificadas y sugeridas aquí pueden portar 2X, 3X, 4X, y 5X los niveles de aplicación típicos, por ejemplo, de por lo menos un herbicida objeto. Las mejoras en estos niveles de tolerancia están dentro del alcance de ésta invención. Por ejemplo, se conocen en el arte varias técnicas, y se pueden optimizar previsiblemente y desarrollar adicionalmente, para incrementar la expresión de un gen dado.

Uno de tales métodos incluye incrementar el número de copias de los genes *AAD-13* del sujeto (en los casetes de expresión y similares). También se pueden seleccionar eventos de transformación para aquellos que tienen múltiples copias de los genes.

Se pueden utilizar mejoradores y promotores fuertes para "sobrecargar" la expresión. Ejemplos de tales promotores incluyen el promotor 35T preferido que utiliza los mejoradores 35S. El 35S, ubiquitina de maíz, ubiquitina Arabidopsis, A.t. actina, y promotores CSMV se incluyen para tales usos. También se prefieren otros promotores víricos fuertes. Los mejoradores incluyen 4 OCS y el mejorador

doble 35S. También se pueden utilizar regiones de unión de matriz (MAR) para incrementar la eficiencia de transformación y la expresión transgénica, por ejemplo.

5 También se pueden utilizar factores de transcripción y mezcla (evolución directa) para las realizaciones de acuerdo con la invención objeto.

También se pueden diseñar proteínas variantes que difieren en el nivel de secuencia pero que retienen el mismo o estructura similar tridimensional esencial
10 general, distribución de carga a superficie, y similares. Ver por ejemplo Patente Estadounidense No. 7,058,515; Larson et al., *Protein Sci.* 2002 11: 2804-2813, "Thoroughly sampling sequence space: Large-scale protein design of structural ensembles."; Cramer et al., *Nature Biotechnology* 15, 436 - 438 (1997), "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling."; Stemmer,
15 W.P.C.1994. DNA shuffling by random fragmentation y reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 10747-10751; Stemmer, W.P.C.1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-391; Stemmer, W.P.C.1995. Searching secuencia space. *Bio/Technology* 13: 549—553; Cramer, A., Cwirla, S. and Stemmer,
20 W.P.C.1996. Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nature Medicine* 2: 100-103; y Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P.C. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology* 14: 315-319.

25 La actividad de los polinucleótidos recombinantes insertados en las células de las plantas puede ser dependiente de la influencia del ADN de la planta endógena adyacente al inserto. Así, otra opción es tomar ventaja de los eventos

que se conocen por ser ubicaciones excelentes en un genoma de planta para las inserciones. Ver por ejemplo WO 2005/103266 A1, que se relaciona con eventos de algodón *cry1F* y *cry1Ac*; el gen *AAD-13* se puede sustituir en aquellos lugares genómicos en el lugar de los insertos *cry1F* y/o *cry1Ac*. Así, la recombinación homóloga objetivo, por ejemplo, se puede utilizar de acuerdo con la invención objeto. Este tipo de tecnología es el objeto de, por ejemplo, la WO 03/080809 A2 y la solicitud Estadounidense publicada correspondiente (USPA 20030232410), que se relaciona con el uso de dedos de zinc para recombinación objetiva. El uso de recombinasas (*cre-lox* y *flp-frt* por ejemplo) también se conocen en la técnica.

La desintoxicación *AAD-13* se considera que ocurra en el citoplasma. Así, los medios para estabilización adicional de ésta proteína mRNA (que incluyen bloqueo de la degradación del mRNA) se incluyen en los aspectos de invención objeto, y se conocen técnicas que se pueden aplicar de acuerdo con lo anterior. Se pueden diseñar proteínas objeto para resistir la degradación por proteasas y similares (los sitios de división de proteasa se pueden remover efectivamente por reingeniería de la secuencia de aminoácido de la proteína). Tales realizaciones incluyen el uso de estructuras helicoidales 5' y 3' similares a UTR de la osmotina, y *per5* (secuencias 5' no traducidas ricas en AU). También se pueden utilizar tapas 5' como los grupos 7-metilo o 2'-O-metilo, por ejemplo, el residuo de ácido 7-metilguanilico. Ver, por ejemplo., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 74, No. 7, pp. 2734-2738 (July 1977) *Importance of 5' -terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis*. También se pueden utilizar los complejos de proteínas o grupos de bloqueo de ligandos.

El diseño computacional del UTR 5' o 3' más adecuado para *AAD-13* (horquillas sintéticas) también se pueden conducir dentro del alcance de la

invención objeto. Más específicamente lo relacionado con el modelamiento por computador y UTR, técnicas de modelamiento por computador para uso en la predicción/evaluación de derivados UTR 5' y 3' UTR de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: MFold versión 3.1 disponible de Genetics Corporation Group, Madison, WI (ver Zucker et al., Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In *RNA Biochemistry and Biotechnology*, 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker et al., *Expanded Secuencia Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure*. *J. Mol. Biol.* 288, 91 1-940 (1999); Zucker et al., RNA Secondary Structure Prediction. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* S. Beaucage, D.E. Bergstrom, G.D. Glick, y R.A. Jones eds., John Wiley & Sons, New York, 11.2.1-11.2.10, (2000)), COVE (RNA structure analysis utilizar covariance models (stochastic context free grammar métodos)) v.2.4.2 (Eddy & Durbin, *Nucl. Acids Res.* 1994, 22: 2079-2088) que se distribuye libremente como código fuente y que se puede descargar al acceder el sitio de red genetics.wustl.edu/eddy/software/, y FOLDALIGN, también distribuido libremente y disponible para descargar en el sitio red.bioinf.au.dk. FOLDALIGN/ (ver *Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences*. J. Gorodkin, L. J. Heyer and G. D. Stormo. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, no. 18 pp 3724-3732, 1997; *Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences.*, J. Gorodkin, L. J. Heyer, and G. D. Stormo. *ISMB* 5;120-123, 1997).

Las realizaciones de la invención objeto se pueden utilizar en conjunto con mutantes inducidos químicamente o evolucionados naturalmente (los mutantes se pueden seleccionar por técnicas de detección sistemática, luego transformadas

con AAD-13 y posiblemente con otros genes). Las plantas de la invención objeto se pueden combinar con resistencia al ALS y/o resistencia al glifosato evolucionado. La resistencia al aminopiraldid, por ejemplo, también se puede combinar o "apilar" con el gen AAD-13.

5

De las técnicas de siembra tradicionales también se pueden combinar con la invención objeto para combinar poderosamente, introgresión, y rasgos deseados mejorados.

10

Las mejoras adicionales también incluyen el uso con protectores apropiados para proteger adicionalmente a las plantas y/o para agregar resistencia cruzada a más herbicidas. Los protectores actúan típicamente para incrementar el sistema inmune de las plantas al activar/expresar cP450. Los protectores son agentes químicos que reducen la fitotoxicidad de los herbicidas a las plantas de cultivo mediante un mecanismo molecular o fisiológico, sin comprometer la eficacia del de la maleza).

15

Protectores herbicidas incluyen benoxacor, cloquintocet, ciometrinilo, diclormid, diciclonon, dietolato, fenclorazol, fenclorim, flurazol, fluxofenim, furilazol, isoxadifeno, mefenpir, mefenato, anhídrido naftálico, y oxabetrinilo. También se pueden utilizar activadores de planta (una nueva clase de compuestos que protegen las plantas al activar sus mecanismos de defensa) en corporaciones de la invención objeto. Estas incluyen acibenzolar y probenazol.

20

Los protectores comercializados se pueden utilizar para la protección de cultivos de pasto de semilla grande, tal como maíz, sorgo grande, y arroz cultivado en húmedo, contra herbicidas aplicados preemergencia o incorporados a la

25

preplanta de las familias tiocarbamato y cloroacetanilida. Los protectores también se han desarrollado para proteger cultivos de cereales en invierno tal como trigo contra aplicaciones postemergencia de herbicidas ariloxifenoxipropionato y sulfonilurea. El uso de los protectores para la protección de maíz y arroz contra sulfonilurea, imidazolinona, ciclohexanodiona, isoxazol, y tricetona también están bien establecidos. Una mejora inducida por el protector de desintoxicación de herbicida en plantas protegidas es ampliamente aceptado como el mecanismo principal involucrado en la acción protectora. Los protectores inducen cofactores tales como glutatona y enzimas que desintoxican los herbicidas tal como glutatona S-transferasas, monooxigenasas citocromo P450, y transferasas glucosilo. Hatzios KK, Burgos N (2004) "Metabolism- based herbicide resistance: regulation by safeners," Weed Science: Vol. 52, No. 3 pp. 454- 467.

El uso de un gen monooxigenasa citocromo p450 apilado con AAD-13 es una realización preferida. Existen P450 involucrados en el metabolismo de herbicidas. El cP450 puede ser de origen mamífero o de plantas, por ejemplo. En plantas mayores, se conoce la monooxigenasa citocromo P450 (P450) por conducir un metabolismo secundario. Este también juega un papel importante en el metabolismo oxidativo de los xenobióticos en cooperación con la oxidoreductasa (reductasa) NADPH-citocromo P450. Se ha reportado resistencia a algunos herbicidas como un resultado del metabolismo del P450 así como también S-transferasa glutatona. Se ha caracterizado un número de especies P450 microsómicas en el metabolismo xenobiótico en mamíferos mediante clonación molecular. Algunas de ellas se reportan por metabolizar eficientemente varios herbicidas. Así, las plantas transgénicas con plantas o mamíferos P450 pueden mostrar resistencia a varios herbicidas.

Una realización preferida de lo anterior es el uso del cP450 para resistencia al acetoclor (productos basados en acetoclor incluyen los herbicidas Surpass®, Keystone®, Keystone LA, FulTime® y TopNotch®) y/o trifluralin (tal como Treflan®). Tal resistencia en granos de soya y/o maíz se incluye en algunas realizaciones preferidas. Para guía adicional con respecto a tales realizaciones preferidas. Para guía adicional con respecto a tales realizaciones, *ver por ejemplo* Inui *et al.*, "A selectable marker using cytochrome P450 monooxygenases for Arabidopsis transformation," *Plant Biotechnology* 22, 281-286 (2005) (que se relaciona con un sistema de selección para transformación de Arabidopsis taliana a través de Agrobacterium tumefaciens que utiliza monooxygenasas citocromo P450 humanas que metabolizan herbicidas. Se transforman semillas tolerantes a herbicidas y se seleccionan con los herbicidas acetoclor, amiprofos-metilo, clorprofam, clorsulfuron, norflurazon, y pendimetalina); Siminszky *et al.*, "Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides," *PNAS* Vol. 96, Issue 4, 1750-1755, February 16, 1999; Sheldon *et al.*, *Weed Science*: Vol. 48, No. 3, pp. 291-295, "A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers resistance to linuron in transgenic Nicotiana tabacum"; y "Phytoremediation of the herbicides atrazina and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19," *J Agric Food Chem.* 2006 Apr 19;54(8):2985-91 (que se relaciona con probar una monooxygenasa citocromo p450 humana en arroz en donde las plantas de arroz muestran alta tolerancia a cloroacetomidas (acetoclor, alaclor, metoacclor, pretilaclor, y thenilclor), oxiacetamidas (mefenacet), piridazinonas (norflurazon), 2,6-dinitroanilinas (trifluralin y pendimetalin), fosfamidados (amiprofos-metilo, tiocarbamatos (piributicarb), y ureas (clortolurón)).

También existe la posibilidad de alterar o utilizar diferentes químicas 2,4-D para hacer al gen *AAD-13* objeto más eficiente. Tales posibles cambios incluyen crear mejores sustratos y mejores grupos salientes (mayor electronegatividad).

5 También se pueden utilizar inhibidores de transporte de auxina (por ejemplo, diflufenzopir) para incrementar la actividad herbicida con 2,4-D.

Ejemplo 1 - Método para identificar Genes Que Imparten Resistencia herbicida en Plantas

10 Como una forma para identificar genes que poseen actividades de degradación herbicida en plantas, es posible minar bases de datos públicas actuales tal como NCBI (Centro Nacional para Información Biotecnológica). Al inicio del proceso, es necesario tener una secuencia de gen funcional ya
15 identificada que codifica una proteína con las características deseadas {es decir, actividad dioxigenasa α -cetoglutarato}. Esta secuencia de proteína luego se utiliza como la entrada para el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al, 1997) para comparar contra las secuencias de proteína NCBI disponibles depositadas. Utilizando configuraciones por defecto, esta búsqueda
20 regresa hacia arriba de las 100 secuencias de proteína homólogas en niveles variantes. Este rango de alta identidad (85-98%) a muy baja identidad (23-35%) en el nivel de aminoácido. Tradicionalmente solo secuencias con alta homología esperarían retener propiedades similares para la secuencia de entrada. En este caso, solo se seleccionan las secuencias con < 50% de homología. Como se
25 ejemplifica aquí, la clonación y homólogos de expresión recombinante con tan poco como 35% de conservación de aminoácido (con relación al *tfdA* de *Ralstonia eutropha*) se puede utilizar para impartir niveles comerciales de resistencia no solo

al herbicida pretendido, sino también a sustratos nunca probados previamente con estas enzimas.

Se identifica un gen único (sdpA) de las bases de datos NCBI (ver el sitio web ncbi.nlm.nih.gov; # de acceso AJ628860) como un homólogo con solo 35% de identidad de aminoácido a tfdA. Se determina la identidad en porcentaje al traducir primero el sdpA y todas las secuencias de ADN depositadas en las bases de datos para las proteínas, luego utilizar ClustalW en el paquete de software VectorNTI para desarrollar las múltiples secuencias de alineación.

Ejemplo 2 - Optimización de Secuencia para expresión en Plantas y Bacterias

2.1 - Antecedente.

Para obtener altos niveles de la expresión de genes heterólogos en plantas, se puede preferir volver a construir por ingeniería la proteína que codifica secuencia de los genes ya que ellos se expresan más eficientemente en células de planta. El maíz es una planta donde se puede preferir rediseñar la región que codifica la proteína heteróloga antes de la transformación para incrementar el nivel de expresión del gene y el nivel de proteína codificada en la planta. Por lo tanto, una etapa adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana es volver a construir por ingeniería un gen heterólogo para expresión óptima.

Una razón para la reconstrucción por ingeniería de un bacteriano para expresión en maíz es debido al contenido de G+C no óptimo del gen nativo. Por ejemplo, el contenido G+C muy bajo de muchos genes bacterianos nativos (y posteriormente la inclinación hacia el contenido alto de A+T) resulta en la

generación de secuencias de imitación o duplicar las secuencias de control de gen de planta que se conocen por ser altamente ricos en A+T. La presencia de algunas secuencias ricas en A+T dentro del ADN de los genes introducidos en las plantas (por ejemplo, regiones cuadradas TATA normalmente encontradas en promotores de gen) puede resultar en transcripción aberrante de los genes. Por otra parte, la presencia de otras secuencias reguladoras reside en el mRNA transcrito (por ejemplo, secuencias de señal de poliadenilación tal como AAUAAA, o secuencias complementarias para los ARN nucleares pequeños que se involucra en corte y empalme de n pre-mARN) puede conducir a inestabilidad de ARN. Por lo tanto, un objetivo es el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana para la expresión de maíz, más preferiblemente referido como genes que optimizan plantas, es para generar una secuencia de ADN que tiene un contenido G+C seleccionado preferiblemente de aquellos genes de maíz que codifican enzimas metabólicas. Otro objetivo en el diseño de los genes que optimizan la planta que codifican una proteína bacteriana es generar una secuencia de ADN en la que las modificaciones de secuencia no ocultan la traducción.

Tabla Ej2-1 presenta el contenido de G+C de genes de maíz. Para los datos en la Tabla Ej2-1, que codifica regiones de los genes se extraen de las entradas GenBank (Libera 71), y se calculan las composiciones de base utilizan el programa MacVector™ (Accelrys, San Diego, California). Se ignoran las secuencias de intrón en los cálculos.

Tabla Ej2-1: Compilación de contenidos G + C de regiones que codifican la proteína de genes de maíz

Clase de Proteína ^a	Rango % G + C	Media % G + C ^D
Enzimas metabólicas (76)	44.4-75.3	59.0 (±8.0)
Proteínas estructurales (18)	48.6-70.5	63.6 (±6.7)

Proteínas reguladoras (5)	57.2-68.8	62.0 (±4.9)
Proteínas no caracterizadas (9)	41.5-70.3	64.3 (±7.2)
Todas las proteínas (108)	44.4-75.3	60.8 (±5.2) ^c

^a Número de genes en la clase dada en el paréntesis.

^b Las desviaciones estándar se dan en paréntesis.

^c La media de grupos combinados se ignora en el cálculo de la media

Las secuencias de ADN disponibles públicamente múltiples existen en donde uno puede encontrar información acerca de los contenidos de G+C de genomas de planta o las regiones que codifican la proteína de varios genes de planta. Una tal base de datos se ubica en la Red Amplia Mundial (w.w.w.) en el URL <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. En este sitio, uno puede encontrar que el contenido promedio de G+C de, por ejemplo, tabaco (*Nicotiana tabacum*) la secuencia que codifica la proteína es 43.3% (análisis de 1268 secuencias que comprenden 453,797 codones). Uno también puede encontrar que el contenido promedio de G+C del maíz (Maíz *Zea*) de las secuencias que codifican la proteína es 54.9% (análisis de 2280 secuencias que comprende 973,578 codones). En comparación, el contenido de G+C del *Sphingobium herbicidovorans* de la secuencia que codifica la proteína AAD- 13 descrita en la SEQ ID NO:2 es 67.2%. Así, puede ser ventajoso cuando se diseña un gen AAD-13 para expresión en el maíz o dicotiledoneas para el contenido inferior G+C de la región que codifica la proteína en un rango de 40-55%. Por lo tanto, un objetivo en el diseño de los genes que codifican una proteína bacteriana para la expresión de planta, más preferiblemente se refiere como genes que optimizan la planta, es generar una secuencia de ADN que tiene un contenido de G+C preferiblemente cercano a aquel de genes de planta anfitriona nativa que codifican las enzimas metabólicas.

Debido a la plasticidad proporcionada por redundancia/degeneración del código genético (es decir, algunos aminoácidos se especifican en más de un

codón), la evolución de los genomas en diferentes organismos o clases de organismos ha resultado en el uso diferencial de codones redundantes. Esta variación de "codón" se refleja en la composición de base media de regiones que codifican la proteína. Por ejemplo, organismos con relativamente bajos contenidos de G+C que utilizan codones que tienen A o T en la tercera posición de codones redundantes, aunque aquellos que tienen altos contenidos de G+C utilizan codones que tienen G o C en la tercera posición. Esto es a través que la presencia de codones "menores" dentro de un mRNA puede reducir el índice de traducción absoluto de mRNA, especialmente cuando la abundancia relativa del tARN cargado que corresponde al codón menor es baja. Una extensión de esto es que la disminución del índice traducción mediante codones menores individuales es por lo menos un aditivo para codones menores múltiples. Por lo tanto, los mRNA que tiene contenidos relativamente altos de codones menores que tendría de forma correspondiente índice de traducción bajos. Este índice se reflejaría mediante niveles bajos posteriores de la proteína codificada.

En genes contruidos por ingeniería que codifican una proteína bacteriana para expresión en maíz (u otras plantas, tal como algodón o soya), es útil si se ha determinado el preferencia codónica de plantas anfitrionas prospectivas. El preferencia codónica se puede calcular como la frecuencia en el que se utiliza el codón único con relación a los codones para todos los aminoácidos. Alternativamente, como se describe en la Tabla Ej2-2, Columnas C, D, I y J, el preferencia codónica se puede calcular como la frecuencia en la que un único codón se utiliza para codificar un aminoácido particular, con relación a todos los otros codones para el aminoácido (codones sinónimos). La preferencia codónica para el maíz es la distribución estadística del codón que la planta utiliza para codificar sus proteínas, y el uso del codón que se calcula de 706 genes de maíz se

muestra en la Tabla Ej2-2, Columnas C y I. En las regiones codificantes diseñadas para los genes que codifican las proteínas bacterianas destinadas a la expresión de la planta, los codones principales ("primera elección") preferidos por la planta se debe determinar, así como también el segunda, tercera, cuarta etc. elecciones de codones preferidas cuando existe las elecciones múltiples. Una nueva secuencia de ADN luego se puede diseñar que codifica la secuencia amino de la proteína bacteriana, pero la nueva secuencia de ADN difiere de la secuencia de ADN bacteriana nativa (que codifica la proteína) mediante la sustitución de los codones de la planta (primero preferido, segundo preferido, tercero preferido, o cuarto preferido, etc.) para especificar el aminoácido en cada posición dentro de la secuencia de aminoácido proteína. La nueva secuencia luego se analiza para sitios de restricción de enzima que se puede haber creado por las modificaciones. Los sitios identificados se modifican adicionalmente al reemplazar los codones con primero, segundo, tercero, o cuarto elecciones preferidas. Otros sitios en la secuencia que podrían afectar la transcripción o traducción del gene de interés son las conjunciones exón:intrón (5' o 3'), las señales de adición poli A, o las señales de terminación de polimerasa ARN. La secuencia se analiza adicionalmente y se modifica para reducir la frecuencia de los dobletes TA o CG. En adición a los dobletes, los bloques de secuencia G o C que tienen más de aproximadamente seis residuos que son los mismos pueden afectar la transcripción o traducción de la secuencia. Por lo tanto, estos bloques se modifican ventajosamente al reemplazar los codones de primera o segunda elección, etc. con el siguiente codón preferido de elección.

Así, con el fin de diseñar genes que optimizan plantas que codifican una proteína bacteriana, se diseña una secuencia de ADN para codificar la secuencia de aminoácido de dicha proteína utilizando un código genético redundante

establecido de una tabla de preferencia codónica compilada de las secuencias de gen para la planta o plantas particulares. La secuencia de ADN resultante tiene un grado mayor de diversidad de codón, una composición base deseable, puede contener sitios de reconocimiento de restricción de enzima colocados estratégicamente, y carece de secuencias que puede interferir con la transcripción del gene, o traducción del producto mRNA. Tales genes sintéticos que son funcionalmente equivalentes a los genes/proteínas de la invención objeto se pueden utilizar para transformar anfitriones, que incluyen plantas. La guía adicional con respecto a la producción de genes sintéticos se puede encontrar en, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,380,831 y Solicitud PCT WO 97/13402.

Para construir por ingeniería un gen que optimiza plantas que codifica una proteína AAD- 13, se diseña una secuencia de ADN para codificar la secuencia de aminoácido AAD-13, utilizando un código genético redundante establecido de las tablas de preferencia codónica compiladas de las secuencias que codifican la proteína para plantas anfitrionas particulares (maíz y dicotiledóneas). En la Tabla Ej2-2, Columnas C, D, I, y J presentan las distribuciones (en % de uso para todos los codones para el aminoácido) de codones sinónimos para cada aminoácido, como se encuentra en 706 regiones codificantes de Maíz Zea (maíz) y 154 genes de dicotiledóneas [REF: Murray, E. E., Lotzer, J., Eberle, M. (1989) Codon usage in plant genes. Nucl. Acids Res. 17:477-497]. Los codones más preferidos para cada tipo de planta se indican en negrilla, y el segunda, tercera, o cuarta elecciones de codones se puede identificar cuando existen múltiples elecciones. Es evidente que algunos codones sinónimos para algunos aminoácidos se encuentran solamente raramente en genes de planta (por ejemplo AGT en maíz y CCG en dicotiledóneas). También, las plantas de maíz y dicotiledóneos difieren en

el uso del codón individual (por ejemplo el codón Alanina GCG ocurre más frecuentemente en genes de maíz que en genes de dicotiledóneas, aunque el codón Arginina AGA se utiliza más frecuentemente en genes de dicotiledóneas que en genes de maíz). Así, es obvio que una región que codifica la proteína
5 diseñada para reflejar la composición de codón óptima de genes de una especie de planta que puede tener una composición de codón subóptima para la expresión en otras especies de planta. En el proceso diseñado para crear una secuencia de ADN que codifica la proteína que aproxima una distribución de codón promedio de los genes de maíz y dicotiledóneos, cualquier codón que se utiliza
10 infrecuentemente con relación a los otros codones sinónimos para los que aminoácido en el tipo de planta se excluye (indicado por DNU en las Columnas F y L de la Tabla Ej2-2). Usualmente, se considera un codón por ser raramente utilizado si este se representa en aproximadamente 10% o menos del tiempo para codificar el aminoácido relevante en los genes del tipo de planta (indicada por NA en las Columnas E y K de la Tabla Ej2-2). Para balancear la distribución de las
15 elecciones de codón restantes para un aminoácido, se calcula una representación de Peso Promedio para cada codón, utilizando la fórmula:

$$\text{Peso Promedio \% de CI} = 1/(\%C1 + \%C2 + \%C3 + \text{etc.}) \times \%C1 \times 100$$
 donde
20 CI es el codón en cuestión y %C2, %C3, e/c. representa los valores promedio en % para maíz y dicotiledóneas de codones sinónimos restantes (% de valores promedios para los codones relevantes se toman de las Columnas E y K) de la Tabla Ej2-2.

25 EL valor % de peso promedio de cada codón se da en las Columnas F y L de la Tabla Ej2-2.

Tabla Ej2-2. . Representación de codón sinónimo en regiones codificantes de 706 genes de Maíz Zea (maíz) (Columnas C y I), y 154 genes de dicotiledóneas (Columnas D y J). Los valores para la representación de la preferencia codónica balanceada establecidos para un gen sintético que optimiza 5 plantas diseñado están en las Columnas F y L.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Amino-ácido	Codón	Maíz %	Dicotile- donea %	Promedio maíz-dico- tiledónea	Peso Promedio	Amino-ácido	Codón	Maíz %	Dicotile- donea %	Promedio maíz-dico- tiledónea	Peso Promedio
ALA (A)	GCA	18	25	21.7	25.5	LEU (L)	CTA	8	8	NA	DNU
	GCC	34	27	30.3	35.6		CTC	26	19	22.5	34.3
	GCG	24	6	NA	DNU		CTG	29	9	NA	DNU
	GCT	24	42	33.2	39.0		CTT	17	28	22.5	34.3
ARG (R)	AGA	15	30	22.4	27.4		TTA	5	10	NA	DNU
	AGG	26	25	25.7	31.5		TTG	15	26	20.6	31.4
	CGA	9	8	NA	DNU	LYS (K)	AAA	22	39	30.6	30.6
	CGC	24	11	17.7	21.7		AAG	78	61	69.4	69.4
	CGG	15	4	NA	DNU	MET (M)	ATG	100	100	100	100
	CGT	11	21	15.8	19.4	PHE (F)	TTC	71	55	63.2	63.2
ASN (N)	AAC	68	55	61.4	61.4		TTT	29	45	36.8	36.8
	AAT	32	45	38.6	38.6	PRO (P)	CCA	26	42	33.8	41.4
ASP (D)	GAC	63	42	52.6	52.6		CCC	24	17	20.7	25.3
	GAT	37	58	47.4	47.4		CCG	28	9	NA	DNU
CYS (C)	TGC	68	56	61.8	61.8		CCT	22	32	27.2	33.3
	TGT	32	44	38.2	38.2	SER (S)	AGC	23	18	20.4	26.0
FINAL	TAA	20	48	33.8			AGT	9	14	NA	DNU
	TAG	21	19	20.1			TCA	16	19	17.5	22.4
	TGA	59	33	46.1			TCC	23	18	20.6	26.3
	GLN (Q)	CAA	38	59	48.4		48.4	TCG	14	6	NA
CAG		62	41	51.6	51.6		TCT	15	25	19.9	25.4
GLU (E)	GAA	29	49	38.8	38.8	THR (T)	ACA	21	27	23.8	28.0
	GAG	71	51	61.2	61.2		ACC	37	30	33.6	39.5
GLY (G)	GGA	19	38	28.5	28.5		ACG	22	8	NA	DNU
	GGC	42	16	29.1	29.0		ACT	20	35	27.7	32.5
	GGG	20	12	16.1	16.0	TRP (W)	TGG	100	100	100	100

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Amino-ácido	Codón	Maíz %	Dicotiledónea %	Promedio maíz-dicotiledónea	Peso Promedio	Amino-ácido	Codón	Maíz %	Dicotiledónea %	Promedio maíz-dicotiledónea	Peso Promedio
HIS (H)	GGT	20	33	26.7	26.6	TYR (Y)	TAC	73	57	65.0	65.0
	CAC	62	46	54.1	54.1		TAT	27	43	35.0	35.0
	CAT	38	54	45.9	45.9	VAL (V)	GTA	8	12	NA	DNU
ILE (I)	ATA	14	18	15.9	15.9		GTC	32	20	25.8	28.7
	ATC	58	37	47.6	47.9		GTG	39	29	34.1	38.0
	ATT	28	45	36.4	36.4		GTT	21	39	29.9	33.3

Una nueva secuencia de ADN que codifica esencialmente la secuencia de aminoácido de la proteína *Sphingobium herbicidovorans* AAD-J 3 de la SEQ ID NO:2 se diseña para la expresión óptima en células de maíz y de dicotiledóneas utilizando una distribución de codón balanceada de codones utilizados frecuentemente encontrados en genes de maíz y de dicotiledóneas.

2.2 –Análisis de reconstrucción de plantas AAD-13

El análisis extensivo de los pares base 861 (bp) de la región codificante de una secuencia de ADN nativa de AAD-J 3 (SEQ ID NO:1) revela la presencia de varios motivos de secuencia que se consideran son perjudiciales para la expresión óptima de la planta, así como también una composición de codón no óptima. La proteína codificada por SEQ ID NO:1 (AAD-J 3) se presenta como SEQ ID NO:2. Para mejorar la producción de la proteína recombinante en maíz así como también en dicotiledóneas, una secuencia de ADN de "planta optimizada" (AAD-J 3 vl) (SEQ ID NO:3) se desarrolla al codificar una proteína (SEQ ID NO:4) que es la misma como la proteína nativa descrita en la SEQ ID NO:2 excepto por la adición de un residuo alanina en la segunda posición (subrayada en SEQ ID NO:4). El codón alanina adicional (GCT; subrayada en SEQ ID NO:3) que codifica parte de un sitio de reconocimiento de restricción de enzima *Nco* I (CCATGG) expandiendo el codón de inicio traduccional ATG. Así, sirve el propósito dual de facilitar

operaciones de clonación posteriores aunque se mejora el contexto de secuencia
circundante del codón de inicio ATG para optimizar la iniciación de la traducción.
Las proteínas codificadas por las regiones codificantes nativa y optimizada de
planta (v1) son 99.3% idénticas, que difiere solo del número de aminoácido 2. En
5 contraste, las secuencia de ADN nativa y optimizada de planta (v1) de las regiones
codificantes son solo 77.3% idénticas. La Tabla Ej2-3 muestra las diferencias en
las composiciones de codón de las secuencias optimizadas de planta y nativas
(Columnas A y D) y (Columnas B y E), y permite comparación de la secuencia
optimizada de planta teórica (Columnas C y F) que tendría precisamente la
10 composición de codón dictada por las columnas F y L de la Tabla Ej2-2.

Tabla Ej2-3. Comparaciones de la composición de codón de regiones
codificantes de la versión Nativa AAD-1B, versión optimizada de Planta (v1) y una
versión optimizada de planta teórica.

		A	B	C			D	E	F
Amino-ácido	Codón	Nativa	Planta Opt v1 #	Planta Teor. Opt. #	Amino-ácido	Codón	Nativa	Planta Opt v1 #	Planta Teor. Opt. #
ALA (A)	GCA	1	10	9	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	24	11	13		CTC	11	11	10
	GCG	10	0	0		CTG	17	0	0
	GCT	1	16	14		CTT	0	10	10
ARG (R)	AGA	0	4	4	LYS (K)	TTA	0	0	0
	AGG	0	5	5		TTG	2	9	9
	CGA	1	0	0		AAA	0	3	3
	CGC	10	4	3	MET (M)	AAG	10	7	7
	CGG	4	0	0		ATG	9	9	9
ASN (N)	CGT	1	3	3	PHE (F)	TTC	8	6	6
	AAC	3	2	2		TTT	1	3	3
ASP (D)	AAT	1	2	2	PRO (P)	CCA	2	7	7
	GAC	19	13	13		CCC	5	5	5
CYS (C)	GAT	5	11	11		CCG	10	0	0
	TGC	2	1	1		CCT	1	6	6
FINAL	TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	9	4	4
	TAA	0	0			AGT	1	0	0
	TAG	0	0			TCA	1	3	3
GLN (Q)	TGA	1	1	1		TCC	1	4	4
	CAA	0	7	7		TCG	3	0	0
GLU (E)	CAG	14	7	7		TCT	0	4	4
	GAA	3	5	5	THR (T)	ACA	0	3	3
GLY (G)	GAG	11	8	9		ACC	7	4	4
	GGA	1	6	6		ACG	4	0	0
	GGC	16	6	6		ACT	0	4	4
	GGG	3	3	3	TRP (W)	TGG	7	7	7
HIS (H)	GGT	1	6	6		TAC	5	4	5
	CAC	7	7	8	TYR (Y)	TAT	2	3	2
ILE (I)	CAT	7	7	6		GTA	0	0	0
	ATA	0	2	2		GTC	6	4	4
	ATC	10	5	5		GTG	7	6	6
	ATT	1	4	4		GTT	2	5	5
	Totales	157	158	158		Totales	131	131	131

Es claro del examen de la Tabla Ej2-3 que las regiones codificantes nativa y optimizada de planta, aunque que codifica las proteínas casi idénticas, son sustancialmente diferentes una de la otra. La versión Optimizada de Planta (v1) imita cercanamente la composición de codón de una región codificante optimizada de planta teórica que codifica la proteína AAD-13.

2.3 Reconstrucción para la Expresión E. coli

Las cepas especialmente construidas por ingeniería de Escherichia coli y asociadas a sistemas de vector se utilizan frecuentemente para producir

cantidades relativamente grandes de proteínas para estudios bioquímicos y analíticos. Algunas veces se encuentra que un gen nativo que codifica la proteína deseada no es bien adecuado para la expresión de alto nivel en *E. coli*, aunque el organismo fuente para el gene puede ser otro organismo bacteriano. En tales

5 casos es posible y deseable construir por ingeniería la región que codifica la proteína del gene haciéndolo más adecuado para expresión en genes *E. coli*. *E. coli* Clase II que se definen como aquellas que se expresan continuamente y altamente durante la fase de crecimiento exponencial de células *E. coli*. [REF: Henaut A. y Danchin, A, (1996) in *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*

10 *cellular y molecular biology*, vol. 2, pp. 2047-2066. Neidhardt, F., Curtiss HI. R., Ingraham. L Lin, E., Low, B., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M., Schaechter, M. y Umberger, H. feds.) American Society for Microbiology. Washington, DC]. A través del examen de las composiciones de codón de las regiones codificantes de los genes *E. coli* Clase II, uno puede divisar una composición de codón promedio

15 para estas regiones codificantes del gen *E. coli* Clase II. Esto a través de una región que codifica la proteína que tiene una composición de codón promedio imitante de los genes Clase II favorecerá la expresión durante la fase de crecimiento exponencial de *E. coli*. Utilizando estos lineamientos, una nueva secuencia de ADN que codifica la proteína AAD-J 3 (SEQ ID NO:4; que incluye

0 alanina adicional en la segunda posición, como se mencionó anteriormente), se diseña de acuerdo con la composición de codón promedio de regiones que codifican el gen *E. coli* Clase II. La secuencia inicial, cuyo diseño se basa solo en la composición de codón, se construye por ingeniería adicionalmente para incluir ciertas secuencias de reconocimiento de restricción de enzima adecuadas para

5 clonación en los vectores de expresión *E. coli*. Se evitan las características de secuencia perjudiciales tal como estructuras helicoidales altamente estables, como son los homólogos de secuencias intragénicas en el extremo 3' del ARN

ribosómico 16S (es decir secuencias Shine Dalgarno) La secuencia optimizada E. coli (v2) se describe como SEQ ID NO: 5 y codifica la proteína descrita en SEQ ID NO:4.

5 Las secuencias de ADN nativa y optimizada E. coli (v2) son 80.2% idénticas, aunque las secuencias optimizadas de planta (v1) y optimizada E. coli (v2) son 84.4% idénticas. La Tabla Ej2-4 presenta las composiciones de codón de la región codificante nativa AAD-13; Columnas A y D), la región codificante AAD-13 optimizado para expresión en E. coli (v2; Columnas B y E) y la composición de
10 codón de una región codificante teórica para la proteína AAD-13 que tiene una composición de codón óptima de genes E. coli Clase II (Columnas C y F).

Tabla Ej2-4. Comparaciones de composición de codón de regiones codificantes de AAD-13 Nativo, versión optimizada de E. coli (v2) y una versión
15 Optimizada Teórica E. coli Clase II.

A					B					C					D					E					F				
Amino-ácido	Codón	Nativa	E. coli Opt v2 #	Teor. Clase II #	Amino-ácido	Codón	Nativa	E. coli Opt v2 #	Teor. Clase II #	Amino-ácido	Codón	Nativa	E. coli Opt v2 #	Teor. Clase II #	Amino-ácido	Codón	Nativa	E. coli Opt v2 #	Teor. Clase II #	Amino-ácido	Codón	Nativa	E. coli Opt v2 #	Teor. Clase II #	Amino-ácido	Codón	Nativa	E. coli Opt v2 #	Teor. Clase II #
ALA (A)	GCA	1	11	11	LEU (L)	CTA	0	0	0	LEU (L)	CTA	0	0	0	LEU (L)	CTA	0	0	0	LEU (L)	CTA	0	0	0	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	24	0	0		CTC	11	0	0		CTC	11	0	0		CTC	11	0	0		CTC	11	0	0		CTC	11	0	0
	GCG	10	14	14		CTG	17	30	30		CTG	17	30	30		CTG	17	30	30		CTG	17	30	30		CTG	17	30	30
	GCT	1	12	12		CTT	0	0	0		CTT	0	0	0		CTT	0	0	0		CTT	0	0	0		CTT	0	0	0
ARG (R)	AGA	0	0	0	LEU (L)	TTA	0	0	0	LEU (L)	TTA	0	0	0	LEU (L)	TTA	0	0	0	LEU (L)	TTA	0	0	0	LEU (L)	TTA	0	0	0
	AGG	0	0	0		TTG	2	0	0		TTG	2	0	0		TTG	2	0	0		TTG	2	0	0		TTG	2	0	0
	CGA	1	0	0	LYS (K)	AAA	0	8	8	LYS (K)	AAA	0	8	8	LYS (K)	AAA	0	8	8	LYS (K)	AAA	0	8	8	LYS (K)	AAA	0	8	8
	CGC	10	7	5		AAG	10	2	2		AAG	10	2	2		AAG	10	2	2		AAG	10	2	2		AAG	10	2	2
ASN (N)	CGG	4	0	0	MET (M)	ATG	9	9	9	MET (M)	ATG	9	9	9	MET (M)	ATG	9	9	9	MET (M)	ATG	9	9	9	MET (M)	ATG	9	9	9
	CGT	1	9	11		TTC	8	6	6		TTC	8	6	6		TTC	8	6	6		TTC	8	6	6		TTC	8	6	6
	AAC	3	4	4		TTT	1	3	3		TTT	1	3	3		TTT	1	3	3		TTT	1	3	3		TTT	1	3	3
	AAT	1	0	0	PRO (P)	CCA	2	3	3	PRO (P)	CCA	2	3	3	PRO (P)	CCA	2	3	3	PRO (P)	CCA	2	3	3	PRO (P)	CCA	2	3	3
ASP (D)	GAC	19	13	13		CCC	5	0	0		CCC	5	0	0		CCC	5	0	0		CCC	5	0	0		CCC	5	0	0
	GAT	5	11	11		CCG	10	15	15		CCG	10	15	15		CCG	10	15	15		CCG	10	15	15		CCG	10	15	15
	TGC	2	1	1		CCT	1	0	0		CCT	1	0	0		CCT	1	0	0		CCT	1	0	0		CCT	1	0	0
	TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	9	4	4	SER (S)	AGC	9	4	4	SER (S)	AGC	9	4	4	SER (S)	AGC	9	4	4	SER (S)	AGC	9	4	4
FINAL	TAA	0	1	1		AGT	1	0	0		AGT	1	0	0		AGT	1	0	0		AGT	1	0	0		AGT	1	0	0
	TAG	0	0	0		TCA	1	0	0		TCA	1	0	0		TCA	1	0	0		TCA	1	0	0		TCA	1	0	0
	TGA	1	0	0		TCC	1	5	5		TCC	1	5	5		TCC	1	5	5		TCC	1	5	5		TCC	1	5	5
GLN (Q)	CAA	0	3	3	THR (T)	TCG	3	0	0	THR (T)	TCG	3	0	0	THR (T)	TCG	3	0	0	THR (T)	TCG	3	0	0	THR (T)	TCG	3	0	0
	CAG	14	11	11		TCT	0	6	6		TCT	0	6	6		TCT	0	6	6		TCT	0	6	6		TCT	0	6	6
	GAA	3	10	11		ACA	0	0	0		ACA	0	0	0		ACA	0	0	0		ACA	0	0	0		ACA	0	0	0
	GAG	11	4	3		ACC	7	7	7		ACC	7	7	7		ACC	7	7	7		ACC	7	7	7		ACC	7	7	7
GLY (G)	GGA	1	0	0	TRP (W)	ACG	4	0	0	TRP (W)	ACG	4	0	0	TRP (W)	ACG	4	0	0	TRP (W)	ACG	4	0	0	TRP (W)	ACG	4	0	0
	GGC	16	10	10		ACT	0	4	4		ACT	0	4	4		ACT	0	4	4		ACT	0	4	4		ACT	0	4	4
	GGG	3	0	0	TYR (Y)	TGG	7	7	7	TYR (Y)	TGG	7	7	7	TYR (Y)	TGG	7	7	7	TYR (Y)	TGG	7	7	7	TYR (Y)	TGG	7	7	7
	GGT	1	11	11		TAC	5	5	5		TAC	5	5	5		TAC	5	5	5		TAC	5	5	5		TAC	5	5	5
HIS (H)	CAC	7	10	10		TAT	2	2	2		TAT	2	2	2		TAT	2	2	2		TAT	2	2	2		TAT	2	2	2
	CAT	7	4	4	VAL (V)	GTA	0	3	3	VAL (V)	GTA	0	3	3	VAL (V)	GTA	0	3	3	VAL (V)	GTA	0	3	3	VAL (V)	GTA	0	3	3
	ATA	0	0	0		GTC	6	0	0		GTC	6	0	0		GTC	6	0	0		GTC	6	0	0		GTC	6	0	0
	ATC	10	7	7		GTG	7	5	5		GTG	7	5	5		GTG	7	5	5		GTG	7	5	5		GTG	7	5	5
	ATT	1	4	4		GTT	2	7	7		GTT	2	7	7		GTT	2	7	7		GTT	2	7	7		GTT	2	7	7
Totals		157	158	158	Totals		131	131	131	Totals		131	131	131	Totals		131	131	131	Totals		131	131	131	Totals		131	131	131

Es claro del examen de la Tabla Ex2-4 que las regiones codificantes nativa y optimizada E. coli, aunque codifican las proteínas casi idénticas, son sustancialmente diferentes una de la otra. La versión optimizada E. coli (v2) imita cercanamente la composición de codón de una región codificante E. coli teórica que codifica la proteína AAD- 13.

Ejemplo 3 – Clonación de vectores de expresión y transformación

3.1 Construcción del vector de expresión pET, E.coli.

Utilizando las enzimas de restricción que corresponden a los sitios agregados con los ligadores de clonación adicional (Xba 1, Xho 1) AAD-13 (v2) se corta del vector "picoscript", y se ligan en un vector resistente a pET280 estreptomycin/espectinomycin. Los productos de ligado luego se transforman en E. coli TOPIOF, y se colocan en placas en caldo de cultivo Luria + 50 µg/ml de placas de agar estreptomycin & espectinomycin (LB S/S).

Para diferenciar entre AAD-13 (v2): pET280 y los ligados pCR2.1: pET280, aproximadamente 20 colonias aislados se recogen en 6 ml de LB-S/S, y se hacen crecer a 37 °C durante 4 horas con agitación. Cada cultivo luego se mancha en placas LB + Kanamicina 50 µg/ml, que se incuban a 37 °C durante la noche. Las colonias que crecen en el LB-K se asume que tienen el vector pCR2.1 ligado en, y se descargan. Se aíslan plásmidos de los cultivos restantes como antes, y se revisa para corregir con la digestión por FspI. La construcción de expresión final se da del diseño pDAB4115.

3.3 – Terminación de vectores binarios.

El gen optimizado de planta AAD-13 (v1) se recibe del Picoscript (se completa el diseño de reconstrucción de gen (ver anterior) y externalizadas a Picoscript para construcción) El gen AAD- 13 (v1) se clona en pDAB4055 como un fragmento Nco I-Sac I. La construcción resultante se diseña pDAB4113, que contiene: [promotor AtUbi10: AAD-13 (v1): AtuORF1 3'UTR] (verificado con digestión de restricción Nco I y Sac I). Un fragmento Not I-Not I que contiene el casete descrito luego se clona en el sitio Not I del vector binario pDAB3038. El vector binario resultante, pDAB4114, que contiene el siguiente casete [promotor AtUbi10: AAD-13 (v1): AtuORF1 3'UTR: promotor CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR]

se digiere la restricción (con Sad) para verificación de la orientación correcta. Se utiliza la construcción completa verificada (pDAB4114) para transformación en *Agrobacterium* (ver Ejemplo 6).

5 Ejemplo 4 – Expresión Recombinante de AAD-13 y Purificación en *Pseudomonas fluorescens*

4.1- Fermentación de *Pseudomonas fluorescens*

10 Para el experimento de frasco agitado, se utilizarán 200 µl de la solución madre de glicerol de cepa *Pseudomonas fluorescens* que lleva la construcción AAD-13 (v1) (sec 3.2) para inocular 50 ml de medio fresco LB complementado con 30 µg/ml de tetraciclina/HCl. El cultivo (en un frasco de 250 ml Erlenmeyer con deflector) se incubará en un agitador (New Brunswick Scientific Modelo Innova 44) a 300 rpm y 30 °C durante 16 hrs. 20 ml del cultivo de semilla se transferirá a 1 L de medio de cultivo *Pseudomonas fluorescens* (extracto de levadura, 5 g/L; K₂HPO₄, 5 g/L; (NH₄)₂PO₄, 7.5 g/L; (NH₄)ISO₄; MgSO₄·7H₂O, 1 g/L; KCl, 0.5 g/L; CaCl₂·2H₂O, 0.5 g/L; NaCitrato·2H₂O, 15 g/L; Glicerol, 95 g/L; solución de elemento Traza, 10 ml/L; Solución de elemento traza: FeCl₃·OH₂O, 5.4 g/L; MnCl₂·4H₂O, 1 g/L; 2nSO₄·7H₂O, 1.45 g/L; CuSO₄·SH₂O, 0.25 g/L; H₃BO₃, 0.1 g/L; (NH₄)₆MO₇O₂₄, 0.1 g/L; HCl concentrado, 13 ml/L) complementado con 20 µg/ml de tetraciclina/HCl y 250 µl de Pluronic L61 (antiespuma) en un frasco de 2.8 L Erlenmeyer con deflector. Los cultivos se incuban a 30 °C y 300 rpm durante 24 hrs. Se agregará Isopropil β-D-1- tiogalacto-piranosida (IPTG) a 1 mM final en los cultivos y se continúa incubando durante aproximadamente 48 hrs a 25 °C. Se cosechan células mediante centrifugación a 7 krpm a 4 °C durante 15 min, y se

almacena la pasta de célula a -80 °C o se procesa inmediatamente para purificación.

Para experimentos de tanque, cada 1 ml de la solución madre de glicerol se
5 inoculará en un matraz de 1 L con deflector que contiene 200 ml de medio LB
complementado con 30 µg/ml tetraciclina/HCl a 300 rpm y 32 °C durante 16-24
hrs. El cultivo combinado de los tres frascos (600 ml) luego se transfiere
asépticamente a un fermentador de 20 L (B. Braun Bioreactor Systems) que
contiene 10 L de medio definido propietario Dow (a través de Teknova, Hollister,
10 CA) diseñado para soportar el crecimiento de alta densidad celular. Se mantiene
crecimiento de temperatura a 32 °C y el pH se controla en el punto establecido
deseado a través de la adición de amoníaco acuoso. Se mantendrá oxígeno
disuelto en un nivel positivo en el cultivo líquido al regular el flujo de aire esparcido
y los índices de agitación. El proceso de fermentación de tanda de carga se lleva a
15 cabo durante aproximadamente 24 hrs hasta que se alcanza la densidad celular
170-200 OD₅₇₅. El IPTG luego se agrega a 1 mM para inducir la expresión de
proteína recombinante y la temperatura se reduce y se mantiene a 25 °C utilizando
la circulación del suministro de agua fría. La fase de inducción de la fermentación
se le permitirá continuar durante otras 24 hrs. Se recolectan muestras (30 ml) para
20 varios análisis para determinar la densidad celular y el nivel de expresión de
proteína a 6, 12, y 18 hrs post-inducción de los puntos de tiempo. Al final de una
serie de fermentación, se cosechan células mediante centrifugación a 10 krpm
durante 30 min. Los glóbulos celulares luego se congelan a -80 °C para
procesamiento adicional.

4.2- Purificación de AAD- 13 para Caracterización Bioquímica y Producción de Anticuerpo

Aproximadamente 100-200 g de células *Pseudomonas* congeladas (o frescas) se descongelan y se resuspenden en 1-2 L de amortiguador de extracción que contiene 20 mM Tris-HCl, pH 8.5, y 25 ml de cóctel inhibidor de Proteasa (Sigma cat# P8465). La células se rompen utilizando Microfluidizador (modelo MI 10L o 1 10Y) (Microfluidics, Newton, MA) en hielo con un pase a 11,000-12,000 psi. El lisato se centrifuga a 24,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se transferirá y se dializará contra 10 volúmenes de 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 durante la noche a 4 °C, o se diafiltra con este amortiguador y se filtra a través de una membrana de 0.45 µm antes de aplicar a las separaciones de columna. Todas las separaciones de proteína posteriores se desarrollarán utilizando Pharmacia AKTA Explorer 100 y se operarán a 4 °C. Antes de cargar, una columna de Flujo Rápido Q Sefarosa (Pharmacia XK 50/00, tamaño de lecho 500) se equilibra con 20 mM de amortiguador Tris-HCl, pH 8.5. La muestra se aplica a la columna a 15 ml/min y luego se lava con este amortiguador hasta que el eluado OD₂₈₀ regresa a la línea base. Las proteínas se elúan con 2 L de gradiente lineal de 0 a 0.3 M NaCl en una velocidad de flujo de 15 ml/min, mientras se recolectan fracciones de 45 ml. Las fracciones que contienen actividad AAD- 13 como se determina por el ensayo de enzima colorimétrico y que también corresponden al peso molecular predicho de la proteína AAD- 13 (banda de aproximadamente 32 kDa en SDS-PAGE) se agrupan. Se agrega sulfato de amonio sólido a 0.5 M final a la muestra, y luego se aplica a una columna Fenil HP (Pharmacia XK 50/20, tamaño de lecho 250 ml) equilibrado en sulfato de amonio 0,5 M en 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. Esta columna se lava con amortiguador de unión a 10 ml/min hasta que el OD₂₈₀ del eluado regresa a la línea base, las proteína se eluan dentro de 2 volúmenes de columna a 10 ml/min mediante un gradiente lineal de 0.5 M a 0 de sulfato de amonio en 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, y se recolectan fracciones de 12.5 ml. Las fracciones pico

principales que contienen AAD- 13 se agruparán, y si es necesario, se concentrarán utilizando un dispositivo de filtro de centrifuga cortador de membrana MWCO 10 kDa (Millipore). En algunos casos la muestra se aplica adicionalmente a una columna de filtración de gel Superdex 75 (Pharmacia XK 16/60, tamaño de lecho 110 ml) con amortiguador PBS en una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se agrupan fracciones pico que contienen AAD- 13 puro y se almacenan a -80 °C para uso futuro.

Ejemplo 5 –Ensayos In vitro de actividad AAD- 13

5.1 – Ensayo por vía de detección de fenol calorimétrica.

Se medirá la actividad de enzima mediante detección calorimétrica del producto fenol utilizando un protocolo modificado de Fukumori y Hutilizer (1993) (J Biol, Chem. 268: 24311-24317) para permitir desarrollo en un formato de microplaca de 96 pozos. El ensayo calorimétrico se ha descrito para uso al medir la actividad de la división de dioxigenasas 2,4-D y diclorprop para liberar el producto 2,4-diclorofenol. La producción de color de varios fenoles se compara con aquel de 2,4-diclorofenol utilizando el método de detección previamente descrito para determinar qué productos de fenol se pueden detectar fácilmente. Se prueban fenoles y análogos fenol en una concentración final de 100 μ M en 0.15 ml 20 mM MOPS pH 6.75 que contiene 200 μ M $\text{NH}_4(\text{FeSO}_4)_2$, 200 μ M de ascorbato de sodio. Los piridinoles derivados de fluoxipir y triclopir no producen color significativo. La producción de color de 2,4-diclorofenol es lineal y proporcional a la concentración de fenol en el ensayo de hasta ~500 μ M. Una curva de calibración desarrollada bajo condiciones de ensayo estándar (volumen de ensayo final 160 μ l) indica que una absorbancia a 510 nm de 0.1 se obtiene de 17.2 μ M fenol.

Se desarrollan ensayos de enzima en un volumen total de 0.16 ml 20 mM MOPS pH 6.75 que contiene 200 μ M NH_4FeSO_4 , 200 μ M de ascorbato de sodio, 1 mM α -cetoglutarato, el sustrato apropiado (agregado de una solución madre de 100 mM hecha en DMSO), y enzima. Se inician ensayos mediante la adición del sustrato ariloxialcanoato, enzima o α -cetoglutarato en tiempo cero. Después de 5 minutos de incubación a 25° C, la reacción se termina mediante la adición de 30 μ l de una mezcla 1:1:1 de 50 mM amortiguador Na EDTA; pH 10 (3.09 g de ácido bórico + 3.73 g KCl + 44 ml 1 N KOH) y 0.2 % 4-aminoantipirina. Luego se agrega 10 μ l 0.8 % ferricianuro de potasio y después de 5 o 10 min, la absorbancia a 510 nm se registra en un lector de microplaca espectrofotométrico. Los paréntesis contienen todos los reactivos excepto de enzima para el conteo de la contaminación ligera ocasional de algunos de los sustratos mediante cantidades pequeñas de fenoles.

5.2 –Ensayo por vía de la detección de cloropiridinol

La acción AAD- 13 en sustratos potenciales tal como el herbicida triclopir que contiene una piridina sustituida (diferente de anillos benceno) liberará un piridinol en la división del enlace ariloxialcanoato. No se detectan piridinoles utilizando la detección de aminoantipirina/ferricianuro fenol descrita en la sección precedente. Sin embargo, se encuentra que el producto cloropiridinol absorbe fuertemente en el UV cercano con λ_{max} de 325 nm a pH 7 (coeficiente de extinción $-8,400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Esto se utiliza para crear un ensayo espectrofotométrico basado en microplaca continuo. Se desarrollan ensayos en un volumen total de 0.2 ml 20 mM MOPS pH 6.75 que contiene 200 μ M NH_4FeSO_4 , 200 μ M ascorbato de sodio, 1 mM α -cetoglutarato, el sustrato apropiado (agregado de una solución madre de

100 mM hecha en DMSO), y la enzima. Se inician ensayos mediante la adición de sustrato ariloxialcanoato, enzima o α -cetoglutarato en tiempo cero y el incremento en la absorbancia seguido durante 10 minutos a 325 nm en un lector de microplaca. Los primeros 2 minutos de la reacción se utilizarán para determinar los
5 índices iniciales.

5.3 – Ensayo calorimétrico utilizando 2-(2-cloro,4-nitrofenoxi)propionato

Se prevé un ensayo conveniente de AAD- 13 utilizando 2-(2-cloro,4-nitrofenoxi)propionato (CNPP) como sustrato. La división de CNPP by AAD- 13 liberará 2- cloro,4-nitrofenol. Este fenol tiene una absorbancia amarilla brillante a 410 nm a pH 7 posibilitando a la reacción seguir continuamente o mediante análisis de punto final. La presencia de la actividad de AAD- 13 se puede monitorear visualmente sin la necesidad de la adición de reactivos adicionales. Se
10 desarrollan ensayos espectrofotométricos basados en microplaca *en un volumen total de 0.2 ml* 20 mM MOPS pH 6.75 que contiene 200 μ M NH_4FeSO_4 , 200 μ M ascorbato de sodio, 1 mM o- cetoglutarato, la cantidad apropiada de CNPP (agregada de una solución madre de 10 mM hecha en DMSO), y la enzima. Se inician ensayos mediante la adición de CNPP, enzima, o α -cetoglutarato en tiempo
15 cero y el incremento en la absorbancia seguido durante 10 min a 410 nm en un lector de microplaca. Los primeros 2 min de la reacción se utilizarán para determinar los índices iniciales. Una curva de calibración desarrollada bajo condiciones de ensayo estándar (volumen de ensayo final 200 μ l) indica que una absorbancia a 410 nm de 0.1 se obtiene de 25.1 μ M 2-cloro, 4-nitrofenol.
20 Utilizando este ensayo, las constantes cinéticas para CNPP como un sustrato se determinan por ser $K_m = 31 \pm 5.5 \mu\text{M}$ y $k_{cat} = 16.2 \pm 0.79 \text{ min}^{-1}$.
25

5.4 – Ensayo Acoplado

Con el fin de probar un amplio rango de sustratos, la producción de succinato de la descomposición de α -cetoglutarato se detecta espectrofotométricamente utilizando un protocolo basado en el método de Luo et. al. (2006) (Anal. Biochem. 353: 69-74). Como se describe en la Figura 3, la descomposición concomitante de α -cetoglutarato y el sustrato de interés por vía de AAD- 13, resulta en la producción de succinato. Se modifica adicionalmente succinato de succinil-CoA mediante sintetasa succinil-CoA que consume ATP y produce ADP. El ADP luego se consume al emplear comúnmente el sistema de acoplamiento enzimático deshidrogenasa piruvato quinasa/lactato (Sigma P0294). La conversión resultante de NADH a NAD se monitorea espectrofotométricamente a 340 nm.

5.4.1 - Clonación y expresión de sintetasa succinil-CoA etiquetada His y AAD- 13 (v2)

Los dos genes *E. coli* que codifican la sintetasa, *sucC* y *sucD*, se amplifican de la parte superior de la cepa 10 de *E. coli* de Invitrogen como un único amplicón. Se obtiene ADN genómico al hervir una alícuota de células durante 10 min, luego centrifugar, y retener el sobrenadante que contiene el ADN, como plantilla para AAD- 13 (v2), se utiliza el clon pET creado previamente pDAB4115. Para amplificar los genes *sucCD*, se utilizan los siguientes cebadores: *suc*-Nde (SEQ ID 9) 5' CATATGAACTTACATGAATATCAGGC AAAAC 3' y *suc*-Xho (SEQ ID 10) 5' CTCGAGTTTCAGAACAGTTTTTCAGTGCTTC 3'. Para AAD-13 (v2), se utilizan los siguientes cebadores: *aad*-13F (SEQ ID 11) 5' CATATGGCGAGCCCGGCG 3' y *aad*-13R (SEQ ID 12) 5' CTCGAGGTGTGCCAGTGCGGTCTC 3'. Estos se

agregan adecuadamente a los sitios de restricción para la clonación en la dirección 3' y remueven el codón de parada para permitir el etiquetado His. Para la reacción, las condiciones de ciclo término son: 96 °C 2 min, luego 35 ciclos de: 96 °C 30 seg, 53 °C 30 seg, 72 °C 1.5 min, seguid por un ciclo final de 72 °C 5 min.

5 Los amplicones resultantes se subclonan para verificar la secuencia correcta. Los clones para cada uno que contienen el inserto correcto se digieren con NdeI/XhoI y los insertos luego se clonan en el vector de expresión pET-26b(+). Para expresión, se raspa una colonia de BL-21 E. coli transformada en 50 ml de LB + Kan (50 µg/ml) y se hace crecer a 37 °C durante 2 hrs. Se transfieren dos mililitros de este
10 cultivo en 100 ml de LB + Kan. Se hacen crecer las células en estos frascos a 37 °C durante 4 hrs. Se inducen células con 50 µM IPTG, y se hacen crecer durante la noche a 25 °C. Los cultivos se centrifugan, y el glóbulo celular se utiliza para la purificación de la proteína.

15 5.4.2 - Purificación de AAD-13 y sintetasa succinil CoA etiquetada His para identificación de sustrato in vitro

Se purifica AAD-13 etiquetado His utilizando protocolos de cromatografía de afinidad de metal con base en las direcciones del fabricante de columna. Los
20 glóbulos celulares cosechados de IL de cultivo y almacenados a -80 °C se descongelan y se resuspenden en 20 mL de amortiguador de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 8; 200-300 µL de cóctel de inhibidor proteasa (Sigma P8849), 1mg/mL lisozima, y 1 mM MgCl₂). Las células resuspendidas se incuban a temperatura ambiente durante 10-15 min antes de tratar con DNasa para reducir la viscosidad.
25 Se llevan a cabo todas las etapas posteriores a 4 °C. El extracto se centrifuga durante 20 min a 20,000 x g para clarificar. Utilizando una velocidad de flujo de 1mL/min, el sobrenadante resultante se aplica a cartuchos de 2 mL consecutivos

Co-M AC™ (EMD/Novagen 71650) previamente equilibrados con el amortiguador A (25 mM Tris pH 8.0, 0.5 M NaCl). Después que se carga el extracto, la columna se lava con 5 mM imidazol en el amortiguador A hasta que regresa el OD₂₈₀ a la línea base. La proteína se elua con 50 mM imidazol en amortiguador A. Las fracciones que contienen predominantemente AAD- 13 como se indica por una banda de aproximadamente 30 kDa en SDS-PAGE se intercambian en el amortiguador C (20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 2mM DTT) utilizando columnas de desalinización BG- 10 (Bio-Rad). Luego se ensaya AAD- 13 en el amortiguador C espectrofotométricamente de acuerdo con el ensayo de acoplamiento in vitro.

Se purifica sintetasa succinil CoA etiquetada His utilizando cartuchos consecutivos de 1mL Co- M AC™ (EMD/Novagen 71650) y protocolos basados en las direcciones del fabricante. Los glóbulos celulares que se han almacenado a -80 °C se descongelan y resuspenden en 50 mL de amortiguador de extracción (100 mM Tris pH 7.2, 200-300 µL de cóctel de inhibidor proteasa (Sigma P8849), 1mg/mL lisozima, y 1 mM MgCLz) por L de cultivo celular. Se incuban células resuspendidas a temperatura ambiente durante 10-15 min antes de tratar con DNasa para reducir la viscosidad. Todas las etapas posteriores se llevan a cabo a 4 °C a menos que se indique otra cosa. El extracto se centrifuga durante 20 min a 20,000 x g para clarificar. En este punto, el sobrendante se puede aplicar directamente a cartuchos Co-MAC™ pre-equilibrados con amortiguador de unión (0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9 y 5mM imidazol) o se traen en 80% sulfato de amonio. La muestra tratada de sulfato de amonio se centrifuga durante 20 min a 20,000 x g para el glóbulo de proteína. El glóbulo se resuspende en el amortiguador A (20 mM Tris-HCl pH 8.0 y 0.5M NaCl) y se remueve el sulfato de amonio residual utilizando columnas de desalineación BG-10 (Bio-Rad) pre-equilibradas con el amortiguador A. Las muestras resultantes se aplican a

cartuchos Co-MAC™ pre-equilibrados con amortiguador de unión y una velocidad de flujo de mL/min. Luego de la aplicación de la columna extraída, la columna se enjuaga con 10 volúmenes de columna de 0.5% del amortiguador B (20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, y 1 M imidazol). Esto se sigue por un gradiente de etapa de 5 volúmenes de columna de 6% del amortiguador B y un gradiente de etapa de 10 volúmenes de adicionales de columna de 50% amortiguador B. La mayoría de la proteína deseada se eluye con el gradiente de 6% del amortiguador B. Las fracciones que contienen sintetasa succinil CoA se identifican por la presencia de dos bandes correspondientes a las subunidades sintetasa succinil CoA (~40 & 33 kDa) por vía de SDS PAGE y la detección de la actividad in vitro correspondiente. Se confirma la actividad sintetasa succinil CoA utilizando una versión modificada del ensayo de acoplamiento in vitro adelante. En resumen, se monitorea el progreso de la reacción espectrofotométricamente en series 340 en la presencia de 100 mM tris pH 8.0, 1 mM PEP 0.4 mM NADH 10 mM MgCl₂, 0.2 mM CoA, 0.2 mM ATP, 3.5 U/mL PK, 5 U/mL LDH, y SCS. Se inicia la reacción mediante la adición de 1 mM succinato.

5.4.3- Ensayo acoplado In vitro

La identificación de sustratos AAD-13 (v2) in vitro se basa en la actividad enzimática detectada durante el monitoreo espectrofotométrico continuo de un volumen de reacción de 0.2 mL en una placa de microtítulo de 96 pozos. Las condiciones de reacción son como sigue: 100 mM MOPS pH 7.0, 0.4 mM NADH, 0.4 mM ATP, 0.4 mM CoA, 1mM PEP, 10mM MgCl₂, 0.1 mM FeSO₄ (solubilizado en HCl), y 0.1 mM ascorbato, 1 mM α -cetoglutarato y suficiente AAD- 13 (v2) para producir un índice observable en la presencia de 2,4-D. Se ajustan las enzimas de acoplamiento (SCS/PK/LDH) por tanda para asegurar acoplamiento adecuado, y

los sustratos potenciales se ensayan generalmente en 1mM. Las alteraciones en las concentraciones de se hacen según se necesite para ajustar la solubilidad. Se inician las reacciones mediante la adición de AAD- 13 (v2) o sustrato potencial. El índice de conversión independiente de sustrato de α -cetoglutarato a succinato por AAD se monitorea bajo las condiciones de ensayo anteriores y sustrae de los índices de reacción observados. Los índices de reacción observados con sustratos propionato se dividen en dos para ajustar la producción de piruvato resultante de la división de estos compuestos por vía de AAD. Adicionalmente, se revisan los compuestos propionato para contaminación de piruvato al monitorear espectrofotométricamente el consumo de NADH en la presencia del compuesto y PK/LDH.

5.4.4. Resultados de detección In vitro

La Tabla Ej5 exhibe el índice de reacción AAD-13 (v2) observado con múltiples químicas por vía del ensayo acoplado in vitro. Los índices de reacción se reportan como un porcentaje del índice de reacción 2,4-D obtenido en el mismo conjunto de muestras. Estos datos se pueden utilizar para segregar cualitativamente sustratos de no sustratos, así como también identificar tendencias en eficiencia del sustrato. Se debe notar que los índices más rápidos pueden ser más difíciles de comparar exactamente dependiendo del porcentaje de sustrato disponible consumido. Esto es particularmente verdadero si los compuestos propionato que exhiben dos veces el índice como compuestos no propionato para el número equivalente de metabolismo de enzimas. Como un resultado, los sustratos altamente eficientes se agruparán apropiadamente cuando se compara con sustratos de baja eficiencia. Dentro del agrupamiento de sustratos altamente eficientes sin embargo, los compuestos no se pueden separar cuantitativamente

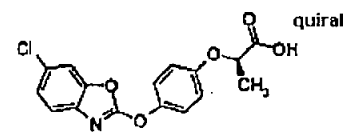
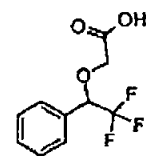
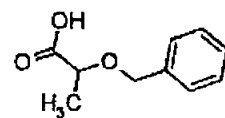
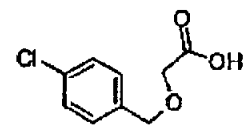
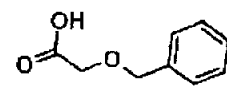
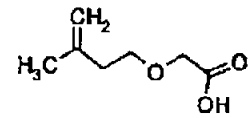
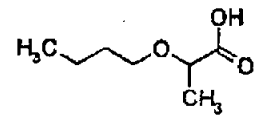
mediante una detección utilizando índices únicos de sustrato y AAD. Los compuestos denotados con un asterisco se prueban a 0.5 mM en lugar de 1 mM debido a la interferencia de la absorbancia en concentraciones mayores.

5

Tabla Ej5

Nombre	X#	Sustrato Y/N	% de 24D actividad
	181718	y	66
	571320	y	39
	93116	y	128
	475728	y	112
	118942	y	46
	470801	y	30
R-fenoxaprop	11044492	N	2

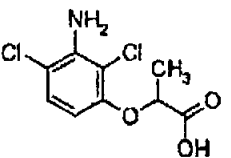
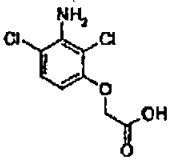
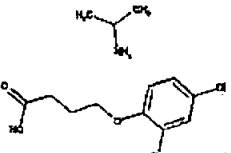
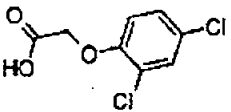
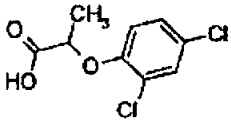
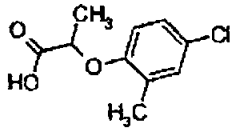
ESTRUCTURA MOL



quiral

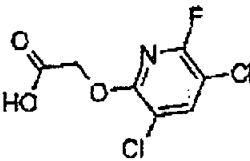
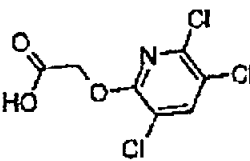
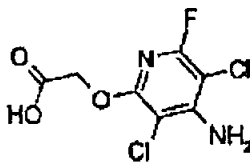
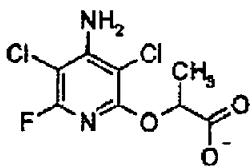
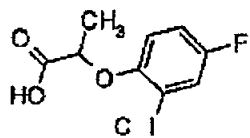
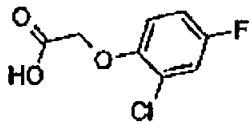
Nombre	X#	Sustrato Y/N	% de 24D actividad
	188874		
Mecoprop		y	169
r diclorprop			19
	117613		
r,s diclorprop		Y	195
S-diclorprop		y	233
2,4-D			
	195517 178577	y	100
24DB		N	2
	11263526		
3-amino 24D		y	151
	11113675	y	113

ESTRUCTURA MOL



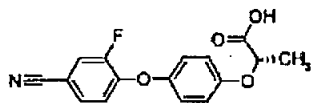
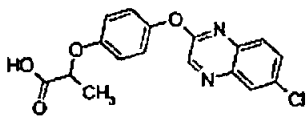
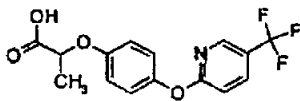
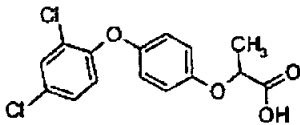
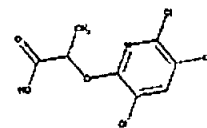
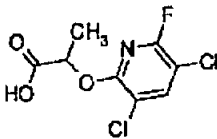
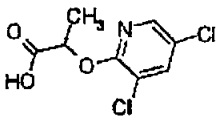
Nombre	X#	Sustrato Y/N	% de 24D actividad
	124988		
		y	44
	83293		
		y	106
	11182286		
alfa metil fluoroxiprop		y	43
	88316		
fluoroxiprop		y	67
	156136		
triclopir		N	6
	93833		
		y	33

ESTRUCTURA MOL:



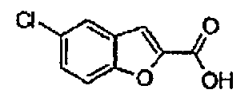
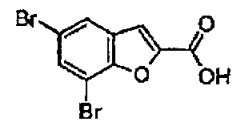
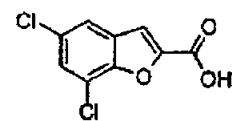
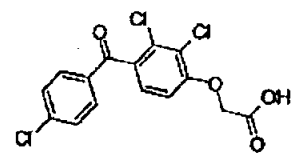
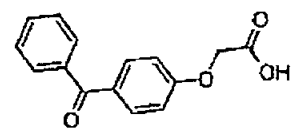
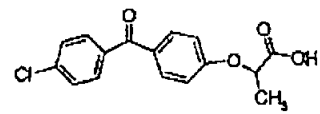
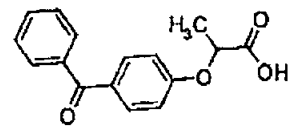
Nombre	X#	Sustrato Y/N	% de 24D actividad
	66357		
		y	24
	91767		
		y	88
	116844		
		y	25
	460511		
diclofop		y	>100
	67131		
fluazifop		y	~50
	44936*		
quizalofop		Y	
	7486		
cihalofop		y	

ESTRUCTURA MOL



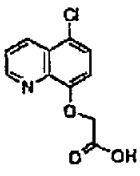
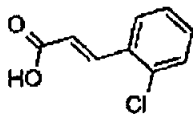
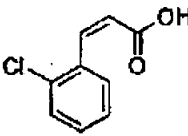
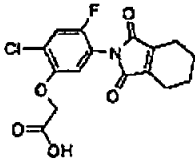
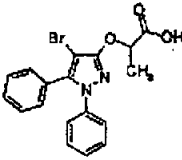
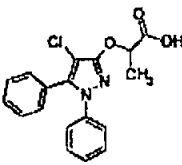
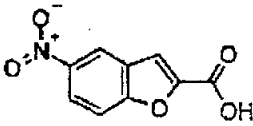
Nombre	X#	Sustrato Y/N	% de 24D actividad
	86732		
		y	>100
	8563		
		y	64
	193908		
		y	56
	761310*		No Detectado
	11077344*		No Detectado
	198167		No Detectado
	11077347*		No Detectado

MOL.STRUCTURE



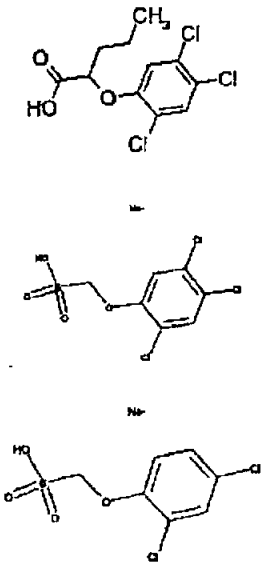
Nombre	X#	Sustrato Y/N	% de 24D actividad
	238166*		No Detectado
	657338	N	5
	657339	N	5
	11213586 +	N	2
	11453845	N	13
	187507	N	10
	204558*		No Detectado

ESTRUCTURA MOL



Nombre	X#	Sustrato Y/N	% de 24D actividad
	188485		
		M	19
	187439		No Detectado
	1190305		No Detectado

ESTRUCTURA MOL



El AAD- 13 no es similar a otras dioxigenasas dependientes de α-cetoglutarato reportado quienes tienen actividad degradante 2,4-D. Una distinción clave es la amplia disposición de los sustratos ariloxy y alquiloxy, pero un número de sustitutos piridiloxy son herbicidas y sustratos efectivos (por ejemplo, fluroxipir) pero otros herbicidas como triclopir son sustratos considerablemente pobres. Esto crea una nueva oportunidad para utilizar herbicidas alternativos para el control de plantas transgénicas con sustratos AAD- 13. Esto también proporciona oportunidad para complementar genes similares en plantas amplias en tolerancia o que mejoran la amplitud de sustratos a los que son tolerantes las plantas.

Ejemplo 6 - Transformación en Arabidopsis y Selección

6.1 —condiciones de crecimiento de Arabidopsis thaliana

Se suspenden semillas Arabidopsis tipo natural en una solución de 0.1% Agarosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La semilla suspendida se almacena

a 4° C durante 2 días para completar los requerimientos de latencia y asegurar la germinación de la semilla sincrónica (estratificación).

Se recupera la Mezcla Sunshine LP5 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) con vermiculita fina y se sub-irriga con solución de Hoagland hasta que se humedece. La mezcla de se le permite drenar durante 24 horas. Las semillas estratificadas se sembraron en la vermiculita y se cubren con domos húmedos (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 7 días.

Se hacen germinar las semillas y se hacen crecer las plantas en un Conviron (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) bajo condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una intensidad de luz de 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ bajo temperatura constante (22° C) y humedad (40-50%). Se riegan inicialmente las plantas con solución de Hoagland y posteriormente con agua desionizada para mantener el suelo húmedo pero no mojado.

6.2 - Transformación de *Agrobacterium*.

Un LB + placa agar con eritromicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (200mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) que contiene una colonia DH5 α estriada se utiliza para proporcionar una colonia para inocular 4 ml de cultivos mini prep (líquido LB + eritromicina). Se incuban los cultivos durante la noche a 37° C con agitación constante. Se utilizan Qiagen (Valencia, CA) Spin Mini Preps, desarrollados por las instrucciones del fabricante, para purificar el ADN de plásmido.

Las células de *Agrobacterium tumefaciens* electro competentes (cepas Z707s, EHA101s, y LBA4404s) se preparan utilizando un protocolo de Weigel y Glazebrook (2002), Se transforman las células de *Agrobacterium* competentes utilizando un método de electroporación adaptado de Weigel y Glazebrook (2002).

5 50 µl de células agro competentes se descongelan en hielo, y se agrega 10-25 ng del plásmido deseado a las células. Se agrega el ADN y mezcla celular a cubetas de electroporación preenfriadas (2 mm). Se utiliza un Electroporador Eppendorf 2510 para la transformación con las siguientes condiciones, Voltaje: 2.4 kV, Duración de impulso: 5 mseg.

10 Después de la electroporación, se agrega 1 ml de caldo YEP (por litro: 10 g de extracto de levadura, 10 g de Bacto- peptona, 5 g de NaCl) a la cubeta, y la suspensión YEP-célula se transfiere a un tubo de cultivo de 15 ml. Se incuban las células a 28° C en un baño de agua con agitación constante durante 4 horas.

15 Después de la incubación, se coloca en lacas el cultivo en YEP + agar con eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (250 mg/L). Se incuban las placas durante 2-4 días a 28° C.

Se seleccionan las colonias y se mantienen en placas YEP + agar frescas
20 con eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomina (250 mg/L) y se incuban a 28° C durante 1-3 días. Se seleccionan las colonias para análisis PCR para verificar la presencia del inserto de gen al utilizar cebadores específicos de vector. Se utilizan Qiagen Spin Mini Preps, desarrollados por instrucciones del fabricante, para purificar el ADN de plásmido de colonias de
25 *Agrobacterium* seleccionadas con la siguiente excepción: se utilizan 4 ml de alícuotas de un cultivo mini prep 1 de 5 ml durante la noche (YEP líquido + eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L)) y estreptomina (250

mg/L)) para la purificación de ADN. Una alternativa para utilizar ADN de Qiagen Spin Mini Prep, se lisan las células *Agrobacterium* transformadas, se suspenden en 10 µl de agua, a 100° C durante 5 minutos. Se incluye ADN de plásmido del vector binario utilizado en la transformación de *Agrobacterium* como un control. Se completa la reacción PCR utilizando polimerasa ADN Taq de Takara Mirus Bio Inc. (Madison, Wisconsin) por instrucciones del fabricante a 0.5x de concentraciones. Se llevan a cabo las reacciones PCR en un Variador Térmico MJ Research Peltier programado con las siguientes condiciones; 1) 94° C durante 3 minutos, 2) 94° C durante 45 segundos, 3) 55° C durante 30 segundos, 4) 72° C durante 1 minuto, durante 29 ciclos luego 1 ciclo de 72° C durante 10 minutos. La reacción se mantiene a 4° C después de ciclización. Se analiza la amplificación mediante 1% de electroforesis de gel de agarosa y se visualiza mediante tinte con bromuro de etidio. Se selecciona una colonia cuyo producto PCR es idéntico al control de plásmido.

6.3 – Transformación de *Arabidopsis*.

Se transforma el *Arabidopsis* utilizando el método de inmersión floral. Se utiliza la colonia seleccionada para inocular uno o más pre-cultivos de 15-30 ml de caldo YEP que contiene eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomycin (250 mg/L). Se incuba el cultivo(s) durante la noche a 28° C con agitación constante a 220 rpm. Cada precultivo se utiliza para inocular dos cultivos de caldo YEP de 500 ml que contienen eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomycin (250 mg/L) y se incuban los cultivos durante la noche a 28° C con agitación constante. Las células se granulan luego a aproximadamente 8700x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se desecha el sobrenadante resultante. Se resuspende gentilmente el sedimento

celular en 500 ml de medio de infiltración que contiene: 1/2x de sales de Murashige and Skoog/vitaminas B5 de Gamborg, 10% (w/v) de sacarosa, 0.044 μ M de purina bencilamino (10 μ l/litro de 1 mg/ml almacenado en DMSO) y 300 μ l/litro de Silwet L-77. Se sumergen plantas de aproximadamente 1 mes de edad en el medio durante 15 segundos, asegurando que se sumerja la inflorescencia más nueva. Luego se colocan las plantas en sus lados y se cubren (transparentes u opacos) durante 24 horas, luego se lavan con agua, y se colocan en posición vertical. Se hacen crecer las plantas a 22° C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Aproximadamente 4 semanas después de inmersión, se cosechan las semillas.

6.4 - Selección de plantas transformadas.

Se permite secar semillas T₁ cosechadas recientemente [AAD-13 (v1) gen] durante 7 días a temperatura ambiente. Se siembra la semilla T₁ en bandejas de germinación de 26.5 x 51 -cm (T.O. Plastics Inc., Clearagua, MN), cada una recibe alícuotas de 200 mg de semilla T₁ estratificada (~10,000 semillas) que se han suspendido previamente en 40 ml de 0.1% de solución de agarosa y almacenado a 4° C durante 2 días para completar los requisitos de latencia y asegurar la germinación de semilla síncrona.

Se cubre Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) con vermiculita fina y se subirriga con solución de Hoagland hasta que está húmedo, luego se le permite drenar por gravedad. Cada 40 ml de alícuota de semilla estratificada se siembra uniformemente sobre la vermiculita con una pipeta y se cubre con bóvedas de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4-5 días. Se remueven las bóvedas 1 día antes de la selección de

transformantes iniciales utilizando rociado postemergencia de glufosinato (que se selecciona para el gen *PAT* cotransformado).

Siete días después de plantar (DAP) y se rocían de nuevo plantas T_1 , 11
5 DAP (cotiledón y etapa de 2-4-If, respectivamente) con 0.2% de una solución de herbicida Liberty (200 g ai/L de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) en un volumen de rociado de 10 ml/bandeja (703 L/ha) utilizando una boquilla para rociador de aire comprimido DeVilbiss para suministrar un índice efectivo de 280 g ai/ha de glufosinato por aplicación. Se identifican los sobrevivientes (plantas
10 que crecen activamente) 4-7 días después del rociado final y se transplantan individualmente en macetas de 3 pulgadas con medio de encapsulamiento (Metro Mix 360). Se cubren las plantas transplantadas con bóvedas de humedad durante 3-4 días y se colocan en una cámara de crecimiento a 22° C como antes o se llevan directamente al invernadero. Se remueven posteriormente las bóvedas y se
15 crían las plantas en el invernadero (22±5° C, 50±30% de RH, 14 h de luz: 10 de oscuridad, mínimo 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ natural + luz de complemento) por lo menos 1 día antes de prueba para la capacidad de AAD- 13 (v1) para proporcionar resistencia herbicida a fenoxi auxina.

20 Luego se asignan en forma aleatoria las plantas T_1 a varios índices de 2,4-D. Para la *Arabidopsis*, 50 g ae/ha de 2,4-D es una dosis efectiva para distinguir plantas sensibles de otras con niveles significativos de resistencia. También se aplican índices elevados para determinar niveles relativos de resistencia (280, 560, 1120, o 2240 g ae/ha). Las Tablas 11 y 12 muestran las comparaciones
25 hechas a un gen de resistencia a herbicida ariloxialcanoato (AAD-12 (v1)) previamente descrito en la PCT/US2006/042133.

Se hacen todas las aplicaciones de herbicida auxina utilizando el rociador DeVilbiss como se describió anteriormente para aplicar 703 L/ha volumen de rociado (0.4 ml de solución/maceta de 3 pulgadas) o se aplica mediante rociador de pista en un volumen de rociado 187 L/ha. El 2,4-D utilizado es de grado técnico (Sigma, St. Louis, MO) se disuelve en DMSO y se diluye en agua (<1% concentración final de DMSO) o la formulación de sal de dimetilamina comercial (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO). El diclorprop utilizado es de grado comercial formulado como sal de potasio de R-diclorprop (600 g ai/L, AH Marks). Como índices de herbicida incrementados más allá de 800 g ae/ha, el pH de la solución de rociado llega a ser excesivamente ácido, quemando las hojas jóvenes, de las plantas tiernas de *Arabidopsis* y complicando la evaluación de los efectos primarios de los herbicidas.

Se someten algunos individuos T_1 a herbicidas comerciales alternativos en lugar de una auxina fenoxi. Un punto de interés es determinar si los herbicidas auxina piridiloxiacetato, triclopir y fluroxipir, se pueden degradar efectivamente en la planta. Se aplican los herbicidas a plantas T_1 con uso de un rociador de pista en un volumen de rociado 187 L/ha. Las plantas T_1 que exhiben tolerancia a 2,4-D DMA se accedan adicionalmente en la generación T_2 .

20

6.5 - Resultados de la selección de plantas transformadas.

Se conducen las primeras transformaciones de *Arabidopsis* utilizando AAD-13 (v1) (gen optimizado de planta). Se seleccionan primero los transformantes T_1 de los fondos de semillas no transformadas utilizando un esquema de selección de glufosinato. Se detecta 160,000 semillas T_1 y se detectan 238 plantas resistentes a glufosinato (gen PAT), que equivale a una frecuencia de

25

transformación/selección de 0.15% que se encuentra en el rango normal de frecuencia de selección de construcciones donde se utilizan PAT + Liberty para selección. Las plantas T_1 seleccionadas anteriormente se trasplantan posteriormente a macetas individuales y se rocían con varios índices de herbicidas de ariloxialcanoato comerciales. La Tabla 11 compara la respuesta de AAD-13 (v1) y genes de control para impartir resistencia 2,4-D a transformantes T_1 de *Arabidopsis*. La respuesta se presenta en términos de % lesión visual 2 WAT. Se presentan los datos como un histograma de individuos que exhiben poca o ninguna lesión (<20%), lesión moderada (20-40%), o lesión severa (>40%). Se presenta una media aritmética y desviación estándar para cada tratamiento. El rango en la respuesta individual también se indica en la última columna para cada índice y transformación. La *Arabidopsis* transformada PAT/Cry1F sirve como un control transformado sensible a auxina. El gen AAD-13 (v1) imparte resistencia herbicida a plantas de *Arabidopsis* T_1 individual. Dentro de un tratamiento dado, el nivel de respuesta de planta varía grandemente y se puede atribuir al hecho de que cada planta representa un evento de transformación independiente. Nota importante, en cada índice 2,4-D probado, existen individuos que no son afectados aunque algunos son afectados severamente. Un promedio de lesión de población total por índice se presenta en la Tabla 11 simplemente para demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con AAD-13 (v1) versus el AAD-12 (v1) o controles transformados con PAT/Cry1F. En altos índices la solución de rociado llega a ser altamente ácida a menos que sea amortiguada por lo tanto algunas de las lesiones se pueden atribuir a la acidez de la solución de rociado. El crecimiento más grande de *Arabidopsis* en la cámara de crecimiento tiene una cutícula muy delgada y los efectos de quemado severos pueden complicar la prueba en estos índices elevados. Sin embargo, muchos individuos han sobrevivido en 2,240 g ae/ha 2,4-D con poca o ninguna lesión.

Tabla 11. Respuesta de Arabidopsis T1 transformada con AAD-13 (v1) a un rango de índices 2,4-D aplican pre-emergencia, comparado con una población resistente homocigota (Ta) AAD-12 v1, o un Pat-Cry1F transformada, sensible a auxina						
plantas T ₁ gen AAD-13 (v1)	% de Lesión			% de Lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Pro.	Des. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
280 g ae/ha 2,4-D DMA	12	4	4	21	31	0-90
560 g ae/ha 2,4-D DMA	17	2	0	2	6	0-20
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	2	4	0-10
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	14	3	3	15	23	0-70
PAT/Cry1F (control transformado)	% de Lesión			% de Lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Pro.	Des. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
280 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
560 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	20	100	0	100
plantas T ₁ gen AAD-12 (v1)	% de Lesión			% de Lesión		
homozigotas	<20%	20-40%	>40%	Pro.	Des. Est.	Rango (%)
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Pro.	Des. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
280 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	0	0	0
560 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	1	3	0-10
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	20	0	0	2	4	0-15
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	16	3	1	13	13	0-50

La Tabla 12 muestra una respuesta de dosis conducida de forma similar de *Arabidopsis* T₁ al ácido fenoxipropiónico, diclorprop. Los datos muestran que el isómero (R-) herbicidamente activo de diclorprop no sirve como un sustrato adecuado para AAD-13 (v1) o AAD-12 (v1). El hecho de que AAD-1 (v3) metabolizará el R-diclorprop lo suficientemente bien como para impartir tolerancia comercialmente aceptable es una característica distintiva que separa los tres genes (Tabla 12 y Ejemplo 7 de la PCT/US2006/042133 (Wright et al., presentado Octubre 27, 2006). Se consideran el AAD-1 y AAD-13 dioxigenasas α-cetoglutarato específicas a R y S, respectivamente.

Tabla 12. Respuesta de Arabidopsis T1 a un rango de índices aplicados postemergencia (14 DAT)						
plantas T ₁ gen AAD-13 (v1)		% de Lesión			% de Lesión	
Promedios		<20%	20-40%	>40%	Pro.	Des. Est. Rango (%)
0 g ae/ha		20	0	0	0	0 0
800 g ae/ha de R-dicloroprop		0	0	20	100	0 100
Tipo natural (control no transformado)		% de Lesión			% de Lesión	
Promedios		<20%	20-40%	>40%	Pro.	Des. Est. Rango (%)
0 g ae/ha		20	0	0	0	0 0
800 g ae/ha de R-dicloroprop		0	0	20	100	0 100
plantas T ₄ gen AAD-12 (v1) homocigotas		% de Lesión			% de Lesión	
Promedios		<20%	20-40%	>40%	Pro.	Des. Est. Rango (%)
0 g ae/ha		20	0	0	0	0 0
800 g ae/ha de R-dicloroprop		0	0	20	100	0 100

6.6 - AAD-13 (v1) como un marcador seleccionable.

5 La capacidad para utilizar AAD-H (v1) como un marcador seleccionable
utilizando 2,4-D como el agente de selección será analizado con *Arabidopsis*
transformada como se describió anteriormente. Aproximadamente 50 de semilla
de *Arabidopsis* de generación T₄ (homocigoto para AAD-13 (v1)) se dispara en
aproximadamente 5,000 semilla tipo natural (sensible). Se compararán varios
10 tratamientos, cada bandeja de plantas recibirá uno o dos tiempos de aplicación de
2,4-D en una de los siguientes esquemas de tratamiento: 7 DAP, 11 DAP, o 7
seguido por 11 DAP. Debido a que todos los individuos también contienen el gen
PAT en el mismo vector de transformación, se puede comparar directamente en
AAD-13 seleccionado con 2,4-D con el PAT seleccionado con glufosinato.

15

Se pueden aplicar los tratamientos con una boquilla de rociador DeVilbiss
como se describió previamente. Se identificarán las plantas como Resistentes o
Sensibles 17 DAP. El tratamiento óptimo de 75 g ae/ha 2,4- D aplicado 7 y 11 días
después de plantar (DAP), es igualmente efectivo en la frecuencia de selección, y
20 resulta en menos lesión herbicida a los individuos transformados que el esquema

de selección Liberty. Estos resultados indicarán que se puede utilizar efectivamente el AAD-13 (v1) como un marcador seleccionable alternativo para una población de *Arabidopsis* transformada.

6.7 - Herencia.

Una variedad de evento T_1 se autopolinizan para producir semilla T_2 . Se prueban en descendientes de estas semillas al aplicar Liberty (280 g ae/ha) a 100 hermanos T_2 aleatorios. Cada planta T_2 individual se trasplanta a macetas cuadradas de 7.5 cm antes de aplicación por rociado (rociador de pista a 187 L/ha de índice de aplicación). Cincuenta por ciento de las familias T_1 (plantas T_2) segregadas en el modelo Resistente 3 anticipado: Sensible 1 para un único locus heredado dominante con herencia mendeliana como se determina por análisis de Chi cuadrado ($P > 0.05$).

Se recolectan las semillas de 12 a 20 individuos T_2 (semilla T_3). Veinticinco hermanos T_3 de cada uno de las ocho familias T_2 seleccionadas aleatoriamente se prueban en descendientes como se describió previamente. La mitad de las familias T_2 probados son homocigotos (poblaciones no segregadas) en cada línea. Estos datos mostrarán que el AAD-13 (v1) se integra establemente y en una forma Mendeliana a por lo menos tres generaciones.

6.8 - Resistencia a herbicida en aplicaciones foliares adicionales en *Arabidopsis* AAD- 13.

La capacidad de AAD-13 (v1) para proporcionar resistencia a otros herbicidas de auxina ariloxialcanoato en *Arabidopsis* trnasgénica se determina por

aplicación foliar de varios sustratos. Se estratifica la semilla de *Arabidopsis* de generación T₂, y se siembra en bandejas seleccionadas más similares que las de la *Arabidopsis* (Ejemplo 6.4). Se planta una línea de control que contiene *PAT* y el gen *Cry1F* resistente a insecto en una forma similar. Se transfieren las plántulas a macetas de 3 pulgadas individuales en el invernadero. Se rocían todas las plantas con el uso de un conjunto de rociador de pista a 187 L/ha. Se rocían las plantas con una rango de herbicidas de piridiloxiacetato: 200-800 g ae/ha de triclopir (Garlon 3A, Dow AgroSciences) y 200-800 g ae/ha de fluroxipir (Starane, Dow AgroSciences). El metabolito 2,4-D resultante de la actividad de AAD- 13, 2,4-diclorofenol (DCP, Sigma) (en un equivalente molar a 280-2240 g ae/ha de 2,4- D, grado técnico también se probará. Se formulan todas las aplicaciones en agua. Se replica cada tratamiento 3 a 4 veces. Se evalúan las plantas en 3 y 14 días después de tratamiento.

También se protegen claramente las plantas transformadas AAD-13 de lesión con herbicida fluroxipir que se ve en la línea de control transformada, el Pat/Cry1F (ver Tabla 13); sin embargo, se lesionan severamente las plantas transformadas AAD-13 (v1) mediante triclopir. Estos resultados confirman que el AAD-13 (v1) in *Arabidopsis* proporciona resistencia a las auxinas piridiloxiacéticas probadas. El gen AAD-13 (v1) proporciona resistencia robusta hasta 400 g ae/ha de fluroxipir, si el gen AAD-12 (v1) proporciona solo un nivel modesto de tolerancia tan bajo como 200 g/ha. El gen AAD-13 (v1) proporciona significativamente menor tolerancia al triclopir que al gen AAD-12 (v1). La significativamente mayor tolerancia a fluroxipir es inesperada y permite la distinción de la actividad tipo AAD-13 (v1) de AAD- 12 (v1) y se soporta por los datos enzimáticos del Ejemplo 5.

Tabla 13. Comparación de T2 AAD-13 (v1) y respuesta de planta de <i>Arabidopsis</i> de control transformado en vario herbicidas de auxina aplicados foliarmente			
auxinas piridiloxiacéticas			
Tratamiento Herbicida	% Pro. de Lesión 14DAT		
	Segregar plantas AAD-13 (v1) (pDAB4114.01.094)	plantas AAD-12 T4 (v1) homocigotas	control Pat/CryIF
200 g ae/ha de triclopir	75	25	100
400 g ae/ha de triclopir	90	33	100
800 g ae/ha de triclopir	100	79	100
200 g ae/ha de fluroxipir	10	48	100
400 g ae/ha de fluroxipir	16	55	100
800 g ae/ha de fluroxipir	55	60	100

Ejemplo 7 - Transformación de especies de cultivo adicionales

5 Se puede transformar el maíz para proporcionar altos niveles de resistencia a 2,4-D y fluroxipir al utilizar las mismas técnicas descritas previamente en el Ejemplo #8 de la WO 2007/053482 (PCT/US2006/042133 (Wright et al.).

10 Se puede transformar la soya para proporcionar altos niveles de resistencia a 2,4-D y fluroxipir al utilizar las mismas técnicas previamente descritas en el Ejemplo #11 o Ejemplo #13 de la WO 2007/053482 (PCT/US2006/042133 (Wright et al.)).

15 Se puede transformar el algodón para proporcionar altos niveles de resistencia a 2,4-D y fluroxipir al utilizar las mismas técnicas previamente descritas en los Ejemplos #14 de la solicitud de patente PCT/US2005/014737 (Wright et al., presentada en Mayo 2, 2005) o Ejemplo #12 de la WO 2007/053482 (Wright et al.).

20 Se puede transforma la canola para proporcionar altos niveles de resistencia a 2,4-D y fluroxipir al utilizar las mismas técnicas previamente descritas en el Ejemplo #26 de la solicitud de patente PCT/US2005/014737 (Wright et al.,

presentada en Mayo 2, 2005) o Ejemplo #22 de la WO 2007/053482 (Wright et al.).

5 Ejemplo 8 - Detección de proteína de plantas no transformadas por vía de anticuerpo

Se pueden desarrollar los anticuerpos y posteriores ensayos ELISA assays e implementar como se describe en el Ejemplo 9 de la WO 2007/053482 (Wright et al.), por ejemplo.

10

Ejemplo 9 – Transformación de Tabaco

La transformación del tabaco con *Agrobacterium tumefaciens* se lleva a cabo mediante un método similar, pero no idéntico, para publicar métodos (Horsch et al., 15 1988). Para proporcionar el tejido fuente para la transformación, se esteriliza la superficie de la semilla de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. KYI 60) y se planta en la superficie del medio TOB, que es un medio Murashige y Skoog libre de hormona (Murashige y Skoog, 1962) se solidifica con agar. Las plantas se hacen crecer durante 6-8 semanas en un incubador de luz ambiente 28-30° C y se recolectan 20 las hojas en forma estéril para uso en el protocolo de transformación. Las piezas de aproximadamente un centímetro cuadrado se corta en forma estéril de estas hojas, excluyendo el midrib. Los cultivos de las cepas *Agrobacterium* (EHA105 que contiene pDAB3278, aka pDAS1580, AAD-1S (v1) + PAT), se hacen crecer durante la noche en un matraz en un agitador establecido a 250 rpm a 28° C, se 25 pela en una centrifuga y se resuspende en sales Murashige & Skoog estériles, y se ajusta a una densidad óptica final de 0.5 at 600 nm. Las piezas de hoja se sumergen en esta suspensión bacteriana durante aproximadamente 30 segundos,

luego se transfieren secas a toallas de papel estériles y se coloca el lado derecho hacia arriba en medio TOB+ (medio Murashige y Skoog que contiene 1 mg/L de ácido acético indol y 2.5 mg/L benciladenina) y se incuba en la oscuridad a 28° C. Dos días después las piezas de la hoja se mueven a medio TOB+ que contiene
5 250 mg/L de cefotaxima (Agri-Bio, North Miami, Florida) y 5 mg/L de glufosinato amonio (ingrediente activo en Basta, Bayer Crop Sciences) y se incuba a 28-30° C en la luz. Se mueven las piezas de la hoja para medio TOB+ fresco con cefotaxima y Basta dos veces por semana durante las primeras dos semanas y una vez por semana de ahí en adelante. Se tratan cuatro a seis semanas después
10 de las piezas de la hoja con la Agrobacteria; las plantas pequeñas que se elevan de focos transformados se remueven de esta preparación de tejido y se plantan en medio que contiene TOB 250 mg/L cefotaxima y 10 mg/L Basta en recipientes Phytatray™ II (Sigma). Estas plántulas se hacen crecer en un incubador de luz ambiente. Después de 3 semanas, se toman cortes de tallo y reagrupan en el
15 mismo medio. Las plantas se envían al invernadero después de 2-3 semanas adicionales.

Las plantas se mueven del invernadero al lavar el agar de las raíces, se transplantan en el suelo en tazas cuadradas de 13.75 cm, se coloca la taza en una
20 bolsa de Ziploc® (SC Johnson & Son, Inc.), se pone agua en el fondo de la bolsa, y se pone a la luz indirecta en un invernadero a 30° C durante una semana. Después de 3-7 días, la bolsa se abre; las plantas se fertilizan y se les permite crecer en la bolsa abierta hasta que las plantas se aclimatan al invernadero, en cuyo tiempo se remueve la bolsa. Las plantas se hacen crecer bajo condiciones de
25 invernadero caliente ordinarias (30° C, 16 horas día, 8 horas noche, luz natural mínima + complementaria = 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{S}^1$).

Antes de propagación, las plantas T_0 se les toman muestras para análisis de ADN para determinar el número de copia de inserto. El gen PAT que se ligado molecularmente a AAD-13 (v1) se evalúa para conveniencia. Se coloca tejido fresco en tubos y se liofiliza a 4° C durante 2 días. Después que tejido se seca completamente, se coloca un glóbulo de tungsteno (Valenita) en el tubo y las muestras se someten a 1 minuto de molido seco utilizando un molino de glóbulo Kelco. El procedimiento de aislamiento de ADN estándar DNeasa luego se sigue (Qiagen, DNeasa 69109). Una alícuota del ADN extraído luego se tiñe con Verde Pico (Sondas Moleculares P7589) y se lee en el fluorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/ μ l.

Las muestras de ADN se diluyen a aproximadamente 9 ng/ μ l y luego se desnaturalizan mediante incubación en un termociclo a 95° C durante 10 minutos. La mezcla de Sonda de Señal luego se prepara utilizando la mezcla oligo proporcionada y $MgCl_2$ (Tird Wave Technologies). Una alícuota de 7.5 μ l se coloca en cada pozo de la placa de ensayo Invader seguido por una alícuota de 7.5 μ l de controles, estándares, y 20 ng/ μ l de muestras conocidas diluidas. Cada pozo se recubre con 15 μ l de aceite mineral (Sigma). Las placas se incuban a 63° C durante 1.5 horas y se leen en el fluorómetro (Biotek). El cálculo del % de señal sobre el antecedente para sonda objetivo, dividido por el % señal sobre el antecedente de la sonda de control interna calculará la relación. La relación de estándares de copia conocidos que se desarrolla y se valida con análisis southern blot se utiliza para identificar la copia estimada de los eventos desconocidos.

Todos los eventos también se ensayan para la presencia del gen AAD-13 (v1) mediante PCR utilizando las mismas muestras de ADN extraído. Un total de 100 ng de ADN total DNA se utiliza como plantilla. Se utiliza 20 mM de cada

cebador con el equipo de polimerasa Takara Ex Taq PCR. Los cebadores para la Unidad de Transcripción de Planta (PTU) PCR AAD-13 son (SdpacodF: ATGGCTCA TGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:6) y (SdpacodR: CGGGCAGGC CT AACTCC ACCAA) (SEQ ID NO:7). La reacción PCR se lleva a cabo en el

5 termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), al someter las muestras a 94° C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 64° C durante 30 segundos, y 72° C durante 1 minuto y 45 segundos seguido por 72° C durante 10 minutos. Se analizan productos PCR mediante electróforesis en un gel de agarosa 1% teñido con EtBr.

10

9.1 - Selección de plantas transformadas.

Luego de aclimatación en el invernadero las plantas T_0 luego se asignan aleatoriamente en varias relaciones de 2,4-D DMA que varían de 140 a 2240 g

15 ae/ha en incrementos de 4-veces. Para el tabaco, 140 g ae/ha 2,4-D es una dosis efectiva para distinguir las plantas sensibles de unas con niveles significativos de resistencia. La Tabla 14 muestra comparaciones entre plantas T_0 transformadas con un gen herbicida resistente al glufosinato (PAT/tabaco transformado por Cril F-).

Los datos demuestran que el AAD- 13 (v1) cuando se transforma en plantas de

20 tabaco proporciona tolerancia robusta a 2,4-D DMA en por lo menos 2240 g ae/ha.

Tabla 14. Comparación de T₀ AAD-13 (v1) y planta de tabaco de control (PAT) transformada que responde a varios índices de 2,4-D DMA 14 días después de aplicación

PAT/Cri11 (controles transformados)	% Lesión			% Lesión		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Dev. stn.	Rango (%)
Promedios						
0 g ae/ha 2,4-D DMA	3	0	0	0.0	0.0	0
140 g ae/ha 2,4-D DMA	0	1	2	47.0	6.0	40-50
560 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	3	75.0	0.0	75
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	3	97.0	8.0	90-100

Plantas T0 de gen AAD-13 (v1)	% Lesión			% Lesión		
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Dev. stn.	Rango (%)
Promedios						
0 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	0.0	0.0	0
140 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	8.0	11.0	0-15
560 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	3.0	4.0	0-5
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	2	0	0	5.0	0.0	5

Las semilla T1 de transformantes T0 individuales se salvan y la semilla se estatifica y se siembra en bandejas de selección en el invernadero mucho mejor que en el Ejemplo 5 Antes de probar índices elevados de 2,4-D DMA, cada línea T₁ se prueba en progenie al aplicar 2,4-D DMA (560 g ae/ha) para 100 aleatorio Tj siblings. Se hacen aplicaciones por rociado como se describió previamente con un rociador de pista calibrado a una velocidad de aplicación de 187 L/ha. Cuarenta y tres por ciento de las familias T₀ (plantas T₁) segregan la resistencia 3 anticipadas: 1 modelo sensible para un locus único predominantemente heredado con herencia Mendeliana como se determina por el análisis Chi cuadrado (P > 0.05).

Se recolectan semillas de 12 a 20 T₂ individuales (semillas T₂). Veinticinco T₃ hermanos de cada una de las ocho familias T₂ seleccionadas aleatoriamente se probará para progenia como se describió previamente. Aproximadamente un tercio de las familias T₂ se anticipa por ser homocigoto (poblaciones no segregadas) en cada línea. Estos datos mostrados mostrarán que el AAD-13 (v1) se integra establemente y se hereda en una forma Mendeliana en por lo menos tres generaciones.

A las plantas T_1 supervivientes luego se asignan aleatoriamente varios índices de 2,4-D. Para el tabaco, 140 g ae/ha 2,4-D es una dosis efectiva para distinguir plantas sensibles de unas con niveles significativos de resistencia. También se aplican índices elevados para determinar niveles relativos de resistencia (140, 560, o 2240 g ae/ha). La Tabla 15 muestra las comparaciones dibujadas para un control no transformado de (KY 160) variedad de tabaco.

Todas las aplicaciones de herbicida auxina se aplican mediante rociador de pista en un volumen de rociado de 187 L/ha. El 2,4-D utilizado es la formulación de dimetilamina comercial (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO). Algunos individuos T_1 se someten a herbicidas comerciales alternativos en lugar de una auxina fenoxi. Un punto de interés es determinar si los herbicidas auxina piridiloxiacetato, triclopir y fluroxipir, se pueden degradar efectivamente en la planta. Se aplican herbicidas a plantas T_1 con el uso de un rociador de pista en un volumen de rociado de 187 L/ha. Las plantas T_1 que exhiben tolerancia a 2,4-D DMA se accedan adicionalmente en la generación T_2 .

9.2 - Resultados de selección de plantas transformadas.

Los transformantes T_1 primero se seleccionan del antecedente de plantas no transformadas utilizando un esquema de selección 2,4-D. La Tabla 15 compara la respuesta de AAD-13 (v1) y los genes de control para impartir resistencia 2,4-D a transformantes T_1 de tabaco. La respuesta se presenta en términos de % de lesión visual 2 WAT. Los datos se presentan como un histograma de individuos que exhiben poca y ninguna lesión (<20%), lesión moderada (20-40%), o lesión severa (>40%). Se presenta una media aritmética y desviación estándar para cada tratamiento. El rango en respuesta individual también se indica en la última

columna para cada índice y transformación. El tabaco no transformado KYI 60 sirve como un control sensible a auxina. El gen AAD-13 (v1) imparte resistencia herbicida a plantas de tabaco individuales T₁.

Tabla 16. Respuesta de Tabaco T1 transformado ADD-13 (v1) a un rango de índices 2,4-D aplicados postemergencia, comparado con un control sensible a auxina no transformado.

Tipo intacto (control no transformado)		% Lesión			% Lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Dev. est.	Rango (%)	
Control no tratado	3	0	0	0.0	0.0	0	
140 g ae/ha 2,4-DMA	0	0	3	80.0	0.0	80	
560 g ae/ha 2,4-DMA	0	0	3	88.0	1.0	88-89	
2240 g ae/ha 2,4-DMA	0	0	3	92.0	3.0	90-95	

AAD-13 (v1) gene T ₁ plants		% Lesión			% Lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Dev. est.	Rango (%)	
Control no tratado	3	0	0	0.0	0.0	0	
140 g ae/ha 2,4-DMA	3	0	0	0.0	0.0	0	
560 g ae/ha 2,4-DMA	3	0	0	0.0	0.0	0	
2240 g ae/ha 2,4-DMA	3	0	0	2.0	3.0	0-5	

9.3 –Aplicaciones foliares adicionales de resistencia herbicida en tabaco AAD- 13.

La capacidad del AAD-13 (v1) para proporcionar resistencia a otros herbicidas auxina ariloxialcanoato en tabaco transgénico se determina mediante aplicación foliar de varios sustratos. Las plantas de generación extra T₁ siguiendo la prueba de progenie T₁ se rocían con el uso de un rociador de pista establecido a 187 L/ha. Las plantas se rocían con un rango de herbicidas piridiloxiacetato: 140-1120 g ae/ha triclopir (Garlon 3A, Dow AgroSciences) y 280-1120 g ae/ha fluroxipir (Starane, Dow AgroSciences). Todas las aplicaciones se formulan en agua. Cada tratamiento se replica 3 veces. Las plantas se evalúan a 3 y 14 días después de tratamiento.

Las plantas transformadas ADD-13 se protegen pobremente del triclopir pero se protegen bien de lesión de herbicida fluroxipir que se ve en la línea de control no transformada (ver Tabla 16). Estos resultados confirman que AAD- 13

(v1) en tabaco proporciona resistencia a cierta auxina piridiloxiacética seleccionada probada. El gen AAD-13 (v1) proporciona tolerancia significativa hasta de 1120 g ae/ha fluroxipir, aunque el gen proporciona solo el nivel modesto de tolerancia a triclopir tan bajo como 280 g/ha. Estos datos confirman que AAD-13 (v1) proporciona una selectividad hacia fluroxipir sobre triclopir de las auxinas piridiloxi en múltiples especies. Esta observación inesperada distingue adicionalmente el gen AAD-13 (v1) de otras enzimas de tolerancia herbicida de mecanismo similar y se observa en múltiples especies de plantas.

Tabla 16: Comparación de T ₁ AAD-13 (v1) y planta de tabaco no control no transformada que responde a varios herbicidas auxínicos aplicados foliares 14 días después de aplicación.		
Auxinas piridiloxiacéticas		
Tratamiento Herbicida	Plantas que segregan T ₁ AAD-13 (v1) (pDAB4114[1]003.006)	KY160 (control no transformado)
280 g ae/ha Triclopir	53.0	82.0
560 g ae/ha Triclopir	65.0	88.0
1120 g ae/ha Triclopir	75.0	92.0
280 g ae/ha Fluroxipir	7.0	100.0
560 g ae/ha Fluroxipir	25.0	100.0
1120 g ae/ha Fluroxipir	37.0	100.0

Ejemplo 10 - AAD-13 (v1) en Canola y transformación de otros cultivos

10.1 – Transformación de Canola.

El gen AAD-13 (v1) que confiere resistencia a 2,4-D se puede utilizar para transformar Brassica napus con transformación mediada por Agrobacterium utilizando PAT como un marcador seleccionable.

Las semillas se pueden esterilizar en la superficie con 10% de blanqueador comercial durante 10 minutos y se enjuagan 3 veces con agua destilada estéril.

Las semillas se colocarán en la mitad de la concentración de medio MS basal (Murashige y Skoog, 1962) y se mantienen bajo régimen de crecimiento establecido a t 25° C, y un fotoperiodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad.

- 5 Se cortarían segmentos de hipocotilo (3-5 mm) de plántulas de 5 - 7 días de edad y se colocan en medio de inducción de callo KIDI (medio MS con 1 mg/L cinetina y 1 mg/L 2,4- D) durante 3 días como pre-tratamiento. Los segmentos luego se transferirán a una caja petri, se tratan con cepa *Agrobacterium* Z707S o LBA4404 que contiene pDAB3759. El *Agrobacterium* debe crecer durante la noche a 28° C
- 10 en la oscuridad en un agitador a 150 rpm y se re-suspenden posteriormente en el medio de cultivo.

Después de 30 min de tratamiento de los segmentos de hipocotilo con *Agrobacterium*, estos se pondrían en el medio de inducción de callo durante 3

- 15 días. Luego de cocultivación, los segmentos se colocarán en KIDITC (medio de inducción de callo que contiene 250 mg/L Carbenicilina y 300 mg/L Timentina) durante una semana o dos semanas de recuperación. Alternativamente, los segmentos se pondrían directamente en el medio de selección KIDIHI (medio anterior con 1 mg/L Herbiace). Los antibióticos carbenicilina y Timentina se
- 20 utilizarían para matar el *Agrobacterium*. El agente de selección Herbiace permite el crecimiento de las células transformadas.

Se colocarían segmentos hipocótilo callosos en B3Z1H1 (medio MS, 3 mg/L bencilamino purina, 1 mg/L Zeatina, 0.5 gm/L MES [ácido 2-(N-morfolino) etano

- 25 sulfónico], 5 mg/L nitrato de plata, 1 mg/L Herbiace, Carbenicilina y Timentina) brote de medio de regeneración. Después de 2-3 semanas brotes regenerados y segmentos hipocotilo junto con los brotes se transfieren al medio B3Z1H3 (medio

MS, 3 mg/L bencilamino purina, 1 mg/L Zeatina, 0.5 gm/L MES [ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico], 5 mg/L nitrato de plata, 3 mg/L Herbiace, Carbenicilina y Timentina) durante 2-3 semanas. Se deben cortar Brotes de los segmentos hipocotilo y se transfieren al medio de elongación brote MESH5 o MESIO (MS, 0.5 gm/L MES, 5 o 10 mg/L Herbiace, Carbenicilina, Timentina) durante 2-4 semanas. Los brotes alongados se cultivan para la inducción de raíz en MSLI (MS con 0.1 mg/L ácido Indolebutírico). Una vez las plantas son bien establecidas en el sistema de raíz, estas se transplantarán en el suelo. Las plantas se aclimatan bajo condiciones ambientales controladas en el Conviron durante 1-2 semanas antes de transferir al invernadero.

10.2 – Transformación de Agrobacterium de Otros Cultivos

En claridad de la descripción objeto, se pueden transformar cultivos adicionales de acuerdo con la invención objeto utilizando técnicas que son conocidas en el arte. Para la transformación mediada por Agrobacterium de arroz, ver, por ejemplo, Popelka y Altpeter (2003). Ver, por ejemplo, Hinchey et al, 1988. Para la transformación mediada por Agrobacterium de sorgo, ver, por ejemplo, Zhao et al, 2000. Para la transformación mediada por Agrobacterium de cebada, ver, por ejemplo, Tingay et al, 1997. Para la transformación mediada por Agrobacterium de trigo, ver, por ejemplo, Cheng et al, 1997. Para transformación mediada por Agrobacterium de arroz, ver, por ejemplo, Hiei et al., 1997.

Los nombres latinos para estas y otras plantas se dan adelante. Debe ser claro que estas y otras técnicas de transformación (no Agrobacterium) se pueden utilizar para transformar AAD-13 (v1), por ejemplo, en estas y otras plantas, que incluyen pero no se limitan a maíz (*Zea mays*), Trigo (*Triticum spp.*), Arroz (*Oryza*

spp. y *Zizania* spp.), Cebada (*Hordeum* spp.), Algodón (*Abroma augusta* y *Gossypium* spp.), Soya (*Glycine max*), Remolacha (*Beta* spp.), Caña de azúcar (*Arenga pinnata*), Tomate (*Lycopersicon esculentum* y otros spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* y otros spp., y *Cyphomandra betacea*), Papa
 5 (*Solanum tuberosum*), patata (*Ipomoea batatas*), Arroz (*Secale* spp.), pimienta (*Capsicum annuum*, *sinense*, y *frutescens*), Lechuga (*Lactuca sativa*, *perennis*, y *pulchella*), repollo (*Brassica* spp), apio (*Apium graveolens*), Berenjena (*Solanum melongena*), maní (*Arachis hypogaea*), Sorgo (todas las especies de Sorgo), Alfalfa (*Medicago sativa*), Zanahoria (*Daucus carota*), Arvejas (*Phaseolus* spp. y otros
 10 géneros), Avena (*Avena sativa* y *strigosa*), Guisantes (*Pisum*, *Vigna*, y *Tetragonolobus* spp.), Girasol (*Helianthus annuus*), Calabaza (*Cucurbita* spp.), Pepino (*Cucumis saliva*). Tabaco (*Nicotiana* spp.), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), césped (*Lolium*, *Agrostis*, *Poa*, *Cynodon*, y otros géneros), Trébol (*Tifolium*), Vetch (*Vicia*). Tales plantas, con genes AAD-13 (v1), por ejemplo, se
 15 incluyen en la invención objeto.

El AAD-13 (v1) tiene el potencial de incrementar la aplicabilidad de herbicidas auxínicos claves para uso en estaciones muchos sistemas de cultivo de maderas caducos y preñes. Las especies de maderas resistentes a Triclopir, 2,4-D, y/o fluroxipir incrementaría la flexibilidad de uso sobre la superficie de estos
 20 herbicidas sin lesiones. Estas especies incluirían, pero no se limitan a: Alder (*Alnus* spp.), ceniza (*Fraxinus* spp.), especies aspen y poplar (*Populus* spp.), haya (*Fagus* spp.), abedul (*Be tula* spp.), cereza (*Prunus* spp.), eucalipto (*Eucalyptus* spp), sáballo americano (*Carya* spp.), maple (*Acer* spp.), roble (*Quercus* spp), y
 25 pino (*Pinus* spp). El uso de auxina resistente para el control de maleza selectiva en especies que llevan frutas y ornamentales está también dentro del alcance de esta invención. Ejemplos pueden incluir, pero no se limitan a; rosa (*Rosa* spp.),

evonimus (*Euonymus* spp.), petunia (*Petunia* spp), begonia (*Begonia* spp.), rododendro (*Rhododendron* spp), manzano silvestre o manzana (*Malus* spp.), pera (*Pirus* spp.), durazno (*Prunus* spp), y cáñamo acuático (*Tagetes* spp.).

5 Ejemplo 11 – Evidencia Adicional de Resultados Sorprendentes: AAD-13 vs. AAD-2

Se plantan semillas T₁ *Arabidopsis* cosechadas frescamente con una planta optimizada AAD-13 (v1) o gen AAD-2 nativo (v1) (ver PCT/US2005/014737) y se
10 seleccionan para resistencia a glufosmato como se describió previamente. Las plantas luego se asignan aleatoriamente en varios índices de 2,4-D (50-3200 g ae/ha). Se aplican aplicaciones herbicidas mediante rociador de pista en un volumen de rociado 187 L/ha. El 2,4-D utilizado es la formulación de sal dimetilamina comercial (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO) mezclada en 200
15 mM amortiguador Tris (pH 9.0) o 200 mM amortiguador HEPES (pH7.5).

EL AAD-13 (v1) y AAD -2 (v1) proporcionan resistencia detectable 2,4-D versus las líneas de control transformada y no transformada; sin embargo, los individuos varían en su capacidad para impartir resistencia a 2,4-D plantas
20 individuales T₁. De forma sorprendente, los transformantes AAD-2 (v1) y AAD-2 (v2) son menos resistentes a 2,4-D que el gen AAD-13 (v1), de una frecuencia de plantas altamente tolerantes así como también lesión promedio general. No se transforman plantas con AAD-2 (v1) sobreviviente 200 g ae/ha 2,4-D relativamente no lesionado (<20% de lesión visual), y la lesión de la población general es
25 aproximadamente 83% (ver PCT/US2005/014737). Por el contrario, el AAD- 13 (v1) tiene una lesión de la población promedio de aproximadamente 15% cuando se trata con 2,240 g ae/ha 2,4-D (Tabla 11). La comparación de genes

optimizados con planta AAD-13 y AAD-2 indica una ventaja significativa para AAD-13 (v1) en la planta. Estos resultados que se dan inesperadamente en la comparación in Vitro de AAD-2 (v1) (ver PCT/US2005/014737) y AAD-13 (v2) indican altas eficiencias en la degradación 2,4-D y comparte una especificidad tipo S con respecto a sustratos ariloxialcanoato quirales. El AAD-2 (v1) se expresa en plantas T₁ individuales para variar los niveles; sin embargo, la poca protección de lesión 2,4-D se proporciona mediante esta proteína expresada. No es evidente la diferencia sustancial en el nivel de expresión de proteína (en plantas) para los genes nativo y AAD-2 optimizados por planta (ver PCT/US2005/014737). Estos datos corroboran hallazgos más tempranos que hacen la expresión de funcional AAD-13 (v1) en plantas, y que resulta de resistencia herbicida a 2,4-D y es inesperado seleccionar herbicidas piridiloxiacetato.

Ejemplo 12 – Aplicaciones de Quemado a Preplanta

Este y los siguientes Ejemplos son ejemplos específicos de usos herbicidas novedosos hechos posibles por la invención objeto AAD- 13.

Las aplicaciones herbicidas de quemado a preplanta están destinadas a matar malezas que han emergido en el invierno o primavera temprana antes de plantar un cultivo dado. Típicamente estas aplicaciones se aplican en sistemas de labrado o no labrado donde la remoción física de malezas no se completa antes de plantar. Un programa herbicida, por lo tanto, puede controlar un muy amplio espectro de hoja ancha y malezas de césped presentes al momento de plantar. El glifosato, gramoxona, y glufosinato son ejemplos de herbicidas no selectivos, no residuales ampliamente utilizados para aplicaciones de quemado preplanta. Algunas malezas, sin embargo, son difíciles de controlar en este momento de la

estación debido a uno o más de los siguientes: insensibilidad inherente de las especies de maleza o biotipo para el herbicida, tamaño relativamente grande de malezas anuales de invierno, y condiciones de frío que limitan la retoma y actividad herbicida. Varias opciones herbicidas son disponibles para mezclar en

5 tanque con estos herbicidas para incrementar el espectro y actividad en las malezas donde los herbicidas no selectivos son débiles. Un ejemplo sería aplicaciones de mezcla de tanque 2,4-D con glifosato para asistir el control de *Conyza canadensis* (hierba de caballo). Se puede utilizar glifosato de 420 a 1680 g ae/ha, más típicamente de 560 a 840 g ae/ha, para el control de quemado

10 preplanta de la mayoría de las malezas presentes; sin embargo, 280 - 1120 g ae/ha de 2,4-D se puede aplicar con la ayuda en control de muchas especies de maleza de hoja ancha (por ejemplo, hierba de caballo). El 2,4-D es un herbicida para elección debido a que este efectivo en un rango muy amplio de malezas de hoja ancha, aún efectivo en bajas temperaturas, y extremadamente económico.

15 Sin embargo, si el cultivo posterior es un cultivo dicotiledoneo sensible, los residuos 2,4-D en el suelo (aunque de vida corta) pueden impactar negativamente el cultivo. Las sojas son un cultivo sensible y requieren un periodo mínimo de 7 días (para índice de 280 g ae/ha 2,4-D) en por lo menos 30 días (para aplicaciones 2,4-D de 1120 g ae/ha) para ocurrir entre aplicaciones de quema y

20 plantar. El 2,4-D se prohíbe como un tratamiento de quema antes de plantar algodón (ver marcas federales, más disponibles en CPR, 2005 o online en cdms.net/manuf/manuf.asp). Con algodón transformado AAD-13 (v1) o sojas, estos cultivos deben ser capaces de sobrevivir a los residuos 2,4-D en el suelo de aplicaciones de quema aplicadas al lado derecho hacia arriba y aún después de

25 plantar antes de emergencia del cultivo. La flexibilidad incrementada y el costo reducido de los patrones de mezcla en tanque (o premezcla comercial) mejorarán las opciones del control de la maleza y se incrementa la robustez de aplicaciones

de quema en situaciones importantes sin labrar o labrado reducido. Este ejemplo es una de las muchas opciones que estarán disponibles. Aquellos expertos en la técnica del control de la maleza notarán una variedad de otras aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a gramoxona + 2,4-D o glufosinato + 2,4-D al utilizar los productos descritos en etiquetas herbicidas federales (CPR, 2005) y usos descritos en Agrilience Crop Protection Guide (2005), como ejemplos. Aquellos expertos en la técnica también reconocerán que el ejemplo anterior se puede aplicar a cualquier cultivo 2,4-D-sensible (u otro herbicida auxina fenoxi) que se protegería por el gen AAD-13 (v1) si se transforma establemente. De forma similar, los únicos atributos de AAD- 13 luego de la degradación de fluroxipir incrementan la utilidad al permitir la sustituciones o las mezclas en tanque de 35-560 g ae/ha fluroxipir para incrementar el espectro y/o incrementar la capacidad de controlar las especies perenne o maleza de viney.

Ejemplo 13 – Uso en Cultivo de Herbicidas Auxina en Soyas, Algodón, y Otros Cultivos Dicotiledóneos Transformados Solo con AAD-J 3 (v1)

El AAD-13 (v1) puede posibilitar el uso de herbicidas auxina fenoxi (por ejemplo, 2,4-D y MCPA) y auxinas piridiloxi (fluroxipir) para el control de un amplio espectro de malezas de hoja ancha directamente en cultivos normalmente sensibles a 2,4-D. La aplicación de 2,4-D a 280 a 2240 g ae/ha controlaría más especies de maleza de hoja ancha en ambientes agronómicos. Más típicamente, se utiliza 560 - 1120 g ae/ha. Para el fluroxipir, los índices de aplicación típicamente variarían de 35-560 g ae/ha, más típicamente 70-280 ae/ha.

Una ventaja para esta herramienta adicional es el costo extremadamente bajo del componente herbicida hoja ancha y control de maleza residual de vida

corta potencial proporcionado por índices mayores de 2,4-D y fluroxipir cuando se utiliza en altos índices, aunque un herbicida no residual como glifosato no proporcionaría control de malezas que germinan después. Esta herramienta también proporciona un mecanismo de modos herbicidas combinados de acción con la conveniencia de HTC como un herbicida resistente integrado y estrategia de manejo de residuos de maleza.

Una ventaja adicional de esta herramienta proporcionada es la capacidad de mezclar en tanque herbicidas de control de maleza de hoja ancha de amplio espectro (por ejemplo, 2,4-D y fluroxipir) con utilizan comúnmente herbicidas de control de maleza. Estos herbicidas se aplican típicamente antes de o al plantar, pero frecuentemente son menos efectivos en malezas establecidas, que emergen que puede existir en el campo antes de plantar. Al extender la utilidad de estos herbicidas auxina ariloxi para incluir aplicaciones en plantas, preemergencia, o pre-planta se incrementa, la flexibilidad de los programas de control de maleza residual. Un experto en la técnica reconocería que el programa de herbicida residual diferirá con base en el cultivo de interés, pero que los programas típicos incluirían herbicidas de las familias de herbicidas cloracetmida y dinitroanilina, pero también incluyen herbicidas tales como clomazona, sulfentrazona, y una variedad de herbicidas que inhiben ALS, que inhiben PPO, y que inhiben HPPD.

Beneficios adicionales podrían incluir la tolerancia al 2,4-D o fluroxipir requerido antes de plantar luego de la aplicación del herbicida auxina ácido ariloxiacético (ver ejemplo previo); y más pocos problemas de daño por contaminación a cultivos de dicotiledóneas que resultan de tanques volumétricos incompletamente limpios que habían contenido 2,4-D o fluroxipir. El Dicamba, R-

diclorprop, y muchos otros herbicidas se pueden aún utilizar para el subsecuente control de voluntarios de cultivos de dicotiledóneas transformadas AAD-13 (vi).

Aquellos expertos en la técnica también reconocerán que el ejemplo anterior puede aplicar a cualquier cultivo sensible a 2,4-D (u otro herbicida de auxina ariloxi) que se protegería por el gen AAD-13 (vi) si se transformara establemente. Un experto en la técnica de control de maleza reconocería que el uso de varios herbicidas de auxina fenoxi o piridiloxi comerciales solos o en combinación con un herbicida se posibilita mediante la transformación del AAD-13 (vi). Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de estas químicas se pueden determinar mediante etiquetas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Referencia de Protección de Cultivos) o una compilación similar o cualquiera de las referencias de protección de cultivos comerciales o académicas tales como la Guía de Protección de Cultivos de Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo posibilita el uso de los HTC por el AAD-13 (vi), sea utilizado solo, mezclado en tanque, o secuencialmente, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 14 – Uso en Cultivos de los Herbicidas de Auxina Fenoxi y Auxina Piridiloxi en Maíz, Arroz transformados solamente con AAD-13 (vi), y otras especies de Monocotiledóneas

En una forma análoga, la transformación de especies de pasto (tal como, pero no se limita a, maíz, arroz, trigo, cebada, o césped y pastos de pastura) con AAD-13 (vi) permitirían el uso de auxinas fenoxi y piridiloxi altamente eficaces en cultivos donde normalmente la selectividad no es cierta. La mayoría de las especies de pastos tienen una tolerancia natural a los herbicidas auxínicos tales como las auxinas fenoxi (es decir, 2,4-D.). Sin embargo, un nivel relativamente

bajo de selectividad de cultivo ha resultado en una utilidad disminuida en estos cultivos debido a una ventana acortada de tiempo de aplicación o riesgo de daño inaceptable. Los cultivos de monocotiledóneas transformados con AAD-13 (vi) posibilitarían por lo tanto el uso de una combinación similar de tratamientos descritos para los cultivos de dicotiledóneas tales como la aplicación de 2,4-D de 280 a 2240 g ae/ha para controlar la mayoría de las especies de malezas de hoja ancha. Más típicamente, se utilizan 560 – 1120 g ae/ha. Para el fluroxipir, las tasas de aplicación típicamente variarían desde 35 – 560 g ae/ha, más típicamente 70 – 280 ae/ha.

Una ventaja de esta herramienta adicional es el costo extremadamente bajo del componente de herbicida de hoja ancha y el control de maleza residual potencial de corta vida suministrado por altas tasas de 2,4-D o fluroxipir. En contraste, un herbicida no residual como glifosato no suministraría control para malezas de germinación tardía. Esta herramienta también suministraría un mecanismo para rotar los modos de acción de los herbicidas con la conveniencia del HTC como una estrategia de resistencia herbicida integrado y de manejo de cambio de maleza en un cultivo tolerante al glifosato / estrategia de combinación AAD-13 (vi) HTC, sea que las especies de cultivo se roten o no.

Una ventaja adicional que suministra esta herramienta es la capacidad de mezclar en tanque herbicidas de control de malezas de hoja ancha de amplio espectro (por ejemplo, 2,4-D y fluroxipir) con los herbicidas de control de maleza residuales comúnmente utilizados. Estos herbicidas se aplican típicamente antes de o al momento de la plantación, pero a menudo son menos efectivos sobre malezas establecidas emergidas, que pueden existir en el campo previamente a la plantación. Al extender la utilidad de estos herbicidas de auxina ariloxi para incluir

aplicaciones en la planta preemergencia, o pre-planta, la flexibilidad de los programas de control de maleza residual se incrementa. Un experto en la técnica reconocería que el programa de herbicida residual diferirá con base en el cultivo de interés, pero los programas típicos incluirían herbicidas de las familias de herbicidas cloracetmida y dinitroanilina, pero también incluirán herbicidas tales como clomazona, sulfentrazona, y una variedad de herbicidas que inhiben ALS, PPO y HPPD.

La tolerancia creciente del maíz, arroz y otras monocotiledóneas a las auxinas fenoxi o pridilíoxi deben posibilitar el uso de estos herbicidas en cultivo sin las restricciones de la etapa de crecimiento o el potencial para empobrecimiento del cultivo; el fenómeno de desplegamiento tal como el "cola de rata", el resquebrajamiento de tallo inducido por regulador de crecimiento en maíz, o raíces de sujeción deformadas. Cada herbicida alternativo posibilita el uso en los HTC por el AAD-13 (VI), sean utilizados solos, mezclados en tanque, o secuencialmente, se consideran dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 15 – AAD-13 (VI) Apilado con un Rasgo de Tolerancia al Glifosato en cualquier Cultivo

20

La vasta mayoría de los acres de algodón, canola, maíz, y frijol de soya plantado en Norte América contiene un rasgo de tolerancia al glifosato (GT), y la adopción del maíz GT se está elevando. Los cultivos GT adicionales (por ejemplo, trigo, arroz, remolacha de azúcar, y césped) han estado bajo desarrollo pero no se han liberado comercialmente a la fecha. Muchas otras especies resistentes al glifosato están en etapa experimental a desarrollo (por ejemplo, alfalfa, caña de azúcar, girasol, remolachas, albergas, zanahoria, cohombro, lechuga, cebolla,

fresa, tomate y tabaco; especies forestales como el álamo y el ocosol; y especies hortícolas como el clavelón, la petunia, y las begonias; isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005 en el Amplio Mundo de la Red). Los GTC son herramientas valiosas para la sola amplitud de malezas controladas y la
5 conveniencia de la efectividad de costos suministrada por este sistema. Sin embargo, la utilidad de glifosato como un tratamiento base ahora estándar es seleccionar malezas resistentes al glifosato. Adicionalmente, las malezas que son inherentemente menos eficaces al glifosato están cambiando a especies predominantes en los campos donde se practican programas químicos solamente
10 con glifosato. Al apilar el AAD-13 (vl) con un rasgo GT, bien sea a través de producción convencional o conjuntamente como un evento de transformación novedoso, la eficacia del control de malezas, la flexibilidad, y la capacidad de manejar los cambios de las malezas y el desarrollo de resistencia a los herbicidas se podrían mejorar. Como se mencionó en los ejemplos previos, al transformar
15 cultivos con AAD-13 (vl), los cultivos de monocotiledóneas tendrán un mayor margen de seguridad a la auxina fenoxi o piridiloxi; y se pueden aplicar selectivamente las auxinas fenoxi en cultivos de dicotiledóneas. Varios escenarios para opciones de control de maleza mejorados se pueden prever donde el AAD-13 (vl) y el rasgo GT se apilan en especies de cultivos de monocotiledóneas y
20 dicotiledóneas:

- a) El glifosato se puede aplicar a una tasa de aplicación postemergente estándar (420 a 2160 g ae/ha, preferiblemente 560 a 840 g ae/ha) para el control de la mayoría de pastos y de especies de malezas de
25 hoja ancha. Para el control de malezas de hoja ancha resistentes a glifosato como la *Conyza canadensis* o malezas inherentemente difíciles de controlar con glifosato (por ejemplo, *Commelina spp*,

Ipomoea spp, etc), 280 - 2240 g ae/ha (preferiblemente 560 - 1120 g ae/ha) se puede aplicar secuencialmente 2,4-D, mezclada en tanque, o como una premezcla con glifosato para suministrar control efectivo. Para el fluroxipir las tasas de aplicación variarían típicamente desde
5 35 - 560 g ae/ha, más típicamente 70 - 280 ae/ha.

- b) Habitualmente, las tasas de glifosato aplicadas en los GTC generalmente varían desde 560 a 2240 g ae/ha por tiempo de aplicación. El glifosato es de lejos más eficaz sobre especies de
10 pastos que especies de malezas de hoja ancha. Los rasgos apilados de AAD-13 (vi) + GT permitirían tasas efectivas en pastos de glifosato (105 - 840 g ae/ha, más preferiblemente 210 - 420 g ae/ha). 2,4-D (en 280 - 2240 g ae/ha, más preferiblemente 560 - 1120 g ae/ha) podría entonces aplicarse secuencialmente, mezclado en
15 tanque, o como una premezcla con tasas efectivas para el pasto de glifosato para suministrar el control necesario de malezas de hoja ancha. El fluroxipir a las tasas mencionadas anteriormente serían componentes aceptables en el régimen de tratamiento. La baja tasa de glifosato suministraría también algún beneficio al control de
20 malezas de hoja ancha; sin embargo, el control principal sería de 2,4-D o fluroxipir.

Un experto en la técnica de control de maleza reconocería que el uso de uno o más herbicidas de auxina ariloxi comerciales sola o en combinación
25 (secuencialmente o independientemente) se posibilita mediante la transformación del AAD-13 (vi) en cultivos. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de estas químicas se pueden determinar mediante etiquetas

herbicidas compiladas en el libro CPR (Referencia de Protección de Cultivos) o una compilación similar, etiquetas compiladas en línea (por ejemplo, cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía de protección de cultivo comercial o académica tal como la Guía de Protección de Cultivos de Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo posibilitado por el uso en los HTC mediante AAD-13 (vi), sea utilizado solo, mezclado en tanque, o secuencialmente, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 16 – AAD-13 (vi) Apilado con Rasgo de Tolerancia al Glufosinato en cualquier Cultivo

La tolerancia al glufosinato (PAT, bar) está habitualmente presente en un número de cultivos plantados en Norte América sean como un marcador seleccionable para un rasgo de entrada como las proteínas de resistencia a insectos o específicamente como un rasgo HTC. Los cultivos incluyen, pero no se limitan a, canola, maíz y algodón tolerantes al glufosinato. Los cultivos tolerantes al glufosinato adicional (por ejemplo, arroz, remolacha azucarera, frijoles de soya, y césped) han estado bajo desarrollo pero no se han liberado comercialmente a la fecha. El glufosinato, como el glifosato, es un herbicida para pastos y plantas de hoja ancha de amplio espectro, relativamente no selectivos. El modo de acción del glufosinato difiere del glifosato. Éste es más rápido para actuar, dando como resultado la desecación y “quemado” de las hojas tratadas 24 – 48 horas después de la aplicación del herbicida. Esto es ventajoso por la apariencia de control de maleza rápido. Sin embargo, esto también limita la traslocación del glufosinato a las regiones meristemáticas de las plantas objetivo que resultan en un control de malezas más pobre como se evidencia por las tasas de desempeño de control de malezas de los dos compuestos en muchas especies (Agrilience, 2005).

Al apilar el AAD-13 (vl) con un rasgo de tolerancia al glufosinato, bien sea a través de producción convencional o conjuntamente como un evento de transformación novedoso, la eficacia del control de malezas, flexibilidad, y capacidad de manejo de los cambios de las malezas y se podría mejorar el desarrollo de resistencia a los herbicidas. Se pueden prever varios escenarios para opciones de control de maleza mejorados donde el AAD-13 (vl) y el rasgo de tolerancia al glufosinato se apilan en cualquiera de las especies de cultivo de monocotiledóneas o dicotiledóneas:

a) El glufosinato se puede aplicar a una tasa de aplicación postemergente estándar (200 a 1700 g ae/ha, preferiblemente 350 a 500 g ae/ha) para el control de muchos pastos y especies de malezas de hoja ancha. A la fecha, ninguna de las malezas resistentes al glufosinato se ha confirmado; sin embargo, el glufosinato tiene un número mayor de malezas que son inherentemente más tolerantes que las que lo son al glifosato.

i) Las especies de maleza de hoja ancha inherentemente tolerantes (por ejemplo, *Cirsium arvensis*, *Apocynum cannabinum*, y *Conyza canadensis*) se podrían controlar mediante tanque de mezclado 280 – 2240 g ae/ha, más preferiblemente 560 – 2240 g ae/ha, 2,4-D para el control efectivo de estas especies perennes más difíciles de controlar y para mejorar la robustez del control sobre especies de malezas de hoja ancha anuales. El fluroxipir serían componentes aceptables a considerar en el régimen de

control de malezas. Para el fluroxipir, las tasas de aplicación variarían típicamente de 35 – 560 g ae/ha, más típicamente 70 – 280 ae/ha.

- 5 b) Una combinación múltiple de glufosinato (200 – 500 g ae/ha) +/- 2,4-D(280 – 1120 g ae/ha) +/- fluroxipir (a las tasas listadas anteriormente), por ejemplo, podrían suministrar un espectro de control de malezas traslapante más robusto. Adicionalmente, el espectro traslapante suministra un mecanismo adicional para el
- 10 manejo o retraso de las malezas resistentes a herbicidas.

Un experto en la técnica del control de malezas reconocería que el uso de uno o más herbicidas de auxina ariloxiacéticos comerciales solos o en combinación (secuencial o independientemente) están posibilitados por la

15 transformación del AAD-13 (vi) en cultivos. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de estas químicas se pueden determinar mediante las etiquetas herbicidas compiladas en el libro CPR (Referencia de Protección de Cultivo) o una compilación similar, las etiquetas compiladas en línea (por ejemplo, cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía de protección de cultivo comercial o

20 académica tal como la Guía de Protección de Cultivo de Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo posibilitado par el uso en los HTC mediante AAD-13 (vi), sea utilizado solo, mezclado en tanque, o secuencialmente, se considera dentro del alcance de esta invención.

25 La invención objeto incluye así una planta transgénica (y células de plantas) que comprenden un gen AAD-13 de la invención objeto “apilado” con el gen DSM-2 de la PCT/US2007/086813 (presentada en Diciembre 7, 2007). Tales genes

DSM-2 incluyen la SEQ ID NOS:1 y 3 de esa solicitud. Aquellos genes codifican proteínas que comprenden la SEQ ID NOS:2 y 4 de esa solicitud. Aún adicionalmente, los genes adicionales con tolerancia herbicida se pueden incluir en múltiples “pilas” que comprenden tres o más de tales genes.

5

Ejemplo 17 – AAD-13 (v1) Apilado con el Rasgo AAD-1 (v3) en cualquier Cultivo

Las plantas homocigotos AAD-13 (v1) y AAD-1 (v3) (ver PCT/US2005/014737 para el último) se pueden cruzar ambos recíprocamente y recolectar la semilla F₁. La semilla F₁ proveniente de dos cruces recíprocos de cada gen fueron estratificados y tratadas 4 replicas de cada cruce se trataron bajo el mismo régimen de rociado como se utilizó para otras pruebas con uno de los siguientes tratamientos: 70, 140, 280 g ae/ha de fluroxipir (selectivo para el gen AAD-13 (v1)); 280, 560, 1120 g ae/ha de R-dicloroprop (selectivo para el AAD-1 (v3)); o 560, 1120, 2240 g ae/ha de 2,4-D DMA (para confirmar la tolerancia al 2,4-D). Las plantas homocigotos T₂ de cada gen también se plantaron para uso como controles. Las plantas se graduaron en 3 y 14 DAT. Los resultados de rociado se muestran en la Tabla 24.

Los resultados confirman que el AAD-13 (v1) se puede apilar exitosamente con el AAD-1 (v3), incrementando así los herbicidas de espectro que se pueden aplicar al cultivo de interés (ácidos fenoxiacéticos + Ácidos fenoxipropiónicos versus ácidos fenoxiacéticos + ácidos piridiloxiacéticos para el AAD-1 y el AAD-13, respectivamente). La naturaleza complementaria de los patrones de resistencia a cruce herbicida permite el uso conveniente de estos dos genes como marcadores seleccionables de campo complementarios y apilables. En cultivos donde la tolerancia con un gen único puede ser marginal, un experto en la técnica reconoce

que uno puede incrementar la tolerancia al apilar un segundo gen de tolerancia para el mismo herbicida. Esto se puede hacer utilizando el mismo gen con los mismos o diferentes promotores; sin embargo, como se observa aquí, el apilado y seguimiento de dos rasgos complementarios se pueden facilitar al distinguir la protección cruzada a los ácidos fenoxipropiónicos [de AAD-1 (v3)] o los ácidos piridiloxiacéticos [AAD-13 (vI)].

La invención objeto incluye así una planta transgénica (y células de planta) que comprenden un gen AAD-13 de la invención objeto “apilado” con el gen AAD-1 de la WO 2005/107437 (Publicado en Noviembre 17, 2005; PCT/US2005/014737 (presentado Mayo 2, 2005)). Tales genes AAD-1 incluyen la SEQ ID NOS:3, 4, 5 y 12 de esta solicitud. Estos genes codifican proteínas que comprenden la SEQ ID NOS:9, 10, 11 y 13 de esta solicitud. Aún adicionalmente, los genes de tolerancia a herbicida adicionales se pueden incluir en múltiples “pilas” que comprenden tres o más de tales genes.

Ejemplo 18 – AAD-13 (vI) Apilado con el Rasgo AAD-12 (vI) en cualquier Cultivo

Las plantas homocigotos AAD-13 (vI) y AAD-12 (vI) (ver WO 2007/053482 para el último) se pueden cruzar y se puede recolectar la semilla F₁. La semilla F₁ proveniente de dos cruces recíprocos de cada gen se puede cosechar y las plantas F₁ tratadas bajo este mismo régimen de rociado como se utilizó para otras pruebas con uno de los siguientes tratamientos: 70, 280, 1120 g ae/ha de fluroxipir (selectivo para el gen AAD-12^{*} (vI)); 70, 280, 1120 g ae/ha de triclopir (selectivo para el AAD-13 (vI)); o 560, 1120, 2240 g ae/ha de 2,4-D DMA (para confirmar la tolerancia al 2,4-D).

El AAD-13 (vi) se puede apilar con el AAD-12 (vi), incrementando así los herbicidas de espectro que se pueden aplicar al cultivo de interés (ácidos fenoxiacéticos + triclopir versus ácidos fenoxiacéticos + fluroxipir para el AAD-12 y el AAD-13, respectivamente). La naturaleza complementaria de los patrones con resistencia a cruce herbicida permiten el uso conveniente de estos dos genes como marcadores complementarios y seleccionables de campo apilables. En cultivos donde la tolerancia con un gen único puede ser marginal, un experto en la técnica reconoce que uno puede incrementar la tolerancia al apilar un segundo gen de tolerancia para el mismo herbicida. Tal se puede hacer utilizando el mismo gen con los mismos o diferentes promotores; sin embargo, como se observó aquí, el apilamiento y seguimiento de dos rasgos complementarios se puede facilitar al distinguir la protección cruzada a fluroxipir [del AAD-13 (vi)] y triclopir [AAD-12 (vi)].

La invención objeto incluye así una planta transgénica (y células de planta) que comprenden un gen AAD-13 de la invención objeto "apilada" con un gen AAD-12 de la WO 2007/053482 (publicada en Mayo 10, 2007; PCT/US2006/042133 (presentada en Octubre 27, 2006)). Tales genes AAD-12 incluyen la SEQ ID NOS:1, 3, y 5 de esa solicitud. Aquellos genes codifican proteínas que comprenden la SEQ ID NOS:2 y 4 de esa solicitud. Aún adicionalmente, se pueden incluir los genes con tolerancia a herbicidas adicionales en múltiples "pilas" que comprenden tres o más de tales genes.

Ejemplo 19 – AAD-13(vi) Apilado con Rasgo AHAS en cualquier Cultivo

La tolerancia al herbicida imidazolinona (AHAS, et al.) está habitualmente presente en un número de cultivos plantados en Norte América que incluyen, pero

no se limitan a, maíz, arroz, y trigo. Los cultivos tolerantes a imidazolinona adicionales (por ejemplo, algodón y remolacha azucarera) han estado bajo desarrollo pero no se han liberado comercialmente a la fecha. Muchos herbicidas de imidazolinona (por ejemplo, imazamox, imazetapir, imazaquin, e imazapic) se utilizan habitualmente de manera selectiva en varios cultivos convencionales. El uso de imazetapir, imazamox, y el imazapir no selectivo han sido posibilitados a través de rasgos de tolerancia a imidazolinona similares a AHAS et al. Esta clase química también tiene una actividad residual en el suelo significativa, siendo así capaz de suministrar control de maleza extendido más allá del tiempo de aplicación, a diferencia de los sistemas basados en glifosato o glufosinato. Sin embargo, el espectro de malezas controladas por los herbicidas de imidazolinona no es tan amplio como el del glifosato (Agrilience, 2005). Adicionalmente, los herbicidas de imidazolinona tienen un modo de acción (inhibición de la sintasa acetolactato, ALS) a los cuales muchas semillas han desarrollado resistencia (Heap, 2007). Al apilar el AAD-13 (VI) con un rasgo de tolerancia a imidazolinona, a través de una producción convencional o conjuntamente como un evento de transformación novedoso, la eficacia del control de malezas, flexibilidad, y capacidad para manejar los cambios de las malezas y el desarrollo de resistencia al herbicida se podría mejorar. Como se mencionó en los ejemplos previos, al transformar los cultivos con AAD-13 (VI), los cultivos de monocotiledóneas tendrán un margen mayor de seguridad a la auxina fenoxi o piridiloxi, y estas auxinas se pueden aplicar selectivamente en cultivos de dicotiledóneas. Se pueden prever varios escenarios para opciones de control de malezas mejorado donde el AAD-13 (VI) y el rasgo de tolerancia de imidazolinona se apilan en cualquiera de las especies de cultivo de monocotiledóneas o dicotiledóneas:

- a) El imazetapir se puede aplicar a una tasa de aplicación postemergente estándar de (35 a 280 g ae/ha, preferiblemente 70 – 140 g ae/ha) para el control de muchos pastos y especies de malezas de hoja ancha.

5

- i) Las malezas de hoja ancha resistentes al inhibidor ALS como la *Amaranthus rudis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album* (entre otras, Heap, 2005) se podrían controlar al mezclar un tanque de 280 – 2240 g ae/ha, más preferiblemente 560 – 1120 g ae/ha, 2,4-D. Para el fluroxipir, las tasas de aplicación variarán típicamente de 35 – 560 g ae/ha, más típicamente 70 – 280 ae/ha.

10

- ii) Las especies de hoja ancha inherentemente más tolerantes a los herbicidas de imidazolinona como la *Ipomoea spp.* también se pueden controlar al mezclar con tanque de 280 – 2240 g ae/ha, más preferiblemente 560 – 1120 g ae/ha, 2,4-D. Ver las tasas anteriores para triclopir o fluroxipir.

15

- b) Una combinación múltiple de imazetapir (35 – 280 g ae/ha, preferiblemente 70 – 140 g ae/ha) +/- 2,4-D (280 – 1120 g ae/ha) +/- fluroxipir (a las tasas listadas anteriormente), por ejemplo, podrían suministrar un especto de control de malezas traslapante más robusto. Adicionalmente, el espectro traslapante suministra un mecanismo adicional para el manejo o retraso de las malezas resistentes al herbicida.

20

25

Un experto en la técnica de control de malezas reconocerá que el uso de cualquiera de los varios herbicidas de imidazolinona comerciales, herbicidas de auxina fenoxiacética o piridiloxiacética, solas o en combinaciones múltiples, es posibilitado por la transformación del AAD-13 (vl) al apilar con cualquier rasgo de tolerancia a la imidazolinona mediante producción convencional o ingeniería genética. Las tasas específicas para otros herbicidas representativos de estas químicas se pueden determinar mediante las etiquetas herbicidas compiladas en el libro CPR (Referencia de Protección de Cultivo) o compilaciones similares, etiquetas compiladas en línea (por ejemplo, cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía de protección de cultivo comercial o académica tal como la Guía de Protección de Cultivos de Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo posibilitado por el uso de los HTC mediante AAD-13 (vl), sea utilizado solo, mezclado en tanque, o secuencialmente, se considera dentro del alcance de esta invención.

15 Ejemplo 20 – AAD-13 (vl) Apilado con Rasgos de Resistencia a Insectos (IR) u otras Características en cualquier Cultivo

La resistencia a insectos en cultivos suministrados mediante un rasgo transgénico es prevalente en la producción de maíz y algodón en Norte América y en todo el mundo. Los productos comerciales que han combinado los rasgos IR y HT se han desarrollado en múltiples compañías de semillas. Estas incluyen los rasgos Bt IR (por ejemplo, toxinas Bt listadas en el sitio de red.lifesci.sussex.ac.uk, 2006) y cualquiera o todos los rasgos HTC mencionados anteriormente. El valor que este ofrecimiento lleva es la capacidad a controlar múltiples problemas de plagas a través de medios genéticos en un ofrecimiento único. La conveniencia de este ofrecimiento se restringirá si el control de maleza y el control de insectos se logran independientes uno del otro. El AAD-13 (vl) solo o apilado con uno o más

rasgos HTC adicionales se puede apilar con uno o más rasgos de entrada adicionales (por ejemplo, resistencia a insectos, resistencia a hongos, o tolerancia al estrés, et al.) (isb.vt.edu/cfdocs/fieldtest1.cfm, 2005) sea a través de una producción convencional o conjuntamente como un evento de transformación
5 novedoso. Los beneficios incluyen la conveniencia y flexibilidad descrita en ejemplos previos junto con la capacidad a manejar plagas de insectos y/o otras tensiones agronómicas además del control a malezas mejorado ofrecido por el AAD-13 y la tolerancia al herbicida asociado. Así, la invención objeto se puede utilizar para suministrar un paquete agronómico completo de una calidad de cultivo
10 mejorada con la capacidad de controlar flexiblemente y efectiva en costos cualquier número de temas agronómicos.

Los rasgos combinados del IR y el HT tienen aplicación en la mayoría de los cultivos agronómicos y hortícolas/ornamentales y forestales. La combinación
15 del AAD-13 y su tolerancia a herbicida conmensurable y la resistencia a insectos lograda por cualquier número de genes Bt o genes IR no Bt se puede aplicar a las especies de cultivo listadas (pero no se limita a) en el Ejemplo 13. Un experto en la técnica de control de malezas reconocería que el uso de los varios herbicidas comerciales descritos en los Ejemplos 18 – 20, herbicidas de auxina fenoxiacética
20 o piridiloxiacética, solos o en combinaciones múltiples, se posibilitan mediante la transformación del AAD-13 (VI) y el apilado con el correspondiente rasgo HT o rasgo IR mediante producción convencional o ingeniería genética. Las tasas específicas de otros herbicidas representativos de estas químicas se pueden determinar mediante las etiquetas herbicidas compiladas mediante el libro CPR
25 (Referencia de Protección de Cultivo) o compilaciones similares, etiquetas compiladas en línea (por ejemplo, cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía de protección de cultivo comercial o académica tal como la Guía de Protección de

Cultivo de Agrilance (2005). Cada herbicida alternativo posibilitado por el uso de los HTC mediante el AAD-13 (vl), sea utilizado solo, mezclado en tanque, o secuencialmente, se considera dentro del alcance de esta invención.

5 Ejemplo 21 – AAD-13 (vl) como un Marcador Seleccionable de Dicotiledónea *in vitro*

La ingeniería genética de la célula de plantas, tejidos, órganos y plantas u organelos tales como los plastidios inician con el proceso de insertar genes de
10 interés en las células vegetales que utilizan un método de suministro adecuado. Sin embargo, cuando se suministra un gen a las células de planta, solamente un porcentaje extremadamente pequeño de células integran el gen heterogéneo en su genoma. Con el fin de seleccionar aquellas pocas células que han incorporado el gen de interés, los investigadores enlazan un "gen marcador" seleccionable o
15 escogible al gen de interés (GOI) en el vector. Las células que contienen estos marcadores se identifican desde la población completa de células/tejido a las cuales se suministró el vector del plásmido de ADN. Al seleccionar aquellas células que expresan el gen marcador, los investigadores son capaces de identificar aquellas pocas células que pueden haber incorporado el GOI en su
20 genoma. El AAD-13 (vl) puede funcionar como un marcador seleccionable cuando se utiliza como en el Ejemplo #24 de la solicitud de patente WO 2007/053482 (Wright et al.).

REIVINDICACIONES

Reivindicamos:

- 5 1. Una célula de planta transgénica que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de dioxigenasa ariloxialcanoato, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína hibrida bajo condiciones exigentes con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, y SEQ
10 ID NO:5, en donde la hibridación se conduce a 65° C con 0.2x SSPE.
2. La célula de la reivindicación 1 en donde la expresión de dicho polinucleótido imparte a dicha célula una capacidad de convertir un herbicida auxina fenoxiacetato en una molécula no herbicida.
- 15 3. La célula de la reivindicación 1 en donde la expresión de dicho polinucleótido imparte a dicha célula una capacidad de convertir un herbicida auxina piridiloxi en una molécula no herbicida.
- 20 4. Una planta transgénica que comprende una pluralidad de células de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la expresión de dicho polinucleótido presenta dicha tolerancia de la planta a dicho herbicida.
- 25 5. Un método para proteger una planta de la reivindicación 4 del daño mediante un herbicida ariloxialcanoato, dicho método comprende aplicar dicho herbicida ariloxialcanoato a un área donde crece dicha planta.

6. El método de la reivindicación 5 en donde dicha célula de planta transgénica es una célula de planta de una planta de cultivo transgénico que crece en el campo.

5 7. La célula de planta de la reivindicación 1, dicha célula de planta comprende adicionalmente un segundo gen heterólogo para tolerancia herbicida, dicho segundo gen de tolerancia herbicida se selecciona del grupo que consiste de un gen AAD-1 y un gen AAD-12.

10 8. Un método para controlar malezas, dicho método comprende aplicar un herbicida 2,4-D a una planta de cultivo y a una maleza, dicha planta de cultivo comprende una pluralidad de células de planta de acuerdo con la reivindicación 1.

15 9. El método de la reivindicación 8, en donde dicha planta de cultivo es una planta de soya.

10. El método de la reivindicación 8, en donde dicha maleza es resistente al glifosato.

20

11. Un método para proteger una planta de cultivo del daño mediante un herbicida ariloxialcanoato, dicho método comprende hacer crecer una planta que comprende un gen AAD-13, y aplicar dicho herbicida a dicha planta.

25

12. El método de la reivindicación 11 en donde dicha herbicida es 2,4-D.

13. El método de la reivindicación 8 en donde dicha planta comprende adicionalmente un gen resistente al glifosato, y dicho método comprende adicionalmente aplicar glifosato a dicha planta y a dicha maleza.

5 14. El método de la reivindicación 13, dicha planta comprende adicionalmente un tercer gen de resistencia herbicida, y dicho método comprende adicionalmente aplicar un tercer herbicida a dicha planta y a dicha maleza.

10 15. Una planta transgénica que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una enzima que confiere resistencia a un herbicida auxina piridiloxi.

16. La planta transgénica de la reivindicación 15, dicho polinucleótido también confiere resistencia a un herbicida auxina fenoxi.

15 17. La planta de la reivindicación 16, dicho herbicida auxina fenoxi se selecciona del grupo que consiste de 2,4-D y MCPA.

18. La planta de la reivindicación 15, dicha planta comprende adicionalmente por lo menos un gen resistente al herbicida adicional.

20

19. Una planta que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de dioxigenasa ariloxialcanoato, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína híbrida bajo condiciones exigentes con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, y SEQ ID NO:5.

25

20. Un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de dioxigenasa ariloxialcanoato, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína hibrida bajo condiciones exigentes con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, y SEQ ID NO:5, en donde dicho polinucleótido comprende una composición de codón que se optimiza para expresión en una planta.
21. El polinucleótido de la reivindicación 20 en donde dicha proteína tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4.
22. Un método para seleccionar una célula de planta transformada de la reivindicación 21 en donde dicho método comprende someter una pluralidad de células de planta a la transformación con dicho polinucleótido, luego hacer crecer dicha células en una concentración de un herbicida que permite células transformadas que expresan dicho polinucleótido para hacer crecer aunque se mate o inhiba el crecimiento de células no transformadas, en donde dicha herbicida se selecciona del grupo que consiste de una auxina fenoxi y un herbicida auxina piridiloxi.
23. El método de la reivindicación 22 en donde dicha células son células de una planta y dicho método se utiliza para seleccionar una planta transformada.
24. Un método para controlar por lo menos una maleza en un campo, dicho método comprende plantar en dicha semilla de campo de por lo menos una planta transgénica, dicha planta comprende

un polinucleótido heterólogo que codifica una enzima que confiere resistencia a un herbicida auxina piridiloxi, y

5 un segundo polinucleótido heterólogo que codifica una enzima que confiere resistencia a por lo menos otro herbicida; dicho método comprende adicionalmente aplicar a por lo menos una porción de dicho campo un primer herbicida seleccionado del grupo que consiste de un herbicida auxina piridiloxi y un herbicida auxina fenoxi; y aplicar dicho por lo menos
10 otro herbicida a dicha por lo menos una porción de dicho campo.

25. El método de la reivindicación 24 en donde dichos herbicidas se aplican secuencialmente o concurrentemente.

15 26. El método de la reivindicación 24 en donde dicho primer herbicida es un herbicida auxina fenoxi.

27. El método de la reivindicación 24 en donde dicho por lo menos otro herbicida se selecciona del grupo que consiste de acetoclor, acifluorfen, aloxidima, amidosulfurón, aminopirialid, atrazina, beflubutamid, bispiribac,
20 butafenacil, cafenstrol, carfentrazona, clorimuron, clorotoluron, cinidon-etilo, cletodim, clodinafop, clomazona, cloproxidim, clopiralid, cloransulam, cianazina, ciclosulfamuron, cicloxidim, cihalofof, daimuron, dicamba, diclofop, diclosulam, diflufenican, dimeluegoamid, diquat, ditiopir, diurón, etalfluralin, fenoxaprop, flazasulfurón, florasulam, fluazifop, flucarbazona,
25 flufenacet, flufenican, flufenpir, flumetsulam, flumiclorac, fiumioxazin, fluroxipir, flutiacet, fomesafen, foramsulfurón, glufosinato, glifosato,

halosafen, halosulfurón, haloxifop, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir, imazosulfurón, yodosulfurón, ioxinil, isoxaben, isoxaflutol, lactofen, linuron, mefenacet, mefluidida, mesosulfurón, mesotriona, metamifop, metazaclor, metosulam, metribuzin, MSMA, napropamida, nicosulfurón, norflurazon, orizalin, oxadiazón, oxifluorfen, paraquat, pebulato, pendimetalin, penoxsulam, picloram, picolinafen, pinoxaden, primisulfurón, profoxidim, propanil, piraflufen, pirazosulfurón, piribenzoxim, piriminobac, piritiobac, piroxasulfona, piroxsulam, quinclorac, quinmerac, quizalofop, rimsulfurón, setoxidim, simazina, sulcotriona, sulfentrazona, sulfometurón, tefuriltriona, tembotriona, tepraloxidim, terbacil, tiazopir, tidiazuron, tiencarbazona, tifensulfurón, tiobencarb, topramezona, tralcoxidim, triasulfurón, tribenuron, triclopir, trifloxisulfurón, trifluralin, trifiusulfurón, y tritosulfurón.

15 28. Un método para ensayar una proteína por su capacidad de dividir un herbicida piridiloxialcanoato, dicho método comprende proporcionar una muestra que comprende dicha proteína y un herbicida auxina piridiloxi, y ensayar dicha muestra para la presencia de un cloropiridinol.

20 29. Un método para ensayar una proteína para la actividad de dioxigenasa ariloxialcanoato en donde dicho método comprende proporcionar una muestra que comprende dicha proteína y 2-(2-cloro,4-nitrofenoxi) propionato y/o acetato, y ensayar dicha muestra para la presencia de un 2-cloro ,4-nitrofenol.

25

30. Un casete de expresión heredable que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que degrada enzimáticamente por lo

menos un herbicida seleccionado del grupo que consiste de una auxina fenoxi y una auxina piridiloxi, en donde dicha molécula de ácido nucleico hibrida bajo condiciones exigentes con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, y SEQ ID NO:5.

31. El casete de expresión de la reivindicación 30 en donde dicho promotor es un promotor de planta.

32. El casete de expresión de la reivindicación 30 que comprende un promotor seleccionado de un promotor del virus mosaico de vena cassava, promotor CaMV 35S, promotor del Virus Mosaico Figwort, promotor de actina de arroz, promotor faseolian, promotor Arabidopsis taliana Ubiquitina 10, promotor ubiquitina de maíz, promotor Arabidopsis taliana Act2, promotor Arabidopsis taliana Ubiquitina 11, y promotor Arabidopsis taliana Ubiquitina 3.

33. El método de la reivindicación 24 en donde dicha planta es resistente a una formulación herbicida que comprende glifosato.

34. Un método para controlar malezas en un campo, en donde dicho método comprende aplicar un primer herbicida a dicho campo y plantar una semilla en dicho campo dentro de los 14 días al aplicar dicho primer herbicida, en donde dicha semilla comprende una célula de la reivindicación 1, y en donde dicho primer herbicida se selecciona del grupo que consiste de una auxina fenoxi y una auxina piridiloxi.

- 35. El método de la reivindicación 34 en donde dicho primer herbicida es un ácido, una sal inorgánica, una sal orgánica, o un éster.

- 36. El método de la reivindicación 34 en donde dicha semilla comprende un
5 segundo gen que presenta dicha planta resistente a un segundo herbicida, y dicho método comprende adicionalmente aplicar dicho segundo herbicida a dicho campo antes de dicha plantación.

- 37. El método de la reivindicación 36 en donde dicho segundo herbicida se
10 selecciona del grupo que consiste de glifosato, gramoxona, y glufosinato.

- 38. Un método para detectar si una planta comprende un polinucleótido de la reivindicación 20 en donde dicho método comprende recolectar una muestra de dicha planta y ensayar dicha muestra para la presencia de dicho
15 polinucleótido.

- 39. El método de la reivindicación 38 en donde dicho método comprende ensayar dicha muestra para la presencia de una proteína codificada por dicho polinucleótido.
20

- 40. El método de 38 en donde dicho método comprende utilizar un cebador PCR o sonda para detectar para la presencia de dicho polinucleótido.

- 41. El método de 39 en donde dicho método comprende utilizar un anticuerpo
25 para detectar para la presencia de dicha proteína.

42. La planta de la reivindicación 15 en donde dicha planta comprende adicionalmente un gen de resistencia a los insectos derivado de un organismo seleccionado del grupo que consiste de *Bacillus thuringiensis*, *Photorhabdus*, y *Xenorhabdus*.

5

43. La planta de la reivindicación 15 en donde dicha planta comprende adicionalmente un gen para una característica agronómica seleccionada del grupo que consiste de resistencia fúngica, tolerancia a la tensión, producción incrementada, perfil de aceite mejorado, calidad de fibra mejorada, resistencia vírica, maduración retrazada, tolerancia al frío, y tolerancia a la sal.

10

44. Un método para controlar por lo menos una maleza en un campo, dicho método comprende hacer crecer por lo menos una planta transgénica de la reivindicación 15 en dicho campo, y aplicar un herbicida auxina piridiloxi a por lo menos una porción de dicho campo.

15

45. Un método para controlar por lo menos una maleza en un campo, dicho método que comprende hacer crecer por lo menos una planta de la reivindicación 16 en dicho campo, y aplicar un herbicida auxina fenoxi a por lo menos una porción de dicho campo.

20

46. El método de la reivindicación 44, comprende adicionalmente aplicar un herbicida auxina fenoxi a por lo menos una porción de dicho campo.

25

47. El método de la reivindicación 44, dicha auxina piridiloxi es fluroxipir.

48. El método de la reivindicación 45, dicho herbicida auxina fenoxi seleccionada del grupo que consiste de 2,4-D y MCPA.
49. El método de la reivindicación 45 en donde dicha planta es resistente al un
5 herbicida seleccionada del grupo que consiste de glifosato, glufosinato, imazetapir, clorsulfurón, dicamba, mesotriona, isoxaflutol, y butafenacilo.
50. El método de la reivindicación 45 en donde dicha herbicida es una auxina fenoxi aquiral.
10
51. El método de la reivindicación 24 en donde dicha planta es una monocotiledonea.
52. El método de la reivindicación 51 en donde dicha monocotiledonea se
15 selecciona del grupo que consiste de maíz, arroz, trigo, cebada, centeno, césped de estaciones de invierno, avenas, sorgo, y pasto.
53. El método de la reivindicación 24 en donde dicho primer herbicida ie una auxina fenoxi y dicha planta es una dicotiledonea.
20
54. El método de la reivindicación 53 en donde dicha dicotiledonea se selecciona del grupo que consiste de algodón, tabaco, canola, y soya.
55. Un método que confiere resistencia herbicida a un cultivo en donde dicho
25 método comprende introducir en por lo menos una célula de planta de dicho cultivo un polinucleótido que codifica una enzima capaz de utilizar un herbicida auxina piridiloxi y un herbicida auxina fenoxi como un sustrato.

56. Un método para controlar resistencia al glifosato, tolerante naturalmente al glifosato, y/o semillas tolerantes al glufosinato natural en un campo de glifosato y/o plantas de cultivo tolerantes al glufosinato, en donde dichas plantas comprenden un polinucleótido de la reivindicación 13, y dicho método comprende aplicar un herbicida ariloxialcanoato a por lo menos una porción de dicho campo.
57. El método de la reivindicación 56 en donde dicha herbicida es una auxina fenoxi.
58. El método de la reivindicación 57 en donde dicha auxina fenoxi es 2,4-D.
59. Un método para controlar malezas que son resistentes a un herbicida que inhibe ALS en un campo de plantas de cultivo que comprende un polinucleótido de la reivindicación 20, dicho método comprende aplicar un herbicida ariloxialcanoato a por lo menos una porción de dicho campo.
60. La célula de la reivindicación 1 en donde dicha célula de planta se selecciona del grupo que consiste de células dicotiledoneas y células monocotiledoneas.
61. La célula de la reivindicación 60 en donde dicha célula de planta es dicotiledonea y seleccionada del grupo que consiste de una célula algodón, una célula de tabaco, una célula de canola, una célula soya, y una célula Arabidopsis.

62. La célula de la reivindicación 60 en donde dicha célula de planta es una célula monocotiledonea seleccionada del grupo que consiste de una célula de arroz y una célula de maíz.
- 5 63. La célula de la reivindicación 61 en donde dicho herbicida auxina piridiloxi se selecciona del grupo que consiste de fluroxipir.
64. La planta de la reivindicación 4 en donde la expresión de dicho polinucleótido presenta dicha planta resistente a un herbicida auxina fenoxiacetato y un herbicida auxina piridiloxi.
- 10 65. El método de la reivindicación 8 en donde dicho método comprende aplicar un segundo herbicida.
- 15 66. El método de la reivindicación 22 en donde dicho herbicida 2,4-D y dicho segundo herbicida se aplican secuencialmente.
67. El método de la reivindicación 22 en donde dicho primer herbicida y dicho segundo herbicida se aplican concurrentemente.
- 20 68. El método de la reivindicación 8 en donde dicha planta es resistente al glifosato.
69. El método de la reivindicación 24 en donde dicho segundo polinucleótido es un EPSPS modificado (sintasa 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato) o GAT.
- 25

70. El método de la reivindicación 24 en donde dicho primer herbicida es una auxina fenoxi y dicho segundo herbicida se selecciona del grupo que consiste de glifosato y glufosinato.
- 5 71. El método de la reivindicación 70 en donde dicha auxina fenoxi es 2,4-D y dicho segundo herbicida es glifosato.
72. El método de la reivindicación 24 en donde dicho método comprende adicionalmente aplicar un tercer herbicida.
- 10 73. Un polinucleótido optimizado para expresión en una planta en donde dicho polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de dioxigenasa ariloxialcanoato, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína hibrida bajo condiciones exigentes con el complemento
- 15 completo de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, y SEQ ID NO:5.
74. El polinucleótido de la reivindicación 44 en donde dicho polinucleótido se optimiza para la expresión en una planta dicotiledonea o una planta
- 20 monocotiledonea.
75. Un polinucleótido aislado que codifica una proteína que degrada enzimáticamente un herbicida seleccionado del grupo que consiste de una auxina fenoxi y una auxina piridiloxi, en donde una molécula de ácido
- 25 nucleico que codifica dicha proteína hibrida bajo condiciones exigentes con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, y SEQ ID NO:5, en donde dicho

polinucleótido se liga operablemente a un promotor que es funcional en una célula de planta.

76. El polinucleótido de la reivindicación 75 en donde dicho promotor es un promotor de planta.

77. El polinucleótido de la reivindicación 76 en donde dicho promotor es un promotor del virus mosaico de vena cassava.

78. El método de la reivindicación 22 en donde dicho polinucleótido se utiliza como un marcador seleccionable.

79. Una semilla que comprende una célula de planta de la reivindicación 1.

80. Una planta crece de la semilla de la reivindicación 79.

81. Un propagado asexual, progenia o parte regenerable de la planta de la reivindicación 4.

82. El método de la reivindicación 8 en donde dicho método se utiliza para tratar o prevenir semillas resistentes al herbicida.

83. La planta de la reivindicación 4 en donde dicha planta comprende adicionalmente un gen de resistencia a los insectos derivado de un organismo seleccionada del grupo que consiste de *Bacillus thuringiensis*, *Photobacterium*, y *Xenorhabdus*.

84. La planta de la reivindicación 4 en donde dicha planta comprende adicionalmente un gen para un rasgo agronómico seleccionada del grupo que consiste de resistencia fúngica, tolerancia a la tensión, producción incrementada, perfil de aceite mejorado, calidad de fibra mejorada, resistencia vírica, maduración retrazada, tolerancia al frío, y tolerancia a la sal.
85. Un método para controlar resistencia de las malezas al glifosato en un campo de plantas de cultivos tolerantes al glifosato, en donde dicha plantas comprenden un polinucleótido de la reivindicación 20, y dicho método comprende aplicar un herbicida ariloxialcanoato a por lo menos una porción de dicho campo.
86. El método de la reivindicación 85 en donde dicho herbicida es una auxina fenoxi.
87. El método de la reivindicación 25 en donde dichos herbicidas se aplican de una mezcla de tanque.
88. El método de la reivindicación 10 en donde dicha por lo menos una de dichas malezas comprende por lo menos una planta voluntaria resistente al glifosato de una especie diferente que dicho cultivo transgénico.
89. Un método para seleccionar por lo menos una célula transgénica de planta de la reivindicación 1 en donde dicho método comprende aplicar un herbicida ariloxialcanoato en y/o cerca de dichas células de planta transgénicas y a células de plantas carentes que les falta dicho

polinucleótido, y permitir que crezcan dichas células de planta transgénica y dicha células de plantas carentes.

- 5 90. El método de la reivindicación 89 en donde dicha célula de planta transgénica es una célula de planta de una planta de cultivo transgénico que crece en el campo, y dichas células carentes son células de una maleza que crece en dicho campo.
- 10 91. El método de la reivindicación 89 en donde dicha célula de planta transgénica es una célula de planta transformada con dicho polinucleótido, y dicha carencia de células no son transformantes, y todas dichas células crecen en medio de cultivo de tejido.
- 15 92. Un método para controlar por lo menos una maleza en un campo, dicho método comprende hacer crecer por lo menos una planta transgénica de la reivindicación 4 en dicho campo, y aplicar un primer herbicida a por lo menos una porción de dicho campo, dicho primer herbicida se selecciona del grupo que consiste de 2,4-D y fluroxipir, dicha planta comprende adicionalmente un segundo gen heterólogo imparte dicha planta con
- 20 resistencia a un inhibidor de una enzima HPPD (4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa)
- y/o
- 25 resistencia a un herbicida que inhibe oxidasa protoporfirinógeno IX (PPO), y aplicar n inhibidor HPPD y/o un inhibidor PPO a dicho campo antes, después de, y/o concurrente con dicho primer herbicida.

93. Un método para controlar por lo menos una maleza en un campo, dicho método comprende hacer crecer por lo menos una planta transgénica de la reivindicación 4 en dicho campo, y aplicar un primer herbicida a por lo menos una porción de dicho campo, dicho primer herbicida se selecciona del grupo que consiste de 2,4-D y fluroxipir, y aplicar un segundo herbicida a dicho campo, en donde dicho segundo herbicida se utiliza selectivamente con dicha planta específica donde una segunda característica de tolerancia herbicida no es necesaria, y en donde dicho segundo herbicida se aplica antes, después, y/o concurrente con dicho primer herbicida.

94. La célula de planta transgénica de la reivindicación 1, en donde dicha proteína tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4.

95. La célula de planta transgénica de la reivindicación 1, en donde dicha proteína tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO:4.

96. El polinucleótido de la reivindicación 20 en donde dicha proteína tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4.

97. Una planta de las reivindicaciones 4 o 15, en donde dicha planta comprende un insecticida biológico derivado de una fuente seleccionada del

grupo que consiste de *Bacillus popilliae*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, *Beauveria bassiana*, *Cydia pomonella* virus granulosus, polilla de Douglas fir tussock NPV, polilla gitana NPV, *Helicoverpa zea* NPV, virus de granulosus de polilla de la comida India, *Metarhizium anisopliae*, *Nosema locustae*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *P. lilacinus*, *Photographus*, *Xenorhabdus luminescens*, *Spodoptera exigua* NPV, factor oostático de modulación de tripsina, *Xenorhabdus nematophilus*, y *X. bovienii*.

- 10 98. Una planta de las reivindicaciones 4 o 15, en donde dicha planta comprende una planta incorpora insecticidas protectores seleccionados del grupo que consiste de Cry 1Ab, Cry 1Ac, Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3A, mir Cry3A, Cry3Bb1, Cry34, Cry35, y VIP3A.

GENES NOVEDOSOS CON RESISTENCIA A HERBICIDAS

Resumen

*

5 La invención objeto proporciona plantas novedosas que no solo son
resistentes al 2,4-D, sino que también a un herbicida piridiloxiacetato. La invención
objeto también incluye plantas que producen una o más enzimas de la invención
objeto "apiladas" juntas con uno más de otros genes de resistencia a herbicidas.
La invención objeto permite combinaciones novedosas de herbicidas para ser
10 utilizadas en nuevas formas. Adicionalmente, la invención objeto proporciona
métodos de preparación novedosos para prevenir el desarrollo de, y controlar,
cepas de malezas que son resistentes a uno o más herbicidas tales como
glifosato. La enzima preferida y el gen para uso de acuerdo con la invención objeto
se denominan aquí como AAD-13 (ariloxialcanoato dioxigenasa). Este
15 descubrimiento altamente novedoso es la base de herbicidas significativos con
rasgo de cultivo tolerante y oportunidad de marcador seleccionable.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Lira, Justin M.
Snodderley, Erika Megan
Robinson, Andrew E.
Wright, Terry R.
Merlo, Donald J.

<120> GENES NOVEDOSOS CON RESISTENCIA A HERBICIDAS

<130> DAS-142XC1 PCT

<140> PCT/US08/63212

<141> 2008-05-09

<150> 60/928,303

<151> 2007-05-09

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 864

<212> ADN

<213> Sphingobium herbicidovorans

<400> 1

atgtcaccog ccttcgacat cgccccgtc gacgccacgt tcggcgccgt cgtcaccggc	60
gtgaagctcg ccgatctcga tgatgccgga tggctcgacc tgcaggctgc ctggctcgag	120
tacgcactcc tcgttttccc cgatcagcat ctacgcgcg agcagcagat cgcctttgcc	180
cgtcgcttcg ggccactcga gttcgagatg gccgcgatca gcaacgtgcg gcccgacggc	240
agcctgcggg tcgagagcga caacgacgac atgatgaaga tcctgaaggg caacatgggc	300
tggcatgccg acagcaccta catgccggtc caggccaagg gcgcggtgtt cagtgccgaa	360
gtggttccta gcgtcggcgg ccagaccggc ttgcgccgaca tgcgcgcggc ctacgacgcg	420
ctcgacgagg atctgaaggc gcgcgtcgag acgctgcagg cccggcactc gctgcattac	480
agccagtoga agctcggcca ccagaccaag gcggccgacg gtgaatatag cggctacggg	540
ctgcatgacg ggcgggtgcc gctgcggccg ctggtgaaga tccatcccga gaccggccgc	600
aagtcgctgc tgatcggccg ccacgcccac gccattcccg gcttgagacc agccgagtec	660
gaacgcttgc tgcagcagct gatcgacttc gcctgccagc cgccgcgaat ctatcatcac	720
gactggggcg cgggcgacgc cgtgctgtgg gacaatcgct gcctgctgca ccaggcgacg	780
ccgtgggaca tgaccagaa gcgcacatg tggcacagcc gcatcgccgg cgacccggcc	840
agcgagaccg cgctggcgca ttga	864

<210> 2

<211> 287

<212> PRT

<213> Sphingobium herbicidovorans

<400> 2

Met Ser Pro Ala Phe Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ala Thr Phe Gly Ala
1 5 10 15

Val Val Thr Gly Val Lys Leu Ala Asp Leu Asp Asp Ala Gly Trp Leu
20 25 30

Asp Leu Gln Ala Ala Trp Leu Glu Tyr Ala Leu Leu Val Phe Pro Asp
35 40 45

Gln His Leu Thr Arg Glu Gln Gln Ile Ala Phe Ala Arg Arg Phe Gly
50 55 60

Pro Leu Glu Phe Glu Met Ala Ala Ile Ser Asn Val Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ser Leu Arg Val Glu Ser Asp Asn Asp Asp Met Met Lys Ile Leu Lys
85 90 95

Gly Asn Met Gly Trp His Ala Asp Ser Thr Tyr Met Pro Val Gln Ala
100 105 110

Lys Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val Pro Ser Val Gly Gly Gln
115 120 125

Thr Gly Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Glu Asp
130 135 140

Leu Lys Ala Arg Val Glu Thr Leu Gln Ala Arg His Ser Leu His Tyr
145 150 155 160

Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Gln Thr Lys Ala Ala Asp Gly Glu Tyr
165 170 175

Ser Gly Tyr Gly Leu His Asp Gly Pro Val Pro Leu Arg Pro Leu Val
180 185 190

Lys Ile His Pro Glu Thr Gly Arg Lys Ser Leu Leu Ile Gly Arg His
195 200 205

Ala His Ala Ile Pro Gly Leu Glu Pro Ala Glu Ser Glu Arg Leu Leu
210 215 220

Gln Gln Leu Ile Asp Phe Ala Cys Gln Pro Pro Arg Ile Tyr His His
225 230 235 240

Asp Trp Ala Pro Gly Asp Ala Val Leu Trp Asp Asn Arg Cys Leu Leu
245 250 255

His Gln Ala Thr Pro Trp Asp Met Thr Gln Lys Arg Ile Met Trp His

260

265

270

Ser Arg Ile Ala Gly Asp Pro Ala Ser Glu Thr Ala Leu Ala His
275 280 285

<210> 3
<211> 867
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Planta optimizada (v1)

<400> 3
atggcttcac ctgccttcga cattgcccc cttgatgcc cttttggggc agttgtcact 60
ggggtcaagt tggctgatct tgatgacgct ggatgggttg acctccaagc tgcctggctt 120
gaatatgccc tccttgtctt ccctgaccag cacttgacaa gggaacagca aatagctttc 180
gctcgcagat tccgaccact tgagttcgag atggcagcca tctccaatgt tagacccgat 240
ggcagcttga gggttgagtc tgacaatgat gacatgatga agatccctcaa aggcaacatg 300
ggatggcacg ctgacagcac ctacatgcc a gtgcaagcaa aggggtgcagt gttctcagct 360
gaagtggttc cctctgtggg tggccagact ggttttgctg acatgagagc tgcctatgat 420
gcacttgatg aagacttgaa ggctcgtgtc gagacattgc aagcccgtca ctccctccat 480
tactcccaga gcaagctcgg acaccagacc aaggctgcag atgggtgagta ctctgggttat 540
ggcctccatg atggggcctgt tcccttgagg ccacttgatga agatccatcc agagactggc 600
agaaaatccc ttctcatagg ccgtcatgcc catgccattc ctggattgga gccagctgag 660
tcagaaaggt tgctccagca actcattgat tttgcttgtc aaccccctag gatctaccac 720
catgactggg ctcttgagga tgcagtgtc tgggacaacc gctgcctcct tcaccaagcc 780
actccctggg acatgaccca gaaacgcac atgtggcaca gccgcattgc tggtgaccca 840
gcactctgaga ccgcacttgc acattga 867

<210> 4
<211> 288
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Planta optimizada (v1)

<400> 4

Met Ala Ser Pro Ala Phe Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ala Thr Phe Gly
1 5 10 15

Ala Val Val Thr Gly Val Lys Leu Ala Asp Leu Asp Asp Ala Gly Trp
20 25 30

Leu Asp Leu Gln Ala Ala Trp Leu Glu Tyr Ala Leu Leu Val Phe Pro.

35

40

45

Asp Gln His Leu Thr Arg Glu Gln Gln Ile Ala Phe Ala Arg Arg Phe
50 55 60

Gly Pro Leu Glu Phe Glu Met Ala Ala Ile Ser Asn Val Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ser Leu Arg Val Glu Ser Asp Asn Asp Asp Met Met Lys Ile Leu
85 90 95

Lys Gly Asn Met Gly Trp His Ala Asp Ser Thr Tyr Met Pro Val Gln
100 105 110

Ala Lys Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val Pro Ser Val Gly Gly
115 120 125

Gln Thr Gly Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Glu
130 135 140

Asp Leu Lys Ala Arg Val Glu Thr Leu Gln Ala Arg His Ser Leu His
145 150 155 160

Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Gln Thr Lys Ala Ala Asp Gly Glu
165 170 175

Tyr Ser Gly Tyr Gly Leu His Asp Gly Pro Val Pro Leu Arg Pro Leu
180 185 190

Val Lys Ile His Pro Glu Thr Gly Arg Lys Ser Leu Leu Ile Gly Arg
195 200 205

His Ala His Ala Ile Pro Gly Leu Glu Pro Ala Glu Ser Glu Arg Leu
210 215 220

Leu Gln Gln Leu Ile Asp Phe Ala Cys Gln Pro Pro Arg Ile Tyr His
225 230 235 240

His Asp Trp Ala Pro Gly Asp Ala Val Leu Trp Asp Asn Arg Cys Leu
245 250 255

Leu His Gln Ala Thr Pro Trp Asp Met Thr Gln Lys Arg Ile Met Trp
260 265 270

His Ser Arg Ile Ala Gly Asp Pro Ala Ser Glu Thr Ala Leu Ala His
275 280 285

<210> 5

<211> 867

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> E. coli optimizada (v2)

<400> 5

atggcgagcc cggcggttcga cattgcgcca ctggatgcta cctttggcgc agttgtaact	60
ggcgtaaaac tggcggatct ggatgacgct ggctggctgg acctgcaggc tgcgtggctg	120
gaatatgcac tgctggtatt cccggaccag cacctgaccc gtgaacagca gatcgctttc	180
gcacgccgct tcggtccact ggagttcgaa atggcagcga tctccaacgt tcgtccggat	240
ggcagcctgc gtgttgaatc tgacaacgat gacatgatga aaatcctgaa aggcaacatg	300
ggttggcacg ctgactctac ctacatgcc a gttcaggcaa aggggtgcagt gttcagcgt	360
gaagtggttc cgtctgtggg tggccagact ggttttgcgg acatgcgcgc tgcttatgat	420
gcactggatg aagacctgaa agctcgtgtt gaaacctgc aagcgcgtca ctccctgcat	480
tactcccagt ccaagctggg tcaccagacc aaagctgcgg atggtgagta ctctggttac	540
ggcctgcatg atggtccggt tccgctgcgt ccgctggtga aaatccatcc ggaaactggc	600
cgcaaattccc tgctgatcgg ccgtcatgcg caccgcattc cgggcctgga accggctgag	660
tctgaacgtc tgctgcaaca gctgattgat tttgcttgtc agccgcgcgc tatctaccac	720
cacgactggg cgccgggtga tgcagtgctg tgggacaacc gctgcctgct gcaccaagcg	780
actccgtggg acatgacca gaaacgcac atgtggcaca gccgcattgc gggtgacccg	840
gcatctgaga ccgcactggc acactaa	867

<210> 6
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador AAD-13 PTU

<400> 6

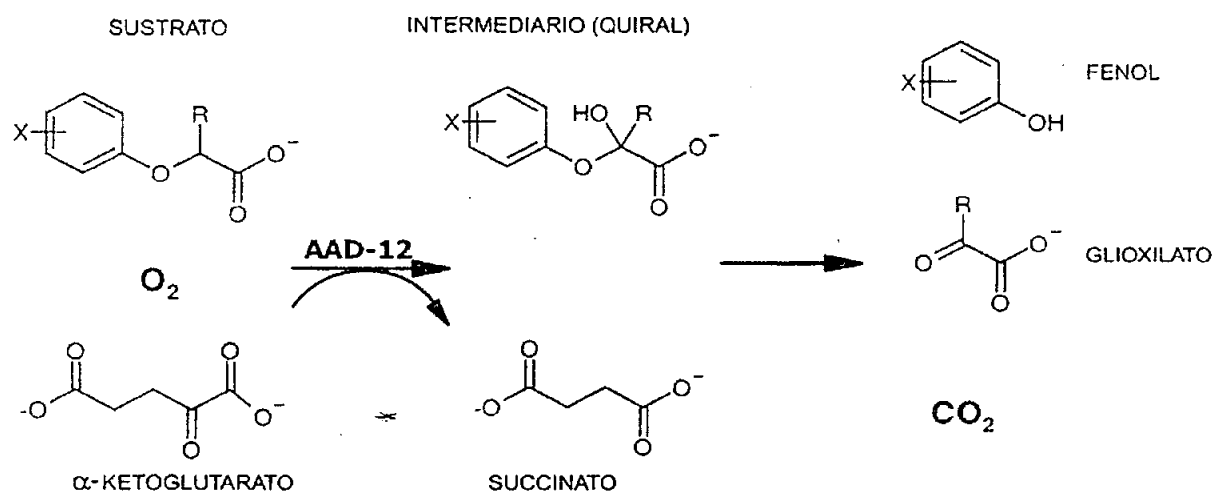
Ala Thr Gly Gly Cys Thr Cys Ala Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys	
1 5 10 15	
Thr Cys Ala Gly Cys Cys	
20	

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador AAD-13 PTU

<400> 7

cgggcaggcc taactccacc aa	22
--------------------------	----



- LA ADICION DE O_2 ES ESTEREOESPECIFICA
- LA DESCOMPOSICION DEL INTERMEDIARIO EN FENOL + GLIOXILATO ES ESPONTANEA

FIG. 1

ALINEACION ClustalW DE α -KETOGLUTARATO DIOXIGENASAS. LOS RESIDUOS CONSERVADOS EN EL 80% DE LAS SECUENCIAS SE ENCUENTRAN RESALTADOS (GRIS CLARO: ES IDENTICO, GRIS OSCURO: ES SIMILAR)

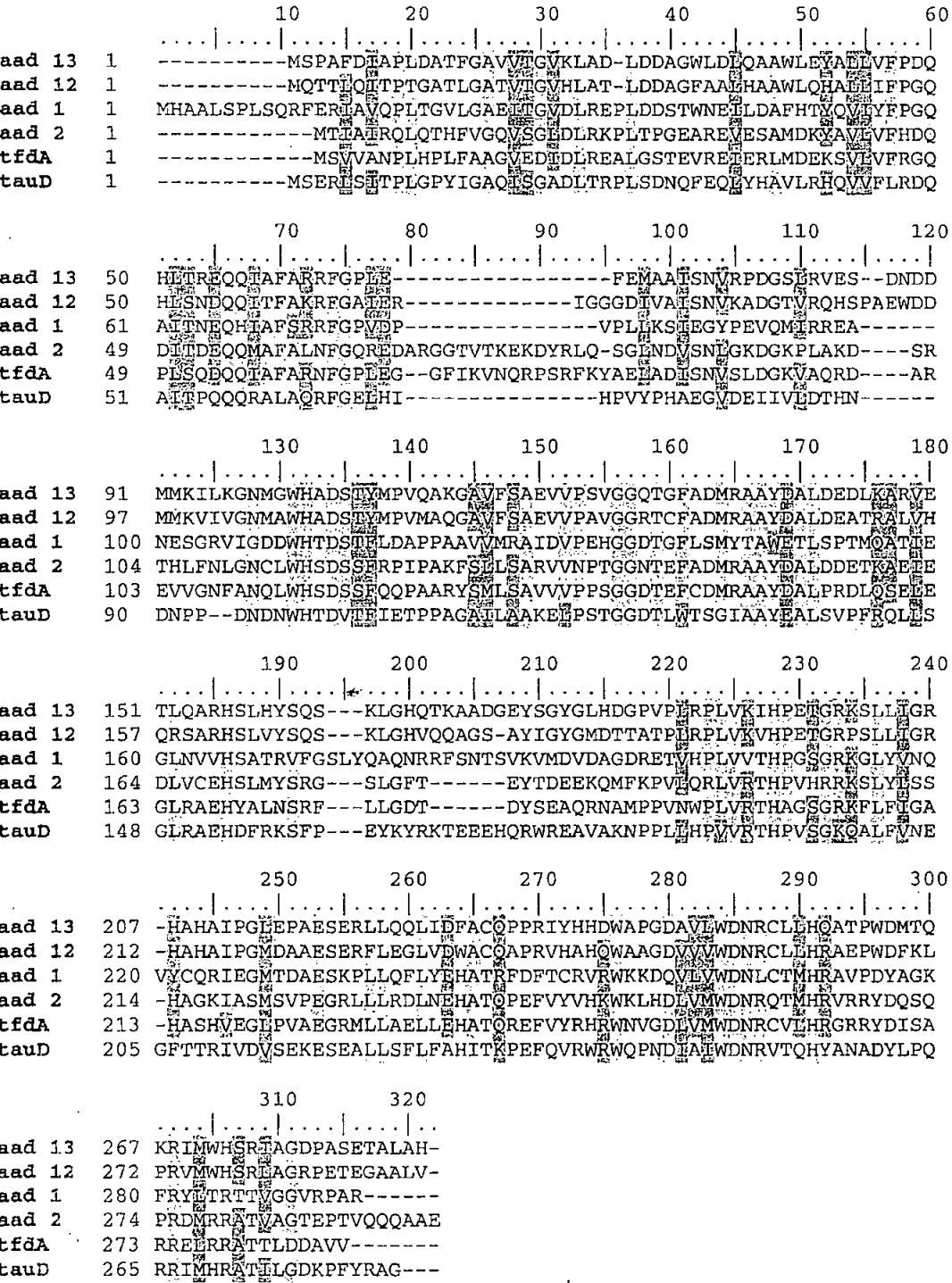


FIG. 2

ENSAYO ENZIMATICO ACOPLADO PARA LA DETECCION DE SUSTRATOS DE AAD-13

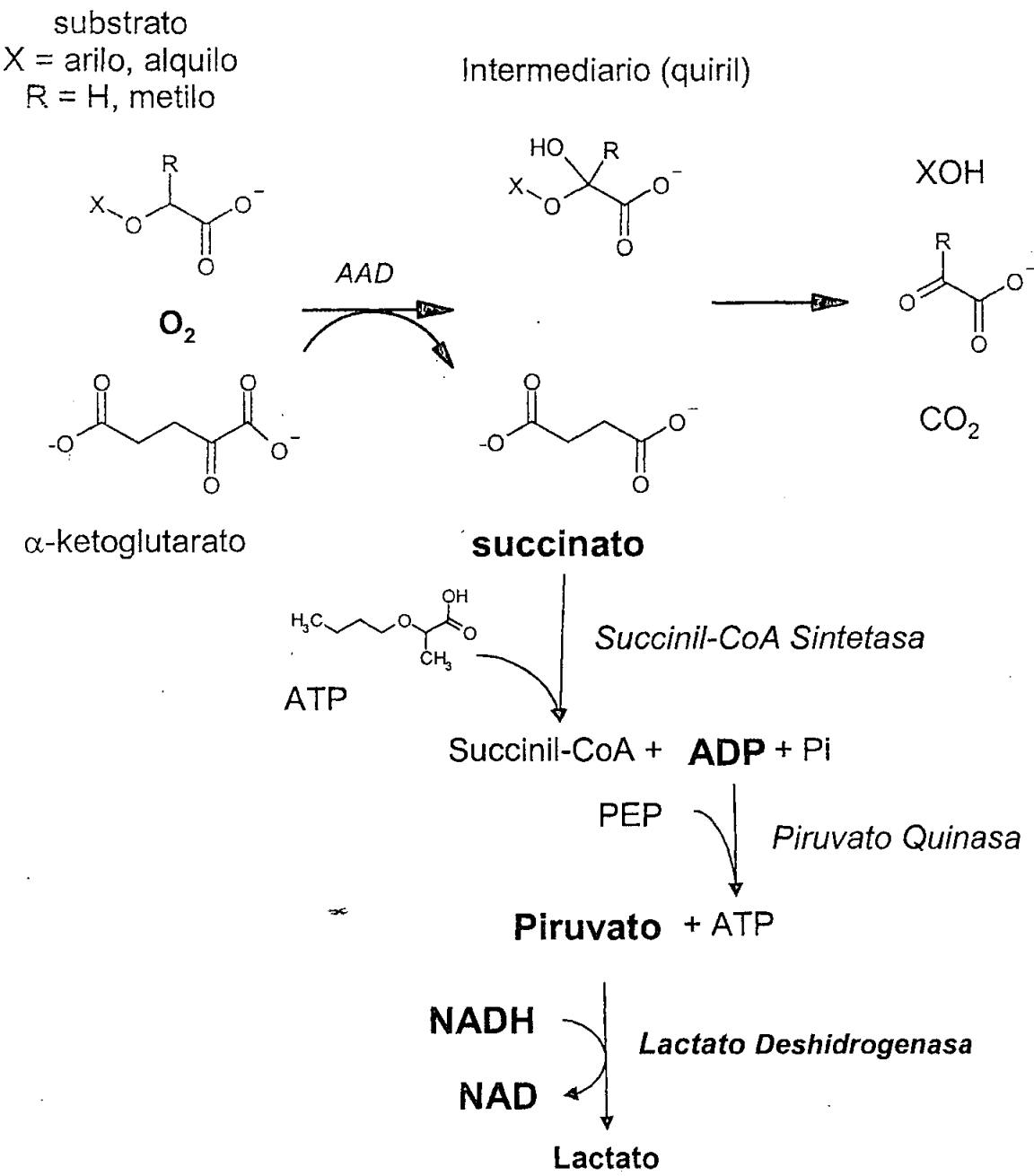


FIG. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/63212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 15/82; C12Q 1/68 (2008.04)

USPC - 800/279; 435/6

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

USPC - 800/279; 435/6

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST(DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB), Google(AAD-12, AAD-13, AAD-13 gene, AAD-12 gene, pyridyloxy auxin), Google Scholar(pyridyloxy auxin aryloxyalkanoate dioxygenase, SdpA pyridyloxy, SdpA pyridyl oxy, SdpA triclopyr, SdpA fluroxypyr)
GenCore: SEQ ID NO: 1 and 2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US2005/107437 A2 (WRIGHT et al) 17 Nov 2005 (17.11.2005); claims 38, 45, 47, 49, 52, 61, 64-65; para [0008], [0015]-[0020], [0074], [0079]-[0082], [0084], [0098], [0102], [0131], [0124], [0126], [0127], [0131], [0149], [0151], [0166], [0185]-[0195], [0218]-[0229], [0252], [0253], [0256], [0278], [0279], [0281], [0320]-[00323], [0396], [0453]-[0454], [0457], [0461], [0462], [0466]; pg 156, ln 17-19	15-18, 24-27, 33, 42-55, 69-72, 74, 87 1-14, 19-23, 30-32, 34-41, 56-68, 73, 75-86, 88-98
Y	MULLER et al. Genetic Analysis of Phenoxyalkanoic Acid Degradation in Sphingomonas herbicidovorans MH. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY Oct 2004, 70(10):6066-6075; Abstract; pg 6071, Table 1, EMBL accession no. AJ628860	1-14, 19-23, 30-32, 34-41, 56-68, 73, 75-86, 88-98
A	Kohler. GenBank Submission Q700X4_9SPHN. 5 July 2004. [Retrieved from the Internet on 11 Nov 2008: <URL:http://www.expasy.org/uniprot/Q700X4_9SPHN>]	21, 94-96

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 November 2008 (09 Nov 2008)

Date of mailing of the international search report

19 NOV 2008

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/63212

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I, claims 1-27, 30-98, drawn to a transgenic plant cell comprising a polynucleotide that encodes a protein having aryloxyalkanoate dioxygenase activity, wherein claims 1, 20, 30, 73, 75 are limited to SEQ ID NO:1, and claims 21, 94-96 are limited to SEQ ID NO:2.

Groups II and III, 1-27, 30-98, drawn to a transgenic plant cell comprising a polynucleotide that encodes a protein having aryloxyalkanoate dioxygenase activity, wherein claims 1, 20, 30, 73, 75 are limited to SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:5, respectively, and claims 21, 94-96 are limited to SEQ ID NO: 4.

Group IV, claims 28 and 29, drawn to a method of assaying a protein for its ability to cleave a pyridyloxyalkanoate herbicide.

—see Supplemental Sheet—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-27, 30-98, wherein claims 1, 20, 30, 73, 75 are limited to SEQ ID NO:1, and claims 21, 94-96 are limited to SEQ ID NO:2.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 08/63212

***** SUPPLEMENTAL PAGE *****

In Continuation of Box No. III:

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I-III do not include the inventive concept of assaying a protein for its ability to cleave a pyridyloxyalkanoate herbicide, as required by Group IV.

Although Groups I-III do share the technical feature of a transgenic plant cell comprising a polynucleotide that encodes a protein having aryloxyalkanoate dioxygenase activity, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art. Specifically, the article entitled "Regulation of the leucoanthocyanidin dioxygenase gene expression in *Vitis vinifera*" by Gollop et al. (Plant Science 2001, 161(3):579-588) discloses such a plant (title and pg 581, left col, the end of section 2.4). As the above transgenic plant cell was known at the time, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition, the claimed polynucleotides SEQ ID NO: 1, 3, 5 that encode a protein having aryloxyalkanoate dioxygenase activity do not share a significant structural element that is an improvement over the prior art. Specifically, GenBank Accession Number DQ406818 by Westendorf et al. (14-MAR-2006) discloses the (S)-2-(2,4-dichlorophenoxy)propionate/alpha-ketoglutarate dioxygenase (sdpA) gene of SEQ ID NO: 1.

Similarly, the claimed proteins having dioxygenase activity of SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO:4 do not share a significant structural element that is an improvement over the prior art. Specifically, the article entitled "Sphingomonas herbicidovorans MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader" by Kohler (Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 1999, 23(4-5):336-340) teaches the claimed SEQ ID NO: 2 (GenBank Accession Number Q700X4_9SPHN). Therefore, unity of invention is lacking.

Groups I-IV therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

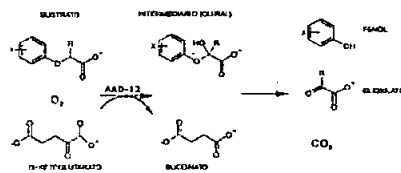
(21) N° de solicitud:					(51) Int Cl:	C12N 015/082
22) Fecha de solicitud:					(71) Solicitante(s)	DOW AGROSCIENCES LLC
(30) Prioridad	(31)	Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		60/928,303		09/05/2007		US
					(72) Inventor(es)	JUSTIN M. LIRA Y OTROS
					(74) Apoderado:	LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
(85)	Fecha limite inicio fase nacional:					09/12/2009
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT					
	Fecha de presentación de la solicitud:					09/05/2008
	No. de solicitud PCT/US2008/063212					
					(87)	Publicación internacional
					Fecha:	20/11/2008
					N° publicación:	WO 2008/141154 A3
(54) Título: NUEVOS GENES DE RESISTENCIA A HERBICIDAS						

Reivindicación(es):

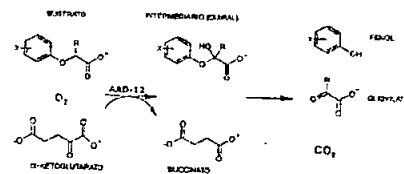
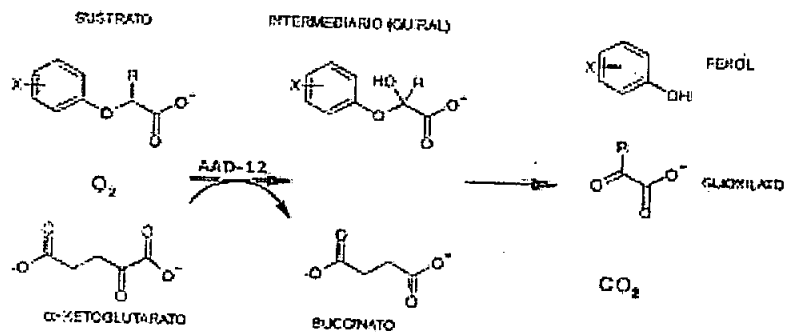
- Una célula de planta transgénica que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de dioxigenasa ariloxialcanoato, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína hibrida bajo condiciones exigentes con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, y SEQ ID NO:5, en donde la hibridación se conduce a 65° C con 0.2x SSPE.
- La célula de la reivindicación 1 en donde la expresión de dicho polinucleótido imparte a dicha célula una capacidad de convertir un herbicida auxina fenoxiacetato en una molécula no herbicida.
- La célula de la reivindicación 1 en donde la expresión de dicho polinucleótido imparte a dicha célula una capacidad de convertir un herbicida auxina piridiloxi en una molécula no herbicida.
- Una planta transgénica que comprende una pluralidad de células de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la expresión de dicho polinucleótido presenta dicha tolerancia de la planta a dicho herbicida.
- Un método para proteger una planta de la reivindicación 4 del daño mediante un herbicida ariloxialcanoato, dicho método comprende aplicar dicho herbicida ariloxialcanoato a un área donde crece dicha planta.
- El método de la reivindicación 5 en donde dicha célula de planta transgénica es una célula de planta de una planta de cultivo transgénico que crece en el campo.
- La célula de planta de la reivindicación 1, dicha célula de planta comprende adicionalmente un segundo gen heterólogo para tolerancia herbicida, dicho segundo gen de tolerancia herbicida se selecciona del grupo que consiste de un gen AAD-1 y un gen AAD-12.
- Un método para controlar malezas, dicho método comprende aplicar un herbicida 2,4-D a una planta de cultivo y a una maleza, dicha planta de cultivo comprende una

pluralidad de células de planta de acuerdo con la reivindicación 1.

- El método de la reivindicación 8, en donde dicha planta de cultivo es una planta de soya.
- El método de la reivindicación 8, en donde dicha maleza es resistente al glifosato.
- Un método para proteger una planta de cultivo del daño mediante un herbicida ariloxialcanoato, dicho método comprende hacer crecer una planta que comprende un gen AAD-13, y aplicar dicho herbicida a dicha planta.
- El método de la reivindicación 11 en donde dicha herbicida es 2,4-D.
- El método de la reivindicación 8 en donde dicha planta comprende adicionalmente un gen resistente al glifosato, y dicho método comprende adicionalmente aplicar glifosato a dicha planta y a dicha maleza.
- El método de la reivindicación 13, dicha planta comprende adicionalmente un tercer gen de resistencia herbicida, y dicho método comprende adicionalmente aplicar un tercer herbicida a dicha planta y a dicha maleza.
- Una planta transgénica que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una enzima que confiere resistencia a un herbicida auxina piridiloxi.

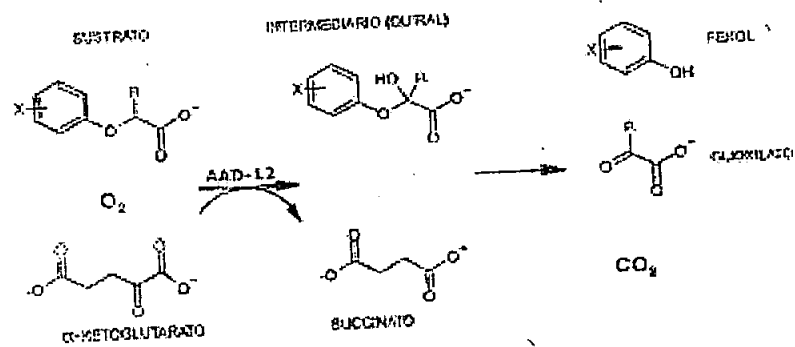


■ LA ADICION DE O₂ ES ESTEREOESPECIFICA
■ LA DESCOMPOSICION DEL INTERMEDARIO EN FENOL + GLIFOSATO ES ESPONTANEA



- LA ADICIÓN DE O_2 ES ESTEREOSPECÍFICA
- LA DESCOMPOSICIÓN DEL INTERMEDIARIO EN FENOL + GLIOXILATO ES ESPONTÁNEA

- LA ADICIÓN DE O_2 ES ESTEREOSPECÍFICA
- LA DESCOMPOSICIÓN DEL INTERMEDIARIO EN FENOL + GLIOXILATO ES ESPONTÁNEA



- LA ADICIÓN DE O_2 ES **ESTEREOESPECÍFICA**
- LA DESCOMPOSICIÓN DEL INTERMEDIARIO EN FEROL + GLUTAMATO ES ESPONTÁNEA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 82,159
FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-140880- -00000-0000

Fecha: 2009-12-09 17:06:27

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 310

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19808084	03/11/2009	58,972,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	*** TASA ANUAL C.RECARGO AÑOS 17 a 30
			1,090,000.00

TOTAL : \$ 1,090,000.00

SON: UN MILLON NOVENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010:10975-841-032-7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 84,014
FECHA : NOVIEMBRE 9 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-140880- -00000-0000

Fecha: 2009-12-09 17:06:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 310

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19808073	09/11/2009	26,465,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL A#OS 13 a 16 PARA MANT	651,000.00

TOTAL : \$ 651,000.00

SON: SEISCIENTOS CINCUENTA Y UNO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010:10975-841-032-7.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 87,649

FECHA : NOVIEMBRE 23 DE 2009



***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130919073	23/11/2009	16,776,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO	
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	*** TASA ANUAL A#OS 17 a 20 PARA MANT	872,000.00

TOTAL : \$ 872,000.00

SON: OCHOCIENTOS SETENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

10:10975-841-032-7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 87,663
FECHA : NOVIEMBRE 23 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-140880- -00000-0000

Fecha: 2009-12-09 17:06:27

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 310

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130919073	23/11/2009	16,776,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5,000.00
		TOTAL :	\$ 5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

210: 10978-841-032-7.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-140880-00000-0000

Fecha: 2009-12-09 17:06:27

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 310

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☒	Indicación que se solicita una patente.
☒	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☒	Descripción de la invención
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
DOW AGROSCIENCE LLC

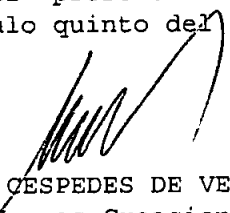
REFERENCIA	Radicación No.	09 140880
	Solicitud internacional	PCT/US2008/063212
	Fecha inicio fase nacional	09/12/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	438
	Oficio No.	916

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 29 ENE. 2010
adpall

Al contestar favor indique el número
de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia