Q.t

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 06-78810

54. **TÍTULO** "INTERMEDIARIOS DE QUINOLINA COMO INHIBIDORES DE RECEPTORES DE TIROSINA QUINASAS Y LA SÍNTESIS DE LOS MISMOS"

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C07D 215/54

71. **SOLICITANTE** WYETH

DOMICILIO NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS

74. **APODERADO** ALVARO CORREA ORDOÑEZ
T.P 20.281

22. **BOGOTÁ, D. C.,** AGOSTO 10, 2006

55

(FORMA P-10)

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-110105- -00000-0000
Fec: 2006-10-30 14:24:11 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Eve: 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios: 277

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

30-Nov-06

SOLICITUD DE:

① [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[ ] Capítulo I [X] Capítulo II

② SOLICITANTE (71)	Nombre: DOW AGROSCIENCES LLC Dirección: 9330 Zionsville Road, 46268 Indianapolis, IN, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA Nacionalidad o Domicilio: Indianapolis, IN, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA Lugar de Constitución: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA Teléfono: Fax: E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. [ ] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] Cual _____ Número _____
③ REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A. Dirección: CALLE 94A No. 7A-09 Teléfono: 610 7420 Fax. 610 0706 E-mail: info@castellanosyco.com	IDENTIFICACIÓN C.C. [X] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] Cual _____ Número 39'779.654 TPA 70.819
④ INVENTOR (ES) (72)	Nombre: TERRY R. WRIGHT; JUSTIN M. LIRA; DONALD J. MERLO; NICOLE HOPKINS Dirección: 14162 Charity Chase Circle, Westfield, IN 46074, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA; 12373 Ensley Drive, Fishers, IN 46038, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA; 11845 Durbin Drive, Carmel, IN 46032, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA; 2518 Chaseway Ct., Indianapolis, IN 46268, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA Nacionalidad o Domicilio ESTADOUNIDENSES	

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/014737 Fecha 02/05/2005

Publicación Internacional No. WO 2005/107437 A2 Fecha 17/11/2005

⑥ Título (54) NUEVOS GENES CON RESISTENCIA A LOS HERBICIDAS

⑦ Clasificación Internacional (51) A01H 5/00

⑧ Prioridad SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	30/04/2004	60/567,052

⑨ Comprobante de pago No. 06-82,046 Fecha Octubre 24 de 2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

(10) Anexos

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [X] Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional 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.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros **Tarjeta de Propietario, Tarjeta Temática, Extracto para la publicación**

(11) FIGURA CARACTERISTICA:

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

FIRMA:

C.C. No. 39.779.854 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

30 OCT. 2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página. - MCA/gcb - 6084-FNPCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-110105- -00000-0000
Fec: 2006-10-30 14:24:11 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII
Eva: 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios: 007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 82,046
FECHA : OCTUBRE 24 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	53373349	24/10/2006	2,040,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
17 November 2005 (17.11.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/107437 A2

(51) International Patent Classification⁷: A01H 5/00

(21) International Application Number:
PCT/US2005/014737

(22) International Filing Date: 2 May 2005 (02.05.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/567,052 30 April 2004 (30.04.2004) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: DOW AGROSCIENCES LLC [US/US]; 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 45268-1054 (US).

(72) Inventors; and
(75) *Inventors/Applicants (for US only)*: WRIGHT, Terry, R. [US/US]; 14162 Charity Chase Circle, Westfield, IN 46074 (US). LIRA, Justin, M. [US/US]; 12373 Ensley Drive, Fishers, IN 46038 (US). MERLO, Donald, J. [US/US]; 11845 Durbin Drive, Carmel, IN 46032 (US). HOPKINS, Nicole [US/US]; 2518 Chaseway Ct., Indianapolis, IN 46268 (US).

(74) Agents: SANDERS, Jay, M. et al.; Saliwanchik, Lloyd & Saliwanchik, A Professional Association, P.O. Box 142950, Gainesville, FL 32614-2950 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, 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:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2005/107437 A2

(54) Title: NOVEL HERBICIDE RESISTANCE GENES

(57) Abstract: The subject invention provides novel plants that are not only resistant to 2,4-D and other phenoxy auxin herbicides, but also to aryloxyphenoxypropionate 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 alone or "stacked" together with another herbicide resistance gene, preferably a glyphosate resistance gene, so as to provide broader and more robust weed control, increased treatment flexibility, and improved herbicide resistance management options. More specifically, preferred enzymes and genes for use according to the subject invention are referred to herein as *AAD* (aryloxyalkanoate dioxygenase) genes and proteins. No α-ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme has previously been reported to have the ability to degrade herbicides of different chemical classes and modes of action. This highly novel discovery is the basis of significant herbicide tolerant crop trait opportunities as well as development of selectable marker technology. The subject invention also includes related methods of controlling weeds. The subject invention enables novel combinations of herbicides to be used in new ways. Furthermore, the subject invention provides novel methods of preventing the formation of, and controlling, weeds that are resistant (or naturally more tolerant) to one or more herbicides such as glyphosate.

NOVEL HERBICIDE RESISTANCE GENES

Cross-Reference to Related Application

[0001] This application claims priority to U.S. provisional application Serial No. 60/567,052, filed April 30, 2004.

Background of the Invention

[0002] 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.

[0003] 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 corn, for example, can be sprayed to control weeds without significantly damaging the corn plants.

[0004] 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. 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.*, 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; *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.

[0005] 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.

[0006] 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). (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 3-5 years. Resistant weeds include both grass and broadleaf species—*Lolium rigidum, Lolium multiflorum, Eleusine indica, Ambrosia artemisiifolia, Conyza canadensis, Conyza bonariensis,* and *Plantago lanceolata.* 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.

[0007] 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-diclorophenoxyacetic 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 (Agriliance, 2003).

[0008] 2,4-D is in the phenoxy acid class of herbicides, as are MCPA, mecoprop, and dichlorprop. 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.

[0009] 2,4-D has different levels of selectivity on certain plants (*e.g.*, dicots are more sensitive than grasses). Differential metabolism of 2,4-D 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).

[0010] 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 is currently formulated to have 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.

[0011] 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).

[0012] 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.

[0013] One unique example with low homology to *tfdA* (28% amino acid identity) is *rdpA* from *Sphingobium herbicidovorans* (Kohler *et al.*, 1999, Westendorf *et al.*, 2002). This enzyme has been shown to catalyze the first step in (R)-dichlorprop (and other (R)-phenoxypropionic acids) as well as 2,4-D (a phenoxyacetic acid) mineralization (Westendorf *et al.*, 2003). Although the organisms that degrade phenoxypropionic acid were described some time ago, little progress had been made in characterizing this pathway until recently (Horvath *et al.*, 1990). An additional complication to dichlorprop degradation is the stereospecificity (R *vs.* S) involved in both the uptake (Kohler, 1999) and initial oxidation of dichlorprop (Westendorf *et al.*, 2003). Heterologous expression of *rdpA* in other microbes, or transformation of this gene into plants, has not heretofore been reported. Literature has focused primarily around close homologues of *tfdA* that primarily degrade achiral phenoxyacetic acids (*e.g.*, 2,4-D).

[0014] 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.

[0015] Aryloxyalkanoate chemical substructures are a common entity of many commercialized herbicides including the phenoxy auxins (such as 2,4-D and dichlorprop), pyridyloxy 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. Discovery of a multifunctional enzyme for the degradation of herbicides covering multiple modes would be both unique and valuable as an HTC trait.

Brief Summary of the Invention

[0016] The subject invention provides novel plants that are not only resistant to 2,4-D, but also to AOPP 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-, imidazolinone-, 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.

[0017] In some embodiments, the invention provides monocot and dicot plants tolerant to 2,4-D, AOPP, and one or more commercially available herbicides (*e.g.*, glyphosate, imidazolinones, glufosinate, sulfonylureas, dicamba, bromoxynil, 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).

[0018] 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. More specifically, the subject invention relates to the use of an enzyme that is capable of degrading both 2,4-D and AOPP herbicides, in an enantiospecific manner. No α-ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme has previously been reported to have the ability to degrade herbicides of different chemical classes and modes of action. The preferred enzyme and gene for use according to the subject invention are referred to herein as *AAD-1* (AryloxyAlkanoate

Dioxygenase). This highly novel discovery is the basis of significant HTC trait and selectable marker opportunities.

[0019] There was no prior motivation to produce plants comprising an *AAD-1* gene (preferably an *AAD-1* 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-1 enzyme to render the plants resistant to not only phenoxy acid herbicides (such as 2,4-D) but also AOPP herbicides (such as quizalofop, haloxyfop, *et al.*). Thus, the subject invention provides many advantages that were not heretofore thought to be possible in the art.

[0020] 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 aryloxyphenoxypropionate 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, other phenoxyalkanoate auxin herbicides, and aryloxyphenoxypropionate herbicides by a recombinantly expressed AAD-1 enzyme. The subject invention also includes methods of controlling weeds wherein said methods comprise applying one or more AOPP, phenoxy auxin, or other aryloxyalkanoate herbicides to plants comprising an *AAD-1* gene. The subject invention also provides methods of using an *AAD-1* gene as a selectable marker for identifying plant cells and whole plants transformed with *AAD-1*, 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

[0021] Figure 1 shows a general scheme for dioxygenase cleavage of phenoxy auxin or AOPP herbicides.

[0022] Figure 2 shows loss of herbicidal activity from a 2,4-D solution treated with AAD-1.

[0021] Figure 3 shows loss of herbicidal activity from a haloxyfop solution treated with AAD-1.

[0024] Figure 4 shows anticipated phenols produced from representative herbicides catalyzed by AAD-1.

[0025] Figure 5 shows 2,4-dichlorophenol production by recombinant *AAD-1*.

[0026] Figures 6A and 6B show phenol production by recombinant *AAD-1* from various herbicide substrates.

[0027] Figure 7 shows AAD-1 reaction rate to substrate concentration for four herbicide substrates.

[0028] Figures 8A and 8B show that *AAD-1 (v3)* was expressed equally in *Arabidopsis* leaves of different ages but continued to accumulate throughout the 25 days of experiment. Plants that were not sprayed with the herbicide 2,4-D (panel A) expressed a little more AAD-1 (v3) than those had been sprayed (panel B). Bars represent the mean ± SEM of 5 leaves from 5 different plants, with percent expression of AAD-1 (v3) normalized to total soluble protein. Light bars represent the third young leaves (N-3) collected from the top, dark bars represent the 5th oldest leaves from the bottom.

[0029] Figures 9A, 9B, and 9C show injury of *Arabidopsis* plants after 2,4-D treatment. Four different lines were each treated with four different doses of 2,4-D and their injury was graded 4 (panel A) and 14 (panel B) days after treatment. Their expression of AAD-1 (v3) in leaves was also determined using ELISA (panel C). The results were mean ± SEM of five leaves from five different plants received the same treatment.

[0030] Figure 10 illustrates that pDAB3230-transformed *Arabidopsis* (*AAD-1* + *EPSPS*) shows >14-fold level of glyphosate tolerance 7 DAT vs. wildtype and transformed control *Arabidopsis* lines.

[0031] Figure 11 shows dose response of callused maize suspensions to R-haloxyfop.

[0032] Figure 12 shows that at 1 μM cyhalofop phenol, growth is still 76% as high as the control without cyhalofop phenol.

[0033] Figure 13 illustrates dose-response data on one transgenic event, 3404-006, to haloxyfop.

[0034] Figure 14 shows the responses of several *AAD-1 (v3)*-transformed and non-transformed event clones to lethal doses of two AOPP herbicides (haloxyfop and quizalofop) applied as a postemergence spray 1 week prior.

[0035] Figure 15 shows three different T2 lineages from 3404 transformations that were pre-screened with Liberty® to remove nulls, which were chosen to compare their tolerance to

quizalofop with respect to their AAD-1 expression. Expression was measured at 14 DAT (data not shown) and at 30 DAT.

[0036] Figure 16 shows *AAD-1 (v3)*-transformed corn tolerant to 8X field rates of quizalofop (Assure II) under field conditions.

[0037] Figure 17 illustrates data from immature maize embryos grown on cyhalofop-containing media.

[0038] Figure 18 shows Western Blotting analysis on soybean calli transformed with *AAD-1 (V3)* gene indicating that the callus cells are expressing AAD-1 (v3) protein.

[0039] Figure 19 shows fitted curves for 2,4-D degradation rates by AAD-2 (v1) vs. AAD-1 (v1).

[0040] Figure 20 shows the response of *AAD-1 v3* (plant optimized), or *AAD-1 (v2)* (native), *AAD-2 (v1)* (native), or *AAD-2 (v2)* (plant optimized)-transformed T_1 *Arabidopsis* to a range of 2,4-D rates applied postemergence. Each pot represents an individual transformation event within each gene T_1 family.

[0041] Figure 21 shows western blot analysis of individual native *AAD-2 (v1)*-transformed T_1 *Arabidopsis* plants. This shows that plants expressing the AAD-2 (v1) protein are suffering severe injury from 200 g ae (acid equivalent)/ha 2,4-D treatments, which normally causes little injury to native *AAD-1 (v2)* or plant optimized *AAD-1 (v3)*-transformed *Arabidopsis*. AAD-2 protein is identified on the gel. Several background bands were detected in *AAD-2*-transformed and *Pat/Cry1F*-transformed samples.

[0042] Figure 22 shows that the relative AAD-2 (v1) activity on the substrates was 2,4-D = dichlorprop > (R,S)-haloxyfop >> (R)-haloxyfop.

Brief Description of the Sequences

[0043] SEQ ID NO:1 is the sequence of a forward primer used to amplify the *rdpA/AAD-1 (v1)* gene.

[0044] SEQ ID NO:2 is the sequence of a reverse primer used to amplify the *rdpA/AAD-1 (v1)* gene.

[0045] SEQ ID NO:3 is the nucleotide sequence of *AAD-1 (v1)* from *Sphingobium herbicidovorans*.

[0046] SEQ ID NO:4 is the nucleic acid sequence of the native *AAD-1* gene with internal NotI restriction site removed. This gene is designated *AAD-1 (v2)*. DNA sequencing

confirmed that the correct PCR product was generated, but an inadvertent change was made at amino acid #212 from arginine to cysteine.

[0047] SEQ ID NO:5 is a "plant-optimized" DNA sequence *AAD-1 (v3)*. This "gene" encodes SEQ ID NO:11, which is the same as SEQ ID NO:9 except for the addition of an alanine residue at the second position. The additional alanine codon (GCT) was included to encode an Nco I site (CCATGG) spanning the ATG start codon, to enable subsequent cloning operations.

[0048] SEQ ID NO:6 ("rdpA(ncoI)") and SEQ ID NO:7 ("3'sacI") were used to amplify a DNA fragment using the Fail Safe PCR System (Epicenter).

[0049] SEQ ID NO:8 is another PCR primer ("BstEII/Del NotI") that was used with the "3' SacI" primer.

[0050] SEQ ID NO:9 is the native amino acid sequence encoded by the *AAD-1 (v1)* gene from *Sphingobium herbicidovorans*.

[0051] SEQ ID NO:10 is the amino acid sequence encoded by the *AAD-1 (v2)* DNA sequence of SEQ ID NO:4.

[0052] SEQ ID NO:11 is the amino acid sequence encoded by the *AAD-1 (v3)* plant-optimized DNA sequence of SEQ ID NO:5.

[0053] SEQ ID NO:12 is the DNA sequence of the native *AAD-2 (v1)* gene.

[0054] SEQ ID NO:13 is the amino acid sequence of the AAD-2 (v1) protein.

[0055] SEQ ID NO:14 is a forward primer used to amplify *AAD-2 (v1)* DNA for cloning.

[0056] SEQ ID NO:15 is a reverse primer used to amplify *AAD-2 (v1)* DNA for cloning.

[0057] SEQ ID NO:16 is the M13 forward primer.

[0058] SEQ ID NO:17 is the M13 reverse primer.

[0059] SEQ ID NO:18 is a forward primer used to amplify *AAD-2 (v1)* DNA for cloning.

[0060] SEQ ID NO:19 is a reverse primer used to amplify *AAD-2 (v1)* DNA for cloning.

[0061] SEQ ID NO:20 is the native soybean EPSPS protein.

[0062] SEQ ID NO:21 is a doubly mutated soybean EPSPS protein sequence, containing a mutation at residue 183 (threonine of native protein replaced with isoleucine), and at residue 187 (proline in native protein replaced with serine).

[0063] SEQ ID NO:22 is the soybean-biased DNA sequence that encodes the EPSPS protein of SEQ ID NO:21.

[0064] SEQ ID NO:23 is primer Pat 5-3.

[0065] SEQ ID NO:24 is primer Pat 3-3.

[0066] SEQ ID NO:25 is forward primer AAD-1 PTU.

[0067] SEQ ID NO:26 is reverse primer AAD-1 PTU.

[0068] SEQ ID NO:27 is the forward primer for the Coding Region PCR AAD-1.

[0069] SEQ ID NO:28 is the reverse primer for the Coding Region PCR AAD-1.

[0070] SEQ ID NO:29 is the *AAD-2 (v2)* nucleotide (plant optimized).

[0071] SEQ ID NO:30 is the translated AAD-2 (v2) protein sequence.

[0072] SEQ ID NO:31 is the Southern fragment PCR AAD-1 forward primer.

[0073] SEQ ID NO:32 is the Southern fragment PCR AAD-1 reverse primer.

Detailed Description of the Invention

[0074] 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 an herbicide tolerance trait for 2,4-D would be 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-1* gene is that unlike all *tfdA* homologues characterized to date, AAD-1 is able to degrade the R-enantiomers (herbicidally active isomers) of the chiral phenoxy auxins (*e.g.*, dichlorprop and mecoprop) in addition to achiral phenoxy auxins (*e.g.*, 2,4-D, MCPA, 4-chlorophenoxyacetic acid). *See* Table 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-1* gene in plants would afford protection to a much wider spectrum of phenoxy auxin herbicides, thereby increasing the flexibility and spectra of weeds that can be controlled, protecting from drift or other off-site phenoxy herbicide injury for the full breadth of commercially available phenoxy auxins.

[0075] Table 1. Commercially available phenoxy auxins. Reference to phenoxy 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-1 enzyme *in planta* as general plant esterases convert these esters to the active acids *in planta*. Likewise reference can also be for the corresponding organic or inorganic salt of the corresponding acid. When chiral propionic acid, salt, or ester herbicides are indicated, racemic (R,S) or optically purified (R or S) enantiomers are considered the same herbicides for the purpose of naming these herbicides, even though different CAS numbers may correspond to optically pure compounds. Possible use rate ranges can be as stand-alone treatments or in combination with other herbicides in both crop and non-crop uses.

Table 1. Commercially available phenoxy auxins.

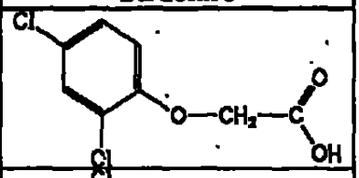
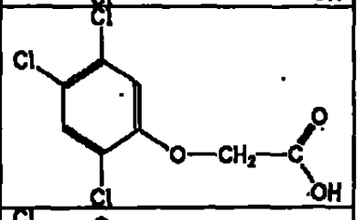
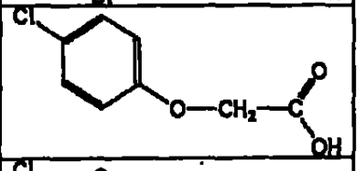
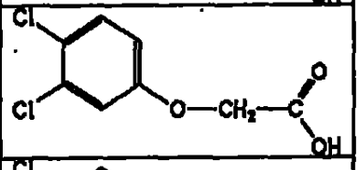
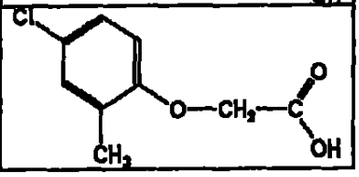
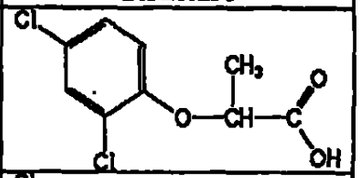
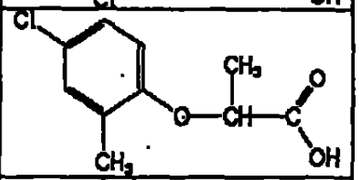
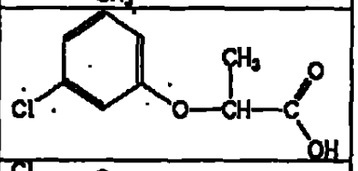
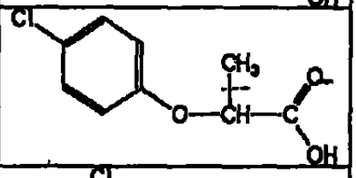
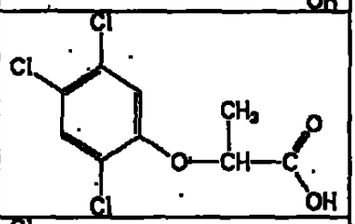
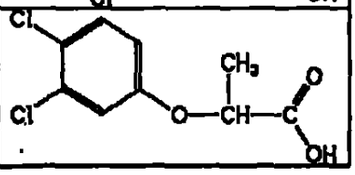
Chemical name	CAS no	Possible use rate ranges (g ae/ha)	Preferred use rate ranges (g ae/ha)	Structure
2,4-D	94-75-7	25 – 4000	280 - 1120	
2,4,5-T	93-76-5	25 – 4000	25 – 4000	
4-CPA	122-88-3	25 – 4000	25 – 4000	
3,4-DA	588-22-7	25 – 4000	25 – 4000	
MCPA	94-74-6	25 – 4000	125 - 1550	

Table 1. Commercially available phenoxy auxins.

Chemical name	CAS no	Possible use rate ranges (g ae/ha)	Preferred use rate ranges (g ae/ha)	Structure
Dichlorprop	120-36-5	25 – 12000	100 - 2240	
Mecoprop	7085-19-0	25 – 4000	250 - 3360	
Cloprop	101-10-0	25 – 4000	25 – 4000	
4-CPP	3307-39-9	25 – 4000	25 – 4000	
Fenoprop	93-72-1	25 – 4000	25 – 4000	
3,4-DP	3307-41-3	25 – 4000	25 – 4000	

[0076] An additional benefit of the *AAD-1* gene is its unprecedented ability to concomitantly degrade a host of commercial and non-commercial graminicidal compounds of the general class aryloxyphenoxypropionates (AOPPs). *See* Table 2. This attribute may allow the use of any of a number of AOPP compounds in transgenic crops containing *AAD-1*, where tolerance in those crops had not previously warranted use in those crops. These will most commonly include grass crops such as corn, rice, wheat, barley, rye, oats, sorghum, warm and cool-

season turf species, grass pasture species, and many others, but could also include dicot crops where AOPP tolerance (naturally present in most dicots) is not at commercially acceptable levels to allow AOPP use in said dicot crop.

[0077] Table 2. AOPP graminicidal compounds listed by accepted common names. Reference to AOPP herbicides is generally made to the active acid but most are commercially formulated as any of a variety of corresponding ester formulations and these are likewise considered as substrates for AAD-1 enzyme *in planta* as general plant esterases convert these esters to the active acids *in planta*. Likewise reference can also be for the corresponding organic or inorganic salt of the corresponding acid. When chiral propionic acid, salt, or ester herbicides are indicated, racemic (R,S) or optically purified (R or S) enantiomers are considered the same herbicides for the purpose of naming these herbicides, even though different CAS numbers may correspond to optically pure compounds. Possible use rate ranges can be as stand-alone treatments or in combination with other herbicides in both crop and non-crop uses.

Table 2. AOPP graminicidal compounds listed by accepted common names.

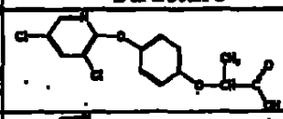
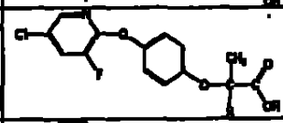
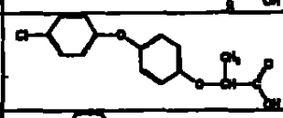
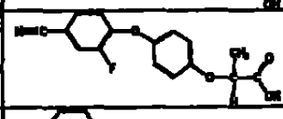
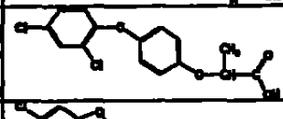
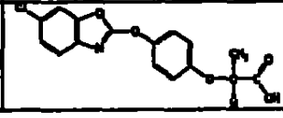
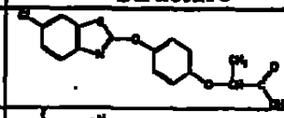
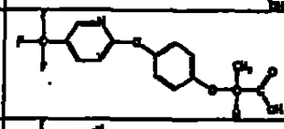
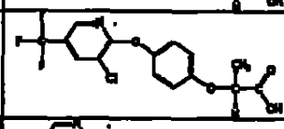
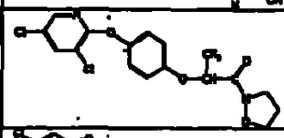
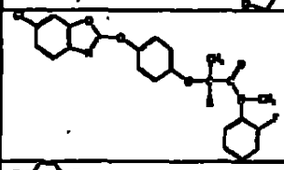
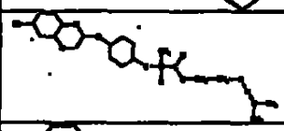
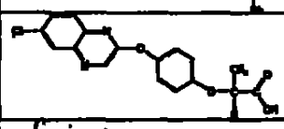
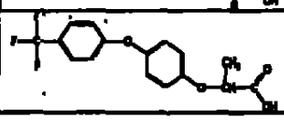
Chemical name	CAS no	Possible use rate ranges (g ae/ha)	Preferred use rate ranges (g ae/ha)	Structure
Chlorazifop	72492-94-7	10-2000	10-2000	
Clodinafop	105512-06-9	10-2000	20-200	
Clofop	59621-49-7	10-2000	10-2000	
Cyhalofop	122008-85-9	10-2000	105-560	
Diclofop	71283-65-3	10-2000	280-2000	
Fenoxaprop	66441-23-4	10-2000	20-200	

Table 2. AOPP graminicidal compounds listed by accepted common names.

Chemical name	CAS no	Possible use rate ranges (g ae/ha)	Preferred use rate ranges (g ae/ha)	Structure
Fenthiaprop	95721-12-3	10-2000	10-2000	
Fluazifop	69335-91-7	10-2000	25-420	
Haloxyfop	69806-40-2	10-2000	20-600	
Isoxapyrifop	87757-18-4	10-2000	30-240	
Metamifop	256412-89-2	10-2000	35-280	
Propaquizafop	111479-05-1	10-2000	30-240	
Quizalofop	76578-14-8	10-2000	20-240	
Trifop	58597-74-4	10-2000	10-2000	

[0078] A single gene (*AAD-1*) 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-1* can provide protection *in planta* to AOPP herbicides where natural tolerance also was not sufficient to allow selectivity. Plants containing *AAD-1* 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 AOPP graminicidal compounds may be applied to plants expressing AAD-1 with reduced risk of injury from said herbicides. The rate for each AOPP may range from 10 to 2000 g ae/ha, and more typically from 20-500 g ae/ha for the control of a broad spectrum of monocot weeds. Combinations of these different chemistry classes and herbicides with different modes of action and spectra in the same field (either sequentially or in tank-mix combination) shall provide control of most potential weeds for which herbicidal control is desired.

[0079] 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-1* with a glyphosate tolerance trait (and/or with other herbicide-tolerance traits) could provide a mechanism to allow for the control of glyphosate resistant weed species (either grass weed species with one or more AOPP herbicides, or broadleaf weed species with one or more phenoxy auxins) in GTCs by enabling the use of glyphosate, phenoxy auxin(s) (*e.g.*, 2,4-D) and AOPP herbicide(s) (*e.g.*, quizalofop) 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 2 hours to 3 months; or, alternatively, any combination of any number of herbicides representing each chemical class can be applied at any timing within 7 months of planting the crop up to harvest of the crop (or the preharvest interval for the individual herbicide, whichever is shortest).

[0080] 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-1* stack could range from 250-2500 g ae/ha; phenoxy auxin herbicide(s) (one or more) could be applied from 25-4000 g ae/ha; and AOPP herbicide(s) (one or more) could be applied from 10-2000 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.

[0081] Herbicide formulations (*e.g.*, ester, acid, or salt formulation; or soluble concentrate, emulsifiable concentrate, or soluble liquid) and tankmix additives (*e.g.*, adjuvants 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.

[0082] 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 species or resistant weed species 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, GOX, GAT*), glufosinate resistance (*e.g.*, *Pat, bar*), acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicide resistance (*e.g.*, imidazolinone, sulfonylurea, triazolopyrimidine sulfonanilide, pyrmidinylthiobenzoates, and other chemistries = *AHAS, Csr1, SurA, et al.*), bromoxynil resistance (*e.g.*, *Bxn*), resistance to inhibitors of HPPD (4-hydroxlphenyl-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.

[0083] Regarding additional herbicides, some additional preferred ALS inhibitors include the triazolopyrimidine sulfonanilides (such as cloransulam-methyl, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, and penoxsulam), pyrimidinylthiobenzoates (such as bispyribac and pyrithiobac), and flucarbazone. Some preferred HPPD inhibitors include mesotrione, isoxaflutole, and sulcotrione. Some preferred PPO inhibitors include flumiclorac, flumioxazin, flufenpyr, pyraflufen, fluthiacet, butafenacil, carfentrazone, sulfentrazone, and the diphenylethers (such as acifluorfen, fomesafen, lactofen, and oxyfluorfen).

[0084] Additionally, *AAD-1* 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.

[0085] 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)X_{23-26}(T/S)$X_{114-183}$HX_{10-13}R" 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.

[0086] 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 AOPP herbicides. No α-ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme has previously been reported to have the ability to degrade herbicides of different chemical classes and modes of action. Preferred enzymes and genes for use according to the subject invention are referred to herein as *AAD-1* (AryloxyAlkanoate Dioxygenase) genes and proteins.

[0087] 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 aryloxyphenoxypropionate herbicides. Thus, the subject invention relates in part to the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, other phenoxyalkanoic auxin herbicides, and aryloxyphenoxyalkanoate herbicides by a recombinantly expressed AAD-1 enzyme.

[0088] The subject proteins tested positive for 2,4-D conversion to 2,4-dichlorophenol ("DCP"; herbicidally inactive) in analytical and biological assays. Partially purified proteins of the subject invention can rapidly convert 2,4-D to DCP (ranging from 50-100% conversion) *in vitro*. An additional advantage that *AAD-1*–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.

[0089] The subject invention also includes methods of controlling weeds wherein said methods comprise applying an AOPP herbicide and/or a phenoxy auxin herbicide to plants comprising an *AAD-1* gene.

[0090] 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 AOPP herbicides. Thus, the subject invention provides many advantages that were not heretofore thought to be possible in the art.

[0091] 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.

[0092] 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 Genbank 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*.

[0093] *RdpA*, from *Sphingobium herbicidovorans* (Westendorf *et al.*, 2002), is one unique example with low homology (28% amino acid identity). This enzyme has been shown to catalyze the first step in (R)-dichlorprop (and other (R)-phenoxypropionic acids) as well as 2,4-D (a phenoxyacetic acid) mineralization (Westendorf *et al.*, 2003). Although the organism responsible for phenoxypropionic acid degradation has been known for some time, little progress has been made in characterizing this pathway until recently (Horvath *et al.*,

1990). An additional complication to dichlorprop degradation is the stereospecificity (R vs. S) involved in both the uptake (Kohler, 1999) and initial oxidation of dichlorprop (Westendorf *et al.*, 2003). Heterologous expression of *rdpA* in other microbes or transformation of this gene into plants, heretofore, was not reported. Literature has focused primarily around close homologues of *tfdA* that primarily degrade achiral phenoxyacetic acids. There was no prior expectation that *rdpA* or *AAD-1* genes could be successfully expressed in plants to render the plants resistant to 2,4-D (not to mention the completely surprising AOPP resistance).

[0094] As described in more detail in the Examples below, *rdpA* was cloned from *Sphingobium herbicidovorans* and tested for substrate promiscuity among various herbicide chemical classes. This α-ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme purified in its native form had previously been shown to degrade 2,4-D and dichlorprop (Westendorf *et al.*, 2002 and 2003). However, no α-ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme has previously been reported to have the ability to degrade herbicides of different chemical classes and modes of action. *RdpA* has never been expressed in plants, nor was there any motivation to do so because development of new HTC technologies has been limited due largely to the efficacy, low cost, and convenience of GTCs (Devine, 2005).

[0095] In light of the novel activity, proteins and genes of the subject invention are referred to herein as AAD-1 proteins and genes. AAD-1 was presently confirmed to degrade a variety of phenoxyacetic and phenoxypropionic auxin herbicides *in vitro*. However, 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 are the aryloxyphenoxypropionate (AOPP) grass herbicides. This highly novel discovery is the basis of significant Herbicide Tolerant Crop (HTC) and selectable marker trait opportunities.

[0096] The broad spectrum grass AOPP herbicides are reported herein to be excellent substrates for AAD-1 as well as 2,4-D, dichlorprop, and other phenoxy auxins. This enzyme is unique in its ability to deliver herbicide degradative activity to a range of broad spectrum broadleaf herbicides (phenoxy auxins) and a range of broad spectrum, highly active grass herbicides (AOPPs).

[0097] Thus, the subject invention relates in part to the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, other phenoxyalkanoic auxin herbicides, and aryloxyphenoxy-

alkanoate herbicides by a recombinantly expressed aryloxyalkanoate dioxygenase enzyme (AAD-1). This invention also relates in part to identification and uses of genes encoding an aryloxyalkanoate dioxygenase degrading enzyme (AAD-1) capable of degrading phenoxy auxin and aryloxyphenoxypropionate herbicides.

[0094] The subject enzyme enables transgenic expression resulting in tolerance to combinations of herbicides that would control nearly all broadleaf and grass weeds. *AAD-1* can serve as an excellent herbicide tolerant crop (HTC) trait to stack with other HTC traits (*e.g.*, glyphosate resistance, glufosinate resistance, imidazolinone resistance, bromoxynil resistance, *et al.*), and insect resistance traits (*Cry1F, Cry1Ab, Cry 34/45, et al.*) for example. Additionally, *AAD-1* 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.

[0099] 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-1*-containing constructs and have demonstrated high levels of resistance to both the phenoxy auxin and AOPP herbicides. Thus, the subject invention also relates to "plant optimized" genes that encode proteins of the subject invention. As shown below in Example 6, the exemplified rebuilt gene was more efficacious in conveying herbicide resistance to the plant, as compared to the bacterial gene.

[00100] 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-1. Thus, the use of the subject genes can also result in herbicide tolerance to those other herbicides as well.

[00101] 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.

[00102] Additionally, glyphosate tolerant crops grown worldwide are prevalent. Many times in rotation with other glyphosate tolerant crops, control of glyphosate-resistant volunteers may be difficult in rotational crops. Thus, the use of the subject transgenic traits, stacked or transformed individually into crops, provides a tool for controlling other HTC volunteer crops.

[00103] 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.

[00104] The transgenic expression of the subject *AAD-1* genes is exemplified in, for example, *Arabidopsis*, corn (maize), tobacco, cotton, rice, soybean, and canola. However, the subject invention can be applied to any other desired types of plants. Soybeans are a preferred crop for transformation according to the subject invention. However, this invention can be applied to multiple other grass and other broadleaf crops. Likewise, 2,4-D can be more positively utilized in grass crops where tolerance to 2,4-D is moderate, and increased tolerance via this trait would provide growers the opportunity to use 2,4-D at more efficacious rates and over a wider application timing without the risk of crop injury.

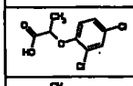
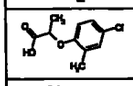
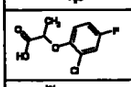
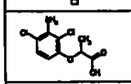
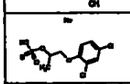
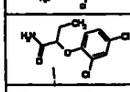
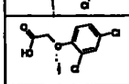
[00105] Still further, the subject invention provides a single gene that can provide resistance to herbicides that control broadleaf weed (auxins) and grass weeds (AOPPs). This gene may be utilized in multiple crops to enable the use of a broad spectrum herbicide combination. The subject invention can also control weeds resistant to current chemicals, and aids in the control of shifting weed spectra resulting from current agronomic practices. The subject AAD-1 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.

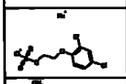
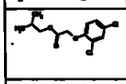
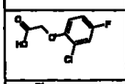
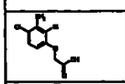
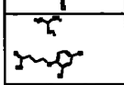
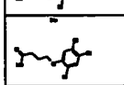
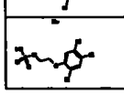
[00106] Separate from, or in addition to, using the subject genes to produce HTCs, the subject genes can also be used as selectable markers for successfully selecting transformants in cell cultures, greenhouses, and in the field. There is high inherent value for the subject genes simply as a selectable marker for biotechnology projects. The promiscuity of AAD-1 for other phenoxyalkanoic auxinic herbicides provides many opportunities to utilize this gene for HTC and/or selectable marker purposes.

[00107] One gene of the subject invention, referred to herein as *AAD-1* (aryloxyalkanoate dioxygenase), was cloned from *Sphingobium herbicidovorans* (ATCC 700291) by PCR into pET 280-S/S (designated pDAB 3203) and expressed in BL-21 Star *E. coli*. When this gene is overexpressed (by induction of 1mM IPTG and culture lysate combined with the following reaction mix: 112.5 µg/ml 2,4-D, 1 mM Ascorbic acid, 1 mM α-ketoglutarate, 50 µM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$, the recombinantly produced enzyme degrades 2,4-D into herbicidally inactive DCP (as determined by HPLC, mass spectrometry, colorimetric assay, and *Arabidopsis* plate assay). Additionally, AAD-1 has been demonstrated to convert the following herbicides into their corresponding inactive phenol: dichlorprop, mecoprop, haloxyfop, dichlofop, and others (See Tables 3 and 4).

[00108] Table 3: Effect of purified AAD-1 (v1) on various herbicidal auxins and auxin analogs. Substrates were assayed at 1 mM in 25 mM MOPS pH 6.8, 200 μM Fe^{2+}, 200 μM Na ascorbate, 1 mM α-ketoglutarate using either 1 μg or 10 μg (10X) purified AAD-1 (v1) per 0.16 ml assay.

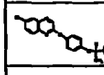
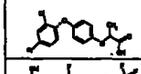
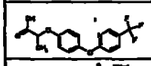
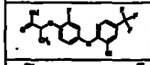
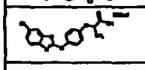
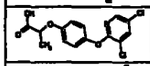
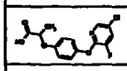
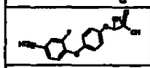
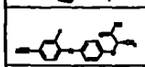
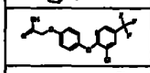
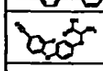
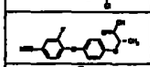
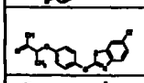
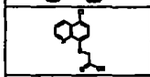
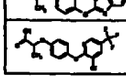
Table 3: Effect of purified AAD-1 (v1) on various herbicidal auxins and auxin analogs

STRUCTURE	Registry ID	Compound	AAD1	AAD1 (10x)
	117613	(R,S)-dichlorprop	0.586	2.594
	188874	(R,S)-mecoprop	0.341	2.085
	83293	(R,S)-2-chloro, 4-fluorophenoxy-proprionate	0.304	2.358
	11113675	(R,S)-3-aminodichlorpop	0.228	2.676
	188476		0.077	0.887
	192132		0.064	0.204
	195517	2,4-D	0.034	0.383

STRUCTURE	Registry ID	Compound	AAD1	AAD1 (10x)
	398166	sesone	0.02	0.177
	190252		0.008	0.211
	124988		0.007	0.058
	11263526		0.004	0.069
	178577		0.003	0.021
	178587		0.003	0.02
	188527		0.003	0.036

[00109] Table 4: Effect of purified AAD-1 (v1) on various AOPP graminicides and analogs, and on cloquintocet. Substrates were assayed at 1 mM in 25 mM MOPS pH 6.8, 200 μM Fe^{2+}, 200 μM Na ascorbate, 1 mM α-ketoglutarate using either 1 μg or 10 μg (10X) purified AAD-1 (v1) per 0.16 ml assay.

Table 4. Effect of purified AAD-1 (v1) on various AOPP graminicides and analogs, and on cloquintocet.

STRUCTURE	Registry ID	Compound	AAD1	AAD1 (10x)	STRUCTURE	Registry ID	Compound	AAD1	AAD1 (10x)
	18706	(R)-quizalofop	0.43	2.1		460511	(R,S)-diclofop	0.155	1.663
	67131	(R,S)-fluazifop	0.427	2.17		25846		0.144	1.69
	11044492	(R)-fenoxaprop	0.408	0.597		70222	(R,S)-chlorazifop	0.128	1.584
	34697	(R,S)-clodinofop	0.295	1.98		199808	cyhalofop	0.114	1.26
	14803	(R)-cyhalofop	0.222	1.969		43865	haloxyfop-oxyacetate	0.004	0.053
	14823	(R,S)-cyhalofop	0.215	1.815		7466	(S)-cyhalofop	0.003	0.017
	62942	(R,S)-fenthiaprop	0.199	1.055		204558	Cloquintocet	0	0.001
	66905	haloxyfop	0.172	1.63					

[0110] 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.

[0111] 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. Optimized polynucleotide can also be designed based on the protein sequence.

[0112] 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.

[0113] 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.

[0114] 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. Other members of the orders Firmicutes and Proteobacteria, and specific genera with known *rdpA*'s, such as *Sphingobium*, *Delftia*, *Rodoferax*, and *Comamonas* for example, can be used as source isolates.

[0115] 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 mutants can be made using ultraviolet light and nitrosoguanidine by procedures well known in the art.

[0116] 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.

[00117] 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.

[00118] Polynucleotides and probes. The subject invention further provides nucleotide 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.

[00119] 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-1* 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.

[00120] . . . 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.

[00121] 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.

[00122] 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.

[00123] 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.*).

[00124] 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.

[00125] 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.

[00126] 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.

[00127] 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 ^{32}P-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 (Tm) 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):

Tm = 81.5° C + 16.6 Log[Na+] + 0.41(%G+C) - 0.61(%formamide) - 600/length of duplex in base pairs.

[00128] 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 Tm-20° C for 15 minutes in 0.2x SSPE, 0.1% SDS (moderate stringency wash).

[00129] For oligonucleotide probes, hybridization can be carried out overnight at 10-20° C below the melting temperature (Tm) of the hybrid in 6x SSPE, 5x Denhardt's solution, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml denatured DNA. Tm for oligonucleotide probes can be determined by the following formula:

Tm (°C) = 2(number T/A base pairs) + 4(number G/C base pairs)

(Suggs *et al.*, 1981).

[00130] 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).

[00131] 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.

[0132] 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.

[0133] 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.

[0134] 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.

[00135] 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 pests 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.

[00136] 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.

[00137] "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.

[00138] 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, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, or 297 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.

[00139] Fragments of full-length genes can be made using commercially available exonucleases or endonucleases according to standard procedures. For example, enzymes such as *Bal*31 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.

[00140] 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.

[00141] 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.

[00142] 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.

[00143] 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.

[00144] 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 5 provides a listing of examples of amino acids belonging to each class.

Table 5

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

[00145] 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.

[00146] 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."

[00147] 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."

[00148] 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.

[00149] 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 and pasture grasses, and the like. Other types of transgenic plants can also be made according to the subject invention, such as fruits, vegetables, and trees. More generally, dicots and/or monocots can be used in various aspects of the subject invention.

[00150] 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.

[00151] 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.

[00152] 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.

[00153] 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.

[00154] Vectors comprising an *AAD-1* 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).

[00155] 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.

[0156] 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.

[0157] 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.

[0158] 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, (*PAT*), glyphosate (*EPSPS*), imazethyapyr (*AHAS*), 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.

[0159] 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. 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.

[0160] 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.

[0161] 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.

[0162] 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.

[0163] 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.

[0164] 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 G418, as well as those genes which encode for resistance or tolerance to glyphosate; hygromycin; methotrexate; phosphinothricin (bialaphos or glufosinate); imidazolinones, sulfonylureas and triazolopyrimidine herbicides, such as chlorsulfuron; bromoxynil, dalapon and the like.

[0165] In addition to a selectable marker, it may be desirous 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.

[0166] 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.

[00167] 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.

[00168] 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.

[00169] 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.

[00170] 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 Resistance to 2,4-D *In Planta*

[00171] 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 (23-32%) 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 we chose only those sequences with ≤ 50% homology. We go on to exemplify that cloning and recombinantly expressing homologues with as little as 27% amino acid conservation 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.

[00172] PCR and cloning of gene into pET. A single gene (*rdpA*) was identified from the NCBI database (*see* the ncbi.nlm.nih.gov website; accession #AF516752) as a homologue with only 28% amino acid identity to *tfdA* from *Ralstonia eutropha*. Percent identity was determined by first translating both the *rdpA* and *tfdA* DNA sequences deposited in the database to proteins, then using ClustalW in the VectorNTI software package to perform the multiple sequence alignment.

[00173] The strain of *Sphingobium herbicidovorans* containing the *rdpA* gene was obtained from ATCC (American Type Culture Collection strain #700291). The lyophilized strain was revived according to ATCC protocol and stored at -80° C in 20% glycerol for internal use as Dow Bacterial strain DB 536. From this freezer stock, a plate of Tryptic Soy Agar was then struck out with a loopful of cells for isolation, and incubated at 28° C for 3 days.

[00174] A single colony was used to inoculate 100 ml of Tryptic Soy Broth in a 500 ml tri-baffled flask, which was incubated overnight at 28° C on a floor shaker at 150 rpm. From this, total DNA was isolated with the gram negative protocol of Qiagen's DNeasy kit (Qiagen cat. #69504). The following primers were designed to amplify the target gene from genomic DNA, Forward: 5' TCT AGA AGG AGA TAT ACC ATG CAT GCT GCA CTG TCC CCC CTC TCC CAG CG 3' [(SEQ ID NO:1) (added Xba I restriction site and Ribosome Binding Site (RBS))] and Reverse: 5' CTC GAG TTA CTA GCG CGC CGG GCG CAC GCC ACC GAC CG 3' [(SEQ ID NO:2)(added extra stop codon and Xho I site)].

[00175] Twenty microliter reactions were set up as follows: MasterMix 8 µl, ea. primer 1 µl (50 pmoles/µl), gDNA 2.5 µl, H_2O 7.5 µl. PCR was then carried out under the following

conditions: 94° C 45 sec, 52° C 1.5 minute, 72° C 1.5 minute, for 30 cycles, followed by a final cycle of 72° C 5 minute, using Eppendorf's Master Taq kit (Eppendorf cat. #0032 002.250). The resulting ~1kb PCR product was cloned into pCR 2.1 (Invitrogen cat. # K4550-40) following the included protocol, with chemically competent TOP10F' *E. coli* as the host strain, for verification of nucleotide sequence.

[00176] Ten of the resulting white colonies were picked into 4 ml Luria Broth + 50 μg/ml Kanamycin (LB K), and grown overnight at 37° C with agitation. Plasmids were purified from each culture using Promega Wizard Plus SV kit (Promega cat. #A1460) and following the included protocol. Sequencing was carried out with Beckman CEQ Quick Start Kit (Beckman Coulter cat. #608120) using M13 Forward (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') (SEQ ID NO:16) and Reverse (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') (SEQ ID NO:17) primers, per manufacturers instructions. This gene sequence (SEQ ID NO:3), and its corresponding protein (SEQ ID NO:9) was given a new general designation for internal consistency *AAD-1 (v1)* (AryloxyAlkanoate Dioxygenase).

[00177] Using the restriction enzymes corresponding to the sites added with the primer linkers (Xba 1, Xho 1) *AAD-1 (v1)* was cut out of the pCR2.1 vector and ligated into a pET 280 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-1 (v1)*:pET 280 and pCR2.1:pET 280 ligations, approximately 20 isolated colonies were picked into 6 ml of LB S/S, and grown at 37° C for 4 hours with agitation.

[00178] Each culture was then spotted onto LB K 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. This expression construct was given the designation pDAB 3203.

Example 2 – Expression and Testing

[00179] 2.1 – HPLC analysis.

[00180] Plasmid pDAB 3203 was maintained frozen at -80° C in TOP10F' cells (Invitrogen) as Dow Recombinant strain DR 1878. For expression, plasmid DNA purified from TOP10F' culture using Promega's Wizard kit (Fisher cat. #PR-A1460) was transformed into BL-21 Star (DE3) cells (Invitrogen cat. #C6010-03) following manufacturer's protocol. After

transformation, 50 µl of the cells were plated onto LB S/S agar plates and incubated overnight at 37° C.

[00181] The next morning, all colonies from the entire plate were scraped into 100 mls LB in a 500 ml tri-baffled flask and incubated at 37° C/200 rpm for 1 hr. Gene expression was then induced with 1 mM IPTG, and incubated for 4 hrs at 30° C/200 rpm. All 100 ml of culture was centrifuged at 4000 rpm for 20 min. The supernatants were then discarded, and the pellets were resuspended in 10 ml of 50 mM MOPS. These were then subjected to three 45-sec rounds of sonication to lyse the cells. Following this, lysates were centrifuged at 15,000 rpm to remove cell debris. The supernatant was pipetted off and stored at 4° C. To check for recombinant expression, a 20 µl aliquot was run on a 4-20% Tris Glycine gel (Invitrogen cat. #EC60255).

[00182] After expression was confirmed, enzyme activity was tested as follows. First, an aliquot of the cell extract was desalted with a PD-10 cartridge (Amersham cat. #17-0435-01). This was then used for subsequent herbicide enzyme reactions.

[00183] For each reaction, the following were combined: 2,4-D (125 µg/ml), [Ascorbate (1 mM), Ferrous ion (50 µM), α-ketoglutarate (1 mM), in 100 mM MOPS], cell extract (100 µl). This reaction was then incubated at room temp for 30 min., after which the reaction was stopped with the addition of 0.1 N HCl until pH was between 2 and 3. Half of the reaction volume (~500 µl) was set aside for bioassay, the remaining volume was organically extracted using Solid Phase Extraction tubes (Fisher cat. #11-131-6), eluting with 400 µl of Acetonitrile + 0.05% TFA.

[00184] The extracts were then tested on HPLC for loss of the 2,4-D peak or presence of any additional peaks resulting from the degradation or modification of 2,4-D. Conditions for the HPLC were: Luna 10µ C18(2) 250 x 4.6mm (Phenomenex cat. #00G-4253-E0), run at 50% ACN + 0.05% TFA: 50% H_2O + 0.05% TFA to 100% ACN + 0.05% TFA over 5 min.

[00185] 2.2 – Plate test bioassays for herbicide degradation.

[00186] Plant bioassays were used to determine if *in vitro* enzymatic herbicide transformation resulted in a concomitant loss in herbicidal activity. Because of the selective nature of the herbicides being tested (*i.e.*, monocot plants controlled by AOPP herbicides and dicot plants controlled by auxinic herbicides), wildtype *Agrostis palustris* var. Pencross and *Arabidopsis thaliana* var. Columbia were used as monocot and dicot test species, respectively. Each species is amenable to germination and growth in small Petri dishes.

[00187] *Arabidopsis* seeds were surface sterilized for 10 min. in 50% commercial bleach/deionized water (v/v) with 1 µL of Tween-20 added as a wetting agent with vigorous agitation (shaker table @ 250 rpm). Bleach solution was decanted inside a sterile hood and rinsed three times with sterile water. Bentgrass seeds were surface sterilized for 20 minutes in a like manner.

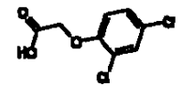
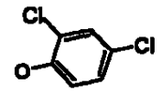
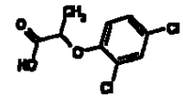
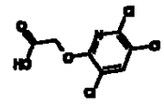
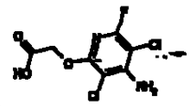
[00188] Twenty to thirty sterilized seeds for each test species used were added onto a sterile, solidified agar Plate Test Medium (PTM) [2.5 mM KNO_3, 2.5 mM KH_2PO_4, 50 mM $FeSO_4$, 10 mM NaEDTA (pH 8.0), 2 mM $MgSO_4$, 2 mM $Ca(NO_3)_2$, 70 µM H_3BO_3, 14 µM $MnCl_2$, 0.5 µM $CuSO_4$, 1 µM $ZnSO_4$, 0.2 µM $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 10 µM NaCl, 10 nM $CoCl_2 \cdot H_2O$, 0.8% (w/v) sucrose, 0.4% agarose (w/v)] for bioassay in 60x15-mm Petri dishes (Falcon 1007). PTM was additionally modified by adding up to six rates of test herbicide standards or herbicide-enzyme test solution dilutions such that the four-fold concentration increments covered a rate range of three orders of magnitude with the GR_{50} rate (50% growth reduction) approximately in the center of the range.

[00189] For herbicide-enzyme test solutions, the maximal concentration was determined based on the nominal concentration before any subsequent enzymatic degradation would occur. Seeds were evenly spread by adding 3 ml of melted PTM of the same composition, swirling, and allowing to solidify. Plates were sealed and maintained under sterile conditions in a low light growth chamber (24 h day^{-1}, 100 $\mu E/m^2s^1$, 23° C) for 7 days. Root length or root+shoot length were measured for five randomly chosen *Arabidopsis* and bentgrass plants, respectively, average mean length (percent of untreated control) vs. nominal herbicide concentration and GR_{50} determined.

[00190] This bioassay was used to confirm the loss of herbicidal activity as a result of AAD-1 (v1) degradation of the oxyalkanoate side chain from various agronomically relevant herbicides. In several instances, the anticipated phenol product co-eluted with the parent acid on HPLC and the bioassay served as the primary screen for herbicide degradation. Tables 6 and 7 represent herbicidal substrates tested.

52

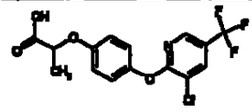
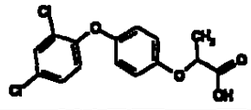
Table 6. *Arabidopsis* plate test bioassay for commercial phenoxy and pyridinyloxyalkanoate auxin substrates.

	GR_{50} (nM)				
Chemical tested	Chemical alone	Chemical + Blank Vector *	Chemical + AAD-1 v1	GR_{50} ratio **	Structure
2,4-D	22	17	267	16	
DCP	>1000	nd	nd	nd	
Dichlorprop	nd	30	1000	33	
Triclopyr	255	1000	1000	1	
Fluroxypyr	2200	2250	1825	<1	

* Blank vector represents of cell lysate treatment where E. coli pET vector had no gene insert.

** GR50 ratio is a measure of the loss of herbicidal activity of enzyme-expressing lysate treatment vs blank vector treatments. A number ≥ 2 is considered the threshold for detecting herbicide activity loss with this assay.

Table 7. Bentgrass plate test bioassay for commercial aryloxyphenoxyalkanoate ACCase-inhibiting substrates.

	GR_{50} (nM)				
Chemical tested	Chemical alone	Chemical + Blank Vector *	Chemical + AAD-1 v1	GR_{50} ratio **	Structure
Haloxyfop-RS	28	21	520	25	
Diclofop-RS	nd	20	130	7	

* Blank vector represents of cell lysate treatment where E. coli pET vector had no gene insert.

** GR50 ratio is a measure of the loss of herbicidal activity of enzyme-expressing lysate treatment vs blank vector treatments. A number ≥ 2 is considered the threshold for detecting herbicide activity loss with this assay.

[00191] 2.3 – HPLC results.

[00192] From the literature, it was known that dioxygenase enzymes in this class require α-ketoglutarate as a co-substrate (for a general scheme, see Figure 1) and ferrous ion to bind in the active site. Other experiments in the literature have shown that the addition of ascorbate increased the enzymatic activity by maintaining the iron in the reduced state, thus preventing the enzyme for being degraded. Based on this previous work, initial assays were set up under the assumption that the subject enzyme would work in the same way as other members of this general class of enzyme.

[00193] Surprisingly, the initial HPLC results showed the presence of a new peak at 6.1 minute, in addition to a reduced 2,4-D peak at 5.5 min. This new peak was not present in the control assay. For an initial identification of the peak at 6.1 minutes, a DCP control was run under our assay conditions and predictably this also eluted at 6.1 minutes. The formation of this product was confirmed using a colorimetric assay to detect phenols (see example 3.1) as well as mass spectrometry. As expected, AAD-1 (v1) carries out a similar reaction as other members of this enzyme class. In the bioassay, these same samples were also shown to have an almost complete loss of 2,4-D herbicidal activity in the *Arabidopsis* plate assay (Figure 2). Regardless of the specific conditions of the assay (*i.e.*, longer incubations, more enzyme), only 50-75% of the 2,4-D could be degraded to DCP as measured by HPLC. In fact, longer induction of the BL-21 *E. coli* cells with IPTG only resulted in less active enzyme, even though more total recombinant protein was expressed.

[00194] After demonstrating degradation of 2,4-D, additional substrates were tested with similar ring substitutions (*i.e.*, oxyacetates and oxypropionates). The first compounds tested were the pyridine analogs fluroxypyr and triclopyr, which are pyridinyloxyacetates. No enzyme activity was detected on either of these as substrates. Additional tests on various analogs of these two pyridinyloxyacetates with either the fluorine or the amino groups removed also were not degraded. Interestingly however, adding a fluorine to the 5 position of 2,4-D resulted in an almost total loss of enzyme degradation (see next section for additional results).

[00195] ACCase inhibitors, haloxyfop and diclofop, were then tested using the same conditions as with 2,4-D. (The corresponding phenol metabolites co-eluted with the parent compound under the HPLC conditions used.) The bioassay results from these samples showed loss of herbicidal activity against both haloxyfop (Figure 3) and diclofop. These

results were also confirmed by the colorimetric assay, which was also used to test a wider sampling of these compounds.

[00196] 2.4 – Plate test bioassays for herbicide degradation.

[00197] Bioassay tests results corroborated initial HPLC results that indicated loss of 2,4-D parent following incubation of 2,4-D solutions with unpurified recombinant AAD-1 (v1) extracts (Figure 2). Additionally, the herbicidal activity of the phenoxypropionic acid, dichlorprop, was also effectively degraded. The ratio of the nominal GR_{50} for herbicide+enzyme solution versus the herbicide solution alone served as measure of loss of parent herbicide activity resulting from enzyme activity. A ratio of 2-3 typically correlated with 50-75% loss of parent herbicide activity (Table 6). Often a GR_{50} could not be determined following enzyme treatment; *de facto*, no detectable herbicide activity remained.

[00198] The AOPP class of herbicides, too, served as excellent substrates for AAD-1 (v1) as shown by near complete degradation of graminicidal activity using the bentgrass plate bioassay (Figure 3 and Table 7). These data are significant in that this is the first reported observation for any members of this class of enzyme to be active on herbicides outside the phenoxy auxins. The implications are that this enzyme is promiscuous enough to utilize chemicals with similar phenoxyalkanoate substructures even though they have completely different modes of action as herbicides.

Example 3 – *In vitro* assay of AAD-1 (v1) activity via colorimetric phenol detection

[00199] 3.1 – AAD-1 (v1) assay.

[00200] AAD-1 (v1) enzyme activity was 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. However, other phenols could potentially be released from different aryloxyalkanoate herbicides such as haloxyfop and cyhalofop (see Figure 4). 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 $NH_4(FeSO_4)_2$, 200 µM sodium ascorbate. The phenols derived from haloxyfop and cyhalofop had equivalent color yields to that of 2,4-dichlorophenol and so were readily

detected. Pyridinols derived from fluroxypyr and triclopyr produced no significant color. The color yield of 2,4-dichlorophenol and the haloxyfop phenol was linear and proportional to the concentration of phenol in the assay up to ~500 µM. A calibration curve performed under standard assay conditions (160 µl final assay volume) indicated that an absorbance at 510 nm of 1.0 was obtained from 172 µM phenol.

[00201] Enzyme assays were performed in a total volume of 0.15 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 were initiated by addition of the aryloxyalkanoate substrate, enzyme or α-ketoglutarate at time zero. After 15 minutes of incubation at 25° C, the reaction was terminated by addition of 10 µl 100 mM sodium EDTA. Color was developed by addition of 15 µl pH 10 buffer (3.09 g boric acid + 3.73 g KCl + 44 ml 1 N KOH), 1.5 µl 2% 4-aminoantipyrine and 1.5 µl 8% potassium ferricyanide. After 10 to 20 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. Later assays were made more convenient by consolidating the additions as follows: the reaction was quenched by addition of 30 µl of a 1:1:1 mix of 50 mM Na EDTA; pH 10 buffer and 0.2 % 4-aminoantipyrine, then adding 10 µl 0.8 % potassium ferricyanide.

[00202] 3.2 – Extraction.

[00203] Activity of recombinant AAD-1 (v1) expressed in *Escherichia coli*. *E. coli* cell pellets were resuspended in 0.1 M Tris, pH 7.4 + 1mg/ml lysozyme (5 ml/cells from 250 ml culture; 20 ml/cells from 1 liter) at room temperature. After about 15 minutes with occasional shaking, the suspension was frozen in liquid nitrogen then thawed. DNase was added to 0.02 mg/ml final concentration and $MgCl_2$ to 1 mM. After the extract was no longer viscous, the extract was centrifuged for 15 min. The supernatant was passed over a BioRad 10DG column pre-equilibrated with 20 mM MOPS pH 6.75 and the eluant stored in aliquots at –70° C. Assays were either performed with these unpurified desalted extracts or with purified enzymes.

[00204] A cell pellet from a 250 ml culture of induced *E. coli* cells expressing pDAB3203 containing the gene encoding *AAD-1 (v1)* was extracted and assayed using the previously described protocols. The 2,4-D cleaving activity in the AAD-1 (v1) extract was compared to that from *E. coli* cells expressing a vector without *AAD-1 (v1)* using 1 mM 2,4-D and is

shown in Figure 5. The amount of 2,4-dichlorophenol formed is clearly proportional to the amount of extract added to the assay whereas the control extract contains no 2,4-D cleaving activity.

[00205] The activity of this extract was tested on four additional herbicides, (R,S)-dichlorprop, (R,S)-mecoprop, (R,S)-haloxyfop and (R,S)-diclofop in comparison to 2,4-D (all at a final concentration of 0.5 mM) using 4 µl of the *E. coli* extract per assay with a 15 min assay period. Figure 6A shows that AAD-1 (v1) cleaved all five herbicides to yield a phenol with the relative activity on the substrates being dichlorprop = mecoprop > diclofop > haloxyfop > 2,4-D. Thus AAD-1 (v1) has activity on graminicidal aryloxyphenoxypropionate herbicides as well as phenoxy auxins.

[00206] The AAD-1 (v1) extract was then tested using racemic (R,S)-haloxyfop, the R enantiomer of haloxyfop and the S-enantiomer of cyhalofop (all at 0.5 mM) as potential substrates to ascertain the likely enantiomeric specificity of AAD-1 (v1). The results are shown in Figure 6B. The activity of the enzyme on (R)-haloxyfop was equivalent to that on (R,S)-haloxyfop whereas no activity could be seen on the S-enantiomer of cyhalofop indicating that AAD-1 (v1) has R specificity on AOPPs.

Example 4 – Substrate Specificity of AAD-1 (v1)

[00207] 4.1 – Additional substrates of AAD-1 (v1).

[00208] The substrate specificity of AAD-1 (v1) toward a variety of commercial and experimental herbicides was tested. Purified AAD-1 (v1) was used at either 1 or 10 µg per 160 µl assay and each substrate was tested at 1 mM with an assay time of 15 minutes. Table 3 shows the A_{510} detected after the action of AAD-1 (v1) on a variety of aryloxyalkanoate auxinic herbicides and auxin analogs. The best substrate tested was dichlorprop, with mecoprop also being efficiently cleaved. Two other phenoxypropionates, the 4-fluoro and 3-amino analogs of dichlorprop, were also acted on effectively by AAD-1 (v1). AAD-1 (v1) produced small amounts of phenol from a variety of phenoxyacetates including 2,4-D. The relative rates on these substrates are better gauged from the assays using the higher amounts (10 µg) of AAD-1 (v1). From these data, 2,4-D is cleaved by AAD-1 (v1), as are two phenoxyalkylsulfonates, X188476 and X398166 (sesone).

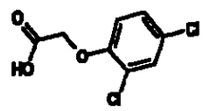
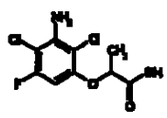
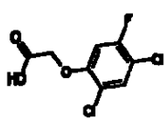
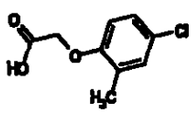
[00209] Table 4 shows data for a variety of AOPP graminicide herbicides as AAD1 substrates, and also the safener cloquintocet. All the commercial AOPP herbicides tested were effectively cleaved by AAD-1 (v1). This is an unexpected discovery and greatly

increases the potential utility of this enzyme for conferring resistance to a wide variety of graminicidal herbicides in transgenic uses, in addition to auxins. AAD-1 (v1) had the highest activity on quizalofop (76% of the dichlorprop rate) and lowest activity on cyhalofop (27% of the quizalofop rate, 21% of the dichlorprop rate). The aryloxyacetate analog of haloxyfop (X043865) was cleaved very slowly with only a small increase in A_{510} using the higher (10 μg) amount of enzyme. This is consistent with higher activity of AAD-1 (v1) seen on phenoxypropionates relative to auxin phenoxyacetates. Minimal activity was detected on (S)-cyhalofop indicating that AAD-1 (v1) has a significant preference for the R enantiomers of aryloxypropionate substrates. Similarly, no activity was noted against the quinolinoxyacetate safener, cloquintocet, which is consistent with the observation that AAD-1 (v1) prefers aryloxypropionate substrates over phenoxy auxins.

[0210] Substrates X11115427, X124987 and MCPA were tested at 1 mM using 27 μg crude recombinant AAD-1 (v1) per assay. All three compounds were substrates for AAD-1 (v1) but with different relative effectiveness (Table 8). X11115427 was slightly better as a substrate than 2,4-D (125% of the 2,4-D rate) in contrast to the close analog 3-amino-dichlorprop, which is ~7- fold better than 2,4-D as a substrate (Table 3). The 5-F substitution appears to decrease the effectiveness of X11115427 as a substrate for AAD-1 (v1). The rates of product formation from 5-F-phenoxyacetate and MCPA were 32% and 55% that of 2,4-D respectively.

[0211] Table 8: Effect of AAD-1 (v1) on three substrates relative to 2,4-D. Substrates were assayed as in Table 6 at 1 mM using a crude recombinant AAD-1 (v1) extract from *E. coli*.

Table 8. Effect of AAD-1 (v1) on three substrates relative to 2,4-D.

Registry ID	MOLSTRUCTURE	Compound	A510	% 2,4-D
195517		2,4-D	0.177	100
11115427		(R,S)-3-amino, 5-F-dichlorprop	0.221	125
124987		5-F, 2,4-D	0.056	32
192711		MCPA	0.097	55

[00212] 4.2—Kinetic characterization.

[00213] The K_m and k_{cat} values of purified AAD-1 (v1) (see Example 10) were determined for four herbicide substrates, (R)-dichlorprop, (R)-haloxyfop, (R)-quizalofop and 2,4-D under standard assay conditions (25 mM MOPS, pH 6.8; 200 μM Na ascorbate; 200 μM Fe^{2+}; 1 mM α-ketoglutarate; 25° C). The dose response curves were fitted using Grafit (Erithacus Software, UK), and the graphs and derived constants are shown in Figure 7 and Table 9 respectively. The K_m values for the four substrates were fairly similar (75 – 125 μM), but the k_{cat} values varied significantly. (R)-dichlorprop had the highest k_{cat} value and 2,4-D the lowest (10% that of (R)-dichlorprop). These k_{cat} values were consistent with the range of values seen in the substrate specificity tests shown in Table 3 and Table 4 as these were performed at high (saturating) substrate concentrations (1 mM).

[00214] Table 9: Kinetic Constants for AAD-1 (v1) Substrates. Kinetic constants were derived from the data in Figure 7 using Grafit fitting to the Michaelis-Menten equation.

Table 9. Kinetic Constants for AAD-1 (v1) Substrates.				
Substrate	K_m (μM) ± SE	V_{max} (μmol min^{-1} mg^{-1} AAD1) ± SE	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1} mM^{-1})
R-dichlorprop	75 ± 10	0.79 ± 0.03	26.1	348
R-quizalofop	125 ± 20	0.57 ± 0.03	18.9	151
R-haloxyfop	120 ± 54	0.34 ± 0.04	11.2	94
2,4-D	96 ± 8	0.57 ± 0.00	2.7	28

[0215] The relative K_m and k_{cat} values for dichlorprop and 2,4-D differ significantly from those published for the R-specific dioxygenase from *Delftia acidovorans* by Westendorf *et al.* (2003) (*Acta Biotechnol.* 23: 3-17). The published k_{cat}/K_m value for 2,4-D is 0.6% that of dichlorprop, whereas in our studies, the k_{cat}/K_m value for 2,4-D is 8% that of dichlorprop. Thus, in this study, AAD-1 (v1) is unexpectedly effective at catalyzing the cleavage of 2,4-D. This increases its potential utility for conferring diverse herbicide tolerance traits in transgenic applications.

[0216] 4.3 – Additional substrates for AAD-1 (v1).

[0217] Three additional substrates were tested at 1 mM using 27 μg crude recombinant AAD-1 (v1) per assay; X11115427, X124987 and MCPA. The results are shown in Table 8. All three compounds were substrates for AAD-1 (v1) but with different relative effectiveness. X11115427 was only slightly better (125%) as a substrate than 2,4-D. This is in contrast to 3-aminodichlorprop which is >7 fold better than 2,4-D as a substrate (Table 3). Thus, the 5-F substitution has significantly decreased the effectiveness of X11115427 as a substrate for AAD-1 (v1). A similar pattern is seen with 5-F-2,4-D which is only 32% as effective as a substrate relative to 2,4-D. In this assay, MCPA was also less effective as a substrate of AAD-1 (v1) (55% relative to 2,4-D).

Example 5 – Optimization of Sequence for Expression in Plants

[0218] 5.1 – Background.

[0219] To obtain high expression of heterologous genes in plants, it may be preferred to reengineer said 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.

[00220] One reason for the reengineering of a bacterial protein 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 (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 higher G+C content; and preferably one 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.

[00221] Table 10 illustrates how high the G+C content is in maize. For the data in Table 10, coding regions of the genes were extracted from GenBank (Release 71) entries, and base compositions were calculated using the MacVector™ program (Accelerys, San Diego, California). Intron sequences were ignored in the calculations.

Table 10: Compilation of G + C contents of protein coding regions of maize genes

Protein Class.sup.a	Range % G + C	Mean % G + C.sup.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)

.sup.a Number of genes in class given in parentheses.
.sup.b Standard deviations given in parentheses.
.sup.c Combined groups mean ignored in mean calculation

[00222] 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 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.

[0223] In engineering genes encoding a bacterial protein for maize (or other plant, such as cotton or soybean) expression, the codon bias of the plant has been determined. The codon bias for maize is the statistical codon distribution that the plant uses for coding its proteins and the preferred codon usage is shown in Table 11. After determining the bias, the percent frequency of the codons in the gene(s) of interest is determined. The primary codons preferred by the plant should be determined, as well as the second, third, and fourth 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 the plant (first preferred, second preferred, third preferred, or fourth preferred) 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 modification. 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 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 GC doublets. In addition to the doublets, G or C sequence blocks that have more than about four residues that are the same can affect transcription of the sequence. Therefore, these blocks are also modified by replacing the codons of first or second choice, *etc.* with the next preferred codon of choice.

Table 11. Preferred amino acid codons for proteins expressed in maize	
Amino Acid	Codon*
Alanine	GCC/GCG
Cysteine	TGC/TGT
Aspartic Acid	GAC/GAT
Glutamic Acid	GAG/GAA
Phenylalanine	TTC/TTT
Glycine	GGC/GGG
Histidine	CAC/CAT
Isoleucine	ATC/ATT
Lysine	AAG/AAA
Leucine	CTG/CTC
Methionine	ATG
Asparagine	AAC/AAT
Proline	CCG/CCA
Glutamine	CAG/CAA
Arginine	AGG/CGC
Serine	AGC/TCC
Threonine	ACC/ACG
Valine	GTG/GTC
Tryptophan	TGG
Tryrosine	TAC/TAT
Stop	TGA/TAG

[00224] It is preferred that the plant optimized gene(s) encoding a bacterial protein contain about 63% of first choice codons, between about 22% to about 37% second choice codons, and between about 15% to about 0% third or fourth choice codons, wherein the total percentage is 100%. Most preferred the plant optimized gene(s) contains about 63% of first choice codons, at least about 22% second choice codons, about 7.5% third choice codons, and about 7.5% fourth choice codons, wherein the total percentage is 100%. The method described above enables one skilled in the art to modify gene(s) that are foreign to a particular plant so that the genes are optimally expressed in plants. The method is further illustrated in PCT application WO 97/13402.

[00225] 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 for the gene sequences for the

particular plant. 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. Thus, synthetic genes that are functionally equivalent to the proteins/genes 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.

[0224] 5.2 – Rebuild analysis.

[0227] Extensive analysis of the 888 base pairs (bp) of the DNA sequence of the native *AAD-1 (v1)* coding region (SEQ ID NO:3) 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. To improve production of the recombinant protein in monocots as well as dicots, a "plant-optimized" DNA sequence (SEQ ID NO:5) was developed that encodes SEQ ID NO:11, which is the same as the native SEQ ID NO:9 except for the addition of an alanine residue at the second position. The additional alanine codon (GCT; underlined in SEQ ID NO:5) was included to encode an Nco I site (CCATGG) spanning the ATG start codon, to enable subsequent cloning operations. The proteins encoded by the native (v1) and plant-optimized (v3) coding regions are 99.3% identical, differing only at amino acid number 2. In contrast, the native (v1) and plant-optimized (v3) DNA sequences of the coding regions are only 77.7% identical. A sequence alignment was made of the native and plant-optimized DNAs, and Table 12 shows the differences in codon compositions of the native and plant-optimized sequences.

Table 12. Codon composition comparison of native *AAD-1 (v1)* coding region and Plant-Optimized version.

Amino Acid	Codon	Native Gene #	Native Gene %	Plant Opt Gene #	Plant Opt Gene %	Amino Acid	Codon	Native Gene #		Plant Opt Gene #	Plant Opt Gene %
ALA (A)	GCA	2	9.1	5	22	LEU (L)	CTA	0	0.0	0	0
	GCC	10	45.5	8	35		CTC	5	22.7	7	32
22	GCG	9	40.9	0	0		CTG	16	72.7	0	0
	GCT	1	4.5	10	43	22	CTT	0	0.0	8	36
ARG (R)	AGA	0	0.0	7	30		TTA	0	0.0	0	0
	AGG	0	0.0	7	30		TTG	1	4.5	7	32
	CGA	0	0.0	0	0	LYS (K)	AAA	1	14.3	2	29
23	CGC	16	69.6	5	22	7	AAG	6	85.7	5	71
	CGG	4	17.4	0	0	MET (M)	ATG	8	100	8	100
	CGT	3	13.0	4	17	PHE (F)	TTC	10	76.9	9	69
ASN (N)	AAC	8	100.0	4	50	13	TTT	3	23.1	4	31
8	AAT	0	0.0	4	50	PRO (P)	CCA	1	5.9	8	47
ASP (D)	GAC	15	78.9	10	53		CCC	9	52.9	1	6
19	GAT	4	21.1	9	47	17	CCG	7	41.2	0	0
CYS (C)	TGC	3	100.0	2	67		CCT	0	0.0	8	47
3	TGT	0	0.0	1	33	SER (S)	AGC	11	73.3	4	27
END	TAA	0	0.0	0	0		AGT	0	0.0	0	0
1	TAG	1	100.0	0	0	15	TCA	0	0.0	4	27
	TGA	0	0.0	1	100		TCC	2	13.3	3	20
GLN (Q)	CAA	0	0.0	7	54		TCG	2	13.3	0	0
13	CAG	13	100.0	6	46		TCT	0	0.0	4	27
GLU (E)	GAA	8	50.0	5	31	THR (T)	ACA	1	4.3	6	26
16	GAG	8	50.0	11	69		ACC	16	69.6	9	39
GLY (G)	GGA	0	0.0	6	29	23	ACG	5	21.7	0	0
	GGC	15	71.4	7	33		ACT	1	4.3	8	35
21	GGG	3	14.3	2	10	TRP (W)	TGG	5	100	5	100
	GGT	3	14.3	6	29	TYR (Y)	TAC	7	70.0	6	60
HIS (H)	CAC	6	60.0	5	50	10	TAT	3	30.0	4	40
10	CAT	4	40.0	5	50	VAL (V)	GTA	2	7.1	0	0
ILE (I)	ATA	0	0.0	3	25		GTC	11	39.3	8	29
12	ATC	12	100.0	5	42	28	GTG	15	53.6	10	36
	ATT	0	0.0	4	33		GTT	0	0.0	10	36
	Totals	148		149			Totals	148		148	

[00228] 5.3 – Completion of binary vectors.

[00229] 5.3.1 – Rebuilt *AAD-1 (v3)*. The plant optimized gene *AAD-1 (v3)* was received from Picoscript (the gene rebuild design was completed (see above) and out-sourced to Picoscript for construction) and sequence verified (SEQ ID NO:5) internally, to confirm that no alterations of the expected sequence were present. The sequencing reactions were carried out with M13 Forward (SEQ ID NO:16) and M13 Reverse (SEQ ID NO:17) primers using the Beckman Coulter "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" reagents as before. Sequence data was analyzed and results indicated that no anomalies were present in the plant optimized *AAD-1 (v3)* DNA sequence. The *AAD-1 (v3)* gene was cloned into pDAB726 as an Nco I – Sac I fragment. The resulting construct was designated pDAB720,

containing: [AtUbi10 promoter: Nt OSM 5'UTR: *AAD-1 (v3)*: Nt OSM3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR] (verified with Not 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, pDAB721, containing the following cassette [AtUbi10 promoter: Nt OSM5'UTR: *AAD-1 (v3)*: Nt OSM 3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR: CsVMV promoter: *PAT*: ORF25/26 3'UTR] was restriction digested (with Bam HI, EcoR I, EcoR V, HinD III, Pac I, and Xmn I) for verification of the correct orientation. The verified completed construct (pDAB721) was used for transformation into *Agrobacterium* (see section 6.2).

[00230] 5.3.2 – Native *AAD1 (v1)* and modified *AAD-1 (v2)*. The *AAD-1 (v1)* gene (SEQ ID NO:3) was PCR amplified from pDAB3203. During the PCR reaction, alterations were made within the primers to introduce the NcoI and SacI restriction sites in the 5' primer and 3' primer, respectively. The primers "rdpA(ncoI)" [CCC ATG GCT GCT GCA CTG TCC CCC CTC TCC] (SEQ ID NO:6) and "3'saci" [GAG CTC ACT AGC GCG CCG GGC GCA CGC CAC CGA] (SEQ ID NO:7) were used to amplify a DNA fragment using the Fail Safe PCR System (Epicenter).

[00231] The PCR amplicon was ligated into the pCR 2.1 TOPO TA cloning vector (Invitrogen) and sequence verified with M13 Forward (SEQ ID NO:16) and M13 Reverse (SEQ ID NO:17) primers using the Beckman Coulter "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" sequencing reagents.

[00232] Sequence data identified a clone with the correct sequence. During analysis a superfluous NotI restriction site was identified toward the 3' end of *AAD-1 (v1)*. This site was removed to facilitate cloning into pDAB3038. To remove the additional site a PCR reaction was performed with an internal 5' primer. The NotI site was altered by incorporating a new codon for an amino acid to remove the spurious NotI site. This change would alter the arginine at position 212 to a cysteine. The PCR primers "BstEII/Del NotI" [TGG TGG TGA CCC ATC CGG GCA GCG GCT GCA AGG GCC] (SEQ ID NO:8) and "3' saci" (SEQ ID NO:7) were used.

[00233] A PCR reaction was completed using the Fail Safe PCR System (Epicenter) and the resulting fragment was cloned into the pCR 2.1 TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Confirmation of the correct PCR product was completed by DNA sequencing, and the "fixed" gene was given the designation *AAD-1 (v2)* (SEQ ID NO:4).

[00234] A sequencing reaction using the M13 Reverse primer (SEQ ID NO:17) and the Beckman Coulter "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" sequencing reagents indicated that the correct PCR fragment had been isolated. This construct was digested with the BstBII and SacI enzymes. The resulting fragment was cloned into the pCR2.1 *AAD-1 (v2)* construct (pCR2.1 Delta NotI) and confirmed via restriction enzyme digestion.

[00235] The modified *AAD-1 (v2)* gene was then cloned into pDAB726 as a NcoI/SacI DNA fragment. The resulting construct (pDAB708) was verified with restriction digests. This construct was then cloned into the binary pDAB3038 as a NotI - NotI fragment. The final resulting construct was given the designation pDAB766, containing the [AtUbi10 promoter: Nt OSM5'UTR: *AAD-1 (v2)*: Nt OSM 3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR: CsVMV promoter: *PAT*: ORF25/26 3'UTR] and was restriction digested for verification of the correct orientation. The completed construct was then used for transformation into *Agrobacterium*.

[00236] 5.3.3 – Design of a soybean-codon-biased DNA sequence encoding a soybean EPSPS having mutations that confer glyphosate tolerance. This example teaches the design of a new DNA sequence that encodes a mutated soybean 5-enolpyruvoylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS), but is optimized for expression in soybean cells. The amino acid sequence of a triply-mutated soybean EPSPS is disclosed as SEQ ID NO:5 of WO 2004/009761. The mutated amino acids in the so-disclosed sequence are at residue 183 (threonine of native protein replaced with isoleucine), residue 186 (arginine in native protein replaced with lysine), and residue 187 (proline in native protein replaced with serine). Thus, one can deduce the amino acid sequence of the native soybean EPSPS protein by replacing the substituted amino acids of SEQ ID NO:5 of WO 2004/009761 with the native amino acids at the appropriate positions. Such native protein sequence is presented herein as SEQ ID NO:20. A doubly mutated soybean EPSPS protein sequence, containing a mutation at residue 183 (threonine of native protein replaced with isoleucine), and at residue 187 (proline in native protein replaced with serine) is presented herein as SEQ ID NO:21.

[00237] A codon usage table for soybean (*Glycine max*) protein coding sequences, calculated from 362,096 codons (approximately 870 coding sequences), was obtained from the "kazusa.or.jp/codon" World Wide Web site. Those data were reformatted as displayed in Table 13. Columns D and H of Table 13 present the distributions (in % of usage for all codons for that amino acid) of synonymous codons for each amino acid, as found in the

protein coding regions of soybean genes. It is evident that some synonymous codons for some amino acids (an amino acid may be specified by 1, 2, 3, 4, or 6 codons) are present relatively rarely in soybean protein coding regions (for example, compare usage of GCG and GCT codons to specify alanine). A biased soybean codon usage table was calculated from the data in Table 13. Codons found in soybean genes less than about 10% of total occurrences for the particular amino acid were ignored. 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 % of C1 =1/(%C1 + %C2 + %C3 + *etc.*) x %C1 x 100

where C1 is the codon in question, C2, C3, *etc.* represent the remaining synonymous codons, and the % values for the relevant codons are taken from columns D and H of Table 13 (ignoring the rare codon values in bold font). The Weighted % value for each codon is given in Columns C and G of Table 13. TGA was arbitrarily chosen as the translation terminator. The biased codon usage frequencies were then entered into a specialized genetic code table for use by the OptGene™ gene design program (Ocimum Biosolutions LLC, Indianapolis, Indiana).

Table 13. Synonymous codon representation in soybean protein coding sequences, and calculation of a biased codon representation set for soybean-optimized synthetic gene design.

A	B	C	D	E	F	G	H
Amino Acid	Codon	Weighted %	Soybean %	Amino Acid	Codon	Weighted %	Soybean %
ALA (A)	GCA	33.1	30.3	LEU (L)	CTA	DNU	9.1
	GCC	24.5	22.5		CTC	22.4	18.1
	GCG	DNU*	8.5		CTG	16.3	13.2
	GCT	42.3	38.7		CTT	31.5	25.5
ARG (R)	AGA	36.0	30.9		TTA	DNU	9.8
	AGG	32.2	27.6		TTG	29.9	24.2
	CGA	DNU	8.2	LYS (K)	AAA	42.5	42.5
	CGC	14.8	12.7		AAG	57.5	57.5
	CGG	DNU	6.0	MET (M)	ATG	100.0	100
	CGT	16.9	14.5	PHE (F)	TTC	49.2	49.2
ASN (N)	AAC	50.0	50.0		TTT	50.8	50.8
	AAT	50.0	50.0	PRO (P)	CCA	39.8	36.5
ASP (D)	GAC	38.1	38.1		CCC	20.9	19.2
	GAT	61.9	61.9		CCG	DNU	8.3
CYS (C)	TGC	50.0	50.0		CCT	39.3	36.0
	TGT	50.0	50.0	SER (S)	AGC	16.0	15.1
END	TAA	DNU	40.7		AGT	18.2	17.1
	TAG	DNU	22.7		TCA	21.9	20.6
	TGA	100.0	36.6		TCC	18.0	16.9
GLN (Q)	CAA	55.5	55.5		TCG	DNU	6.1
	CAG	44.5	44.5		TCT	25.8	24.2
GLU (E)	GAA	50.5	50.5	THR (T)	ACA	32.4	29.7
	GAG	49.5	49.5		ACC	30.2	27.7
GLY (G)	GGA	31.9	31.9		ACG	DNU	8.3
	GGC	19.3	19.3		ACT	37.4	34.3
	GGG	18.4	18.4	TRP (W)	TGG	100.0	100
	GGT	30.4	30.4	TYR (Y)	TAC	48.2	48.2
HIS (H)	CAC	44.8	44.8		TAT	51.8	51.8
	CAT	55.2	55.2	VAL (V)	GTA	11.5	11.5
ILE (I)	ATA	23.4	23.4		GTC	17.8	17.8
	ATC	29.9	29.9		GTG	32.0	32.0
	ATT	46.7	46.7		GTT	38.7	38.7

*DNU = Do Not Use

[0215] To derive a soybean-optimized DNA sequence encoding the doubly mutated EPSPS protein, the protein sequence of SEQ ID NO:21 was reverse-translated by the OptGene™ program using the soybean-biased genetic code derived above. The initial DNA sequence thus derived was then modified by compensating codon changes (while retaining overall

weighted average representation for the codons) to reduce the numbers of CG and TA doublets between adjacent codons, increase the numbers of CT and TG doublets between adjacent codons, remove highly stable intrastrand secondary structures, remove or add restriction enzyme recognition sites, and to remove other sequences that might be detrimental to expression or cloning manipulations of the engineered gene. Further refinements of the sequence were made to eliminate potential plant intron splice sites, long runs of A/T or C/G residues, and other motifs that might interfere with RNA stability, transcription, or translation of the coding region in plant cells. Other changes were made to eliminate long internal Open Reading Frames (frames other than +1). These changes were all made within the constraints of retaining the soybean-biased codon composition as described above, and while preserving the amino acid sequence disclosed as SEQ ID NO:21.

[0239] The soybean-biased DNA sequence that encodes the EPSPS protein of SEQ ID NO:21 is given as bases 1-1575 of SEQ ID NO:22. Synthesis of a DNA fragment comprising SEQ ID NO:22 was performed by a commercial supplier (PicoScript, Houston TX).

[0240] 5.3.4 - Cloning of additional binary constructs. The completion of pDAB3295 and pDAB3757 incorporated the use of the GateWay Cloning Technology (Invitrogen, cat #11791-043 and cat #12535-019). The GateWay Technology uses lambda phage-based site-specific recombination to insert a gene cassette into a vector. For more information refer to *Gateway Technology: A universal technology to clone DNA sequence for functional analysis and expression in multiple systems*, © 1999-2003, Invitrogen Corp., 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA 92008 (printed - 2003). All other constructs created for transformation into appropriate plant species were built using similar procedures as above and other standard molecular cloning methods (Maniatis *et al.*, 1982). Table 14 lists all the transformation constructs used with appropriate promoters and features defined, as well as the crop transformed.

[0241] The *sacB* gene was added to the binary vector pDAB3289 as a bacterial negative selection marker to reduce the persistence of *Agrobacterium* associated with transformed plant tissue. SacB is a levan-sucrase enzyme produced by *Bacillus* spp. and is toxic to most Gram negative bacteria when grown in the presence of sucrose (Gay *et al.*, 1983). The *sacB* gene was recovered on a *Hin*d III fragment from plasmid pRB112 (Edwards, *et al.*, 1998) and cloned into the unique *Hin*d III site in pDAB3289.

Table 14. Binary constructs used in transformation of various plant species.

pDAB #	pDAS #	Species * Trans-formed into	Gene of Interest (GOI)	Promoter	Feature 1	Feature 2	GOI 2	Promoter	Bacterial Selection gene	Bacterial Selection gene 2	Plant Selection gene	Promoter	Trxn Method
721		A, T, Ct, S, Ca	AAD1 v3	AtUbi10	NtOsm	-	-	-	Erythromycin	-	pat	CsVMV	Agro binary
3230		A	EPSPS	AtUbi10	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	AAD1 v3	CsVMV	Agro binary
3289		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Spectinomycin	sacB	HptII	AtUbi3	Agro binary
3291		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Spectinomycin	-	HptII	AtUbi3	Agro binary
3295		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	pat	AtUbi10	Aerosol beam
3297	1270	A, T	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	pat	AtUbi10	Agro binary
3403		Cn, R	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicillin	-	Same as GOI		Whiskers / Gun
3404		Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicillin	-	pat	OsAct1	Whiskers
3415	1283	Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicillin	-	AHAS v3	OsAct1	Whiskers
3602	1421	Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	AHAS v3	OsAct1	Agro Superbinary
3757		Ca	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Spectinomycin	-	pat	AtUbi11	Agro binary
3705		A	AAD2 v2	AtUbi10	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Erythromycin	-	pat	CsVMV	Agro binary

*A = *Arabidopsis*
T = Tobacco
S = Soybean
Ct = Cotton
R = Rice
Cn = Corn
Ca = Canola

CsVMV = Cassava Vein Mosaic Virus Promoter
AtUbi10 = *Arabidopsis thaliana* Ubiquitin 10 Promoter
RB7 Mar v2 = *Nicotiana tabacum* matrix associated region (MAR)
Nt Osm = *Nicotiana tabacum* Osmotin 5' Untranslated Region and the *Nicotiana tabacum* Osmotin 3' Untranslated Region

ZmUbi1 = *Zea mays* Ubiquitin 1 Promoter
HptII = hygromycin phosphotransferase

(721 and 793) Atu ORF1 3' UTR = *Agrobacterium tumefaciens* Open Reading Frame 1 3' Untranslated Region
(3295 and 3757) Atu ORF24 3' UTR = *Agrobacterium tumefaciens* Open Reading Frame 24 3' Untranslated Region

Example 6 – Transformation into *Arabidopsis* and Selection

[00242] 6.1 – *Arabidopsis thaliana* growth conditions.

[00243] 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).

[00244] 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.

[00245] 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 μmol/m^{2}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.

[00246] An LB + agar plate with erythromycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (200mg/L) or spectinomycin (100 mg/L) containing a streaked DH5α 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.

[00247] 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.

[00248] 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.

[00249] 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.

[00250] 6.3 – *Arabidopsis* transformation.

[00251] *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.

[0252] 6.4 – Selection of transformed plants.

[0253] Freshly harvested T_1 seed (transformed with native [*AAD-1 (v2)*] or plant optimized [*AAD-1 (v3)*] gene) was allowed to dry for 7 days at room temperature. T_1 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 T_1 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.

[0254] 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).

[0255] Five to six days after planting (DAP) and again 10 DAP, T_1 plants (cotyledon and 2-4-lf 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 5-7 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. Domes were subsequently removed and plants moved to the greenhouse (22±5° C, 50±30% RH, 14 h light:10 dark, minimum 500 $\mu E/m^2s^1$ natural + supplemental light) at least 1 day prior to testing for the ability of *AAD-1 (v3)* (plant optimized gene) or *AAD-1 (v2)* (native microbial gene) to provide phenoxy auxin herbicide resistance.

[00256] Random individual T_1 plants selected for glufosinate resistance above were confirmed for expression of the PAT protein using a PAT ELISA kit (Part no. 7000045, Strategic Diagnostics, Inc., Newark, DE) to non-destructively confirm fidelity of selection process (manufacturer's protocol). Plants were then randomly assigned to various rates of phenoxy herbicides (dichlorprop or 2,4-D). Phenoxy rates initially applied were 12.5 g ae/ha 2,4-D and 50 or 200 g ae/ha dichlorprop. GR_{99} for *Arabidopsis* is about 50 g ae/ha 2,4-D and 200 g ae/ha dichlorprop. Elevated rates were applied in subsequent trials (50, 200, 800, or 3200g ae/ha).

[00257] 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 technical grade (Sigma, St. Louis, MO) dissolved in DMSO and diluted in water (<1% DMSO final concentration). 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. It became standard practice to apply these high rates of phenoxy herbicides in 200 mM Tris buffer (pH 9.0) to a final pH of ~7-8.

[00258] Some T_1 individuals were subjected to alternative commercial herbicides instead of a phenoxy auxin. One point of interest was determining whether haloxyfop could be effectively degraded *in planta*.

[00259] Although *Arabidopsis*, being a dicot, is not an optimal system for testing ACCase-inhibiting AOPP grass herbicides, *AAD-1 (v3)*-transformed T_1 plants were subjected to elevated rates (400-1600 g ae/ha) of RS-haloxyfop acid (internally synthesized) that do cause growth abnormalities and death of wildtype *Arabidopsis* using the DeVilbiss sprayer as described above Injury ratings were taken 7 and 14 days after treatment. Likewise, T_1 individuals were treated with the pyridyloxyacetate auxin herbicide, fluroxypyr.

[00260] 6.5 – Results of selection of transformed plants.

[00261] The first *Arabidopsis* transformations were conducted using *AAD-1 (v3)* (plant optimized gene). T_1 transformants were first selected from the background of untransformed seed using a glufosinate selection scheme. Over 400,000 T_1 seed were screened and 493

glufosinate resistant plants were identified (PAT gene), equating to a transformation/selection frequency of 0.12%. Depending on the lot of seed tested, this ranged from 0.05-0.23% (*see* Table 15). A small lot of *AAD-1 (v2)* (native)-transformed seed were also selected using the glufosinate selection agent. Two hundred seventy eight glufosinate-resistant T_1 individuals were identified out of 84,000 seed screened (0.33% transformation/selection frequency).

Table 15: Selection of AAD-1 (v3) (plant optimized), or AAD-1 (v2) (native), AAD-2 (v1) (native), or plant optimized AAD-2 (v2)-transformed T_1 individual plants using glufosinate and 2,4-D.

Selection agent	Gene	Codon bias	Total seed sown and screened	Number of resistant T_1	Selection rate	Selection rate range	% of selected plants expressing PAT[3]
Glufosinate[1]	*AAD-1 (v2)*	n	84,000	278	0.33%	0.33%	nd[4]
Glufosinate[1]	*AAD-1 (v3)*	p	400,500	493	0.12%	0.05 to 0.23%	97%
2,4-D[2]	*AAD-1(v3)*	p	70,000	53	0.08%	0.07 to 0.08%	96%
Glufosinate[1]	*AAD-2 (v1)*	n	1,301,500	228	0.018%	0.007 to 0.021%	100%
Glufosinate[1]	*AAD-2(v2)*	p	200,000	224	0.11%	0.11%	nd[4]

[1]Glufosinate selection scheme: 280g ai/ha glufosinate applied 5-6 + 10 DAP
[2]2,4-D selection scheme: 50 g ai/ha 2,4-D applied 5-7 + 10-14 DAP
[3]PAT protein expression determined by PAT HLISA strips
[4]nd, not determined
[5]codon bias, n-native microbial gene, p=plant optimized

[0224] T_1 plants selected above were subsequently transplanted to individual pots and sprayed with various rates of commercial aryloxyalkanoate herbicides. Table 16 compares the response of native *AAD-1 (v2)* and plant optimized *AAD-1 (v3)* genes to impart 2,4-D resistance to *Arabidopsis* T_1 transformants. Both genes imparted resistance to individual T_1 *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 16 simply to demonstrate the significant difference between the plants transformed with *AAD-1 (v2)* or *AAD-1 (v3)* versus the wildtype or *PAT/Cry1F* transformed controls. Also evident is that tolerance appears to be significantly greater (frequency and overall level of individual response) for the plant optimized sequence *AAD-1 (v3)* versus the native sequence *AAD-1 (v2)* (see Table 16). Higher rates of 2,4-D (up to 3,200 g ae/ha) have been applied to additional T_1 individuals expressing AAD-1 (v3). Injury levels tend to be greater and the frequency of highly resistant plants is lower at these elevated rates (6x field rates). Also at these high rates, the spray solution becomes highly acidic unless buffered. *Arabidopsis* grown mostly in the growth chamber has a very thin cuticle and severe burning effects can complicate testing at these elevated rates. Nonetheless, some individuals have survived 3,200 g ae/ha 2,4-D with little or no injury.

[0225] Table 16. *AAD-1 v3* (plant optimized), or *AAD-1 v2* (native), or *AAD-2* (native)-transformed T_1 *Arabidopsis* response to a range of 2,4-D rates applied postemergence. 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%). Since each T_1 is an independent transformation event, one can expect significant variation of individual T_1 responses within a given rate. 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/Cry1F*-transformed *Arabidopsis* served as an auxin-sensitive transformed control. Wildtype *Arabidopsis* is untransformed.

Table 16. *AAD-1 v3* (plant optimized), or *AAD-1 v2* (native), or *AAD-2* (native)-transformed T_1 *Arabidopsis* response to a range of 2,4-D rates applied postemergence.

Native AAD-1 (v2) gene Averages	% Injury <20%	% Injury 20-40%	% Injury >40%	% Injury Ave	Std Dev
Untreated control-buffer	20	6	7	25.3	34.7
50 g ae/ha 2,4-D	55	16	9	14.8	22.7
200 g ae/ha 2,4-D	45	11	24	34.1	39.3
800 g ae/ha 2,4-D	11	32	37	52.5	34.2

Native AAD-2 gene Averages	% Injury <20%	% Injury 20-40%	% Injury >40%	% Injury Ave	Std Dev
Untreated control-buffer	4	1	1	25.0	21.7
50 g ae/ha 2,4-D	1	2	11	68.2	30.2
200 g ae/ha 2,4-D	0	3	11	82.7	28.8
800 g ae/ha 2,4-D	0	0	14	99.8	0.8

Rebuilt AAD-1 (v3) gene Averages	% Injury <20%	% Injury 20-40%	% Injury >40%	% Injury Ave	Std Dev
Untreated control-buffer	9	0	0	0.0	0.0
50 g ae/ha 2,4-D	10	1	5	24.3	35.9
200 g ae/ha 2,4-D	11	4	1	14.0	25.9
800 g ae/ha 2,4-D	11	4	1	14.7	26.1

Wildtype Averages	% Injury <20%	% Injury 20-40%	% Injury >40%	% Injury Ave	Std Dev
Untreated control-buffer	11	0	0	0.0	0.0
50 g ae/ha 2,4-D	0	0	15	90.0	0.0
200 g ae/ha 2,4-D	0	0	15	95.1	0.5
800 g ae/ha 2,4-D	0	0	15	100.0	0.0

PAT/Cry1F (transformed control) Averages	% Injury <20%	% Injury 20-40%	% Injury >40%	% Injury Ave	Std Dev
Untreated control-buffer	11	0	0	0.0	0.0
50 g ae/ha 2,4-D	0	0	15	90.7	4.2
200 g ae/ha 2,4-D	0	0	15	97.2	1.7
800 g ae/ha 2,4-D	0	0	15	100.0	0.0

[0236] Table 17 shows a similar dose response of T_1 *Arabidopsis* to the phenoxypropionic acid, dichlorprop. Similar trends were seen as with 2,4-D, indicating the chiral propionic side chain indeed serves as an acceptable substrate. Next, it was determined that a degree of increased haloxyfop tolerance could be imparted to transformed *Arabidopsis* at elevated rates of 400 – 1,600 g ae/ha (Table 18). Normal field use rate for haloxyfop (a grass-specific

herbicide) is around 50-70 g ae/ha. Dicots are generally considered naturally tolerant to AOPP herbicides; however, severe physiological effects do occur in *Arabidopsis* at these elevated rates. Some *AAD1 (v3)* transformed individuals did exhibit increased tolerance to haloxyfop. This provides the first *in planta* data that *AAD-1 (v3)* will provide AOPP resistance. No resistance was observed with fluroxypyr (a pyridyloxyacetate auxin) in transformed *Arabidopsis*, consistent with *in vitro* work using heterologously expressed enzyme.

[00265] Table 17. T_1 *Arabidopsis* response to a range of dichlroprop rates applied postemergence. 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%). Since each T_1 is an independent transformation event, one can expect significant variation of individual T_1 responses within a given rate. 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/Cry1F*-transformed *Arabidopsis* served as an auxin-sensitive transformed control. Wildtype *Arabidopsis* is untransformed.

Table 17. T_1 *Arabidopsis* response to a range of dichlroprop rates applied postemergence.

AAD-1 v3	% Injury			% Injury		
Averages	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std Dev	Range
Untreated control	3	0	0	0.0	0.0	0
12.5 g ae/ha RS-dichlorprop	7	1	0	5.0	7.6	0-20
50 g ae/ha RS-dichlorprop	7	1	0	3.1	8.8	0-25
200 g ae/ha RS-dichlorprop	4	1	3	40.0	50.1	0-100
800 g ae/ha RS-dichlorprop	0	5	3	51.9	40.0	20-100
PAT/Cry1F	**% Injury**			**% Injury**		
Averages	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std Dev	Range
Untreated control	3	0	0	0.0	0.0	0
12.5 g ae/ha RS-dichlorprop	0	6	2	38.1	25.3	20-95
50 g ae/ha RS-dichlorprop	0	0	8	80.0	25.3	50-100
200 g ae/ha RS-dichlorprop	0	0	8	98.3	2.2	95-100
800 g ae/ha RS-dichlorprop	0	0	8	100.0	0.0	100
Wildtype	**% Injury**			**% Injury**		
Averages	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std Dev	Range
Untreated control	3	0	0	0.0	0.0	0
12.5 g ae/ha RS-dichlorprop	3	0	0	13.3	2.9	10-15
50 g ae/ha RS-dichlorprop	0	0	3	53.3	5.8	50-60
200 g ae/ha RS-dichlorprop	0	0	3	95.0	5.0	90-100
800 g ae/ha RS-dichlorprop	0	0	3	100.0	0.0	100

[00266] Table 18. T1 *Arabidopsis* response to a range of haloxyfop rates applied postemergence at artificially high rates attempting to show tolerance of the dicot *Arabidopsis* to the graminicide. 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%). Since each T1 is an independent transformation event, one can expect significant variation of individual T1 responses within a given rate. 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/Cry1F*-transformed *Arabidopsis* served as an auxin-sensitive transformed control. Wildtype *Arabidopsis* is untransformed.

Table 18. T1 *Arabidopsis* response to a range of haloxyfop rates applied postemergence at artificially high rates attempting to show tolerance of the dicot *Arabidopsis* to the graminicide.

AAD-1 v3	% Injury			% Injury		
Averages	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std Dev	Range
Untreated control	3	0	0	0.0	0.0	0
100 g ae/ha haloxyfop	4	0	0	0.0	0.0	0
200 g ae/ha haloxyfop	4	0	0	0.0	0.0	0
400 g ae/ha haloxyfop	3	1	0	6.3	9.5	0-20
800 g ae/ha haloxyfop	1	1	2	46.3	42.7	0-85
1600 g ae/ha haloxyfop	1	0	3	65.0	47.3	0-100
PAT/Cry1F	% Injury			% Injury		
Averages	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std Dev	Range
Untreated control	3	0	0	0.0	0.0	0
100 g ae/ha haloxyfop	4	0	0	0.0	0.0	0
200 g ae/ha haloxyfop	4	0	0	10.0	0.0	10
400 g ae/ha haloxyfop	0	4	0	27.5	5.0	20-30
800 g ae/ha haloxyfop	0	0	4	78.8	6.3	70-85
1600 g ae/ha haloxyfop	0	0	4	47.5	43.5	80-100
Wildtype	% Injury			% Injury		
Averages	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std Dev	Range
Untreated control	3	0	0	0.0	0.0	0
100 g ae/ha haloxyfop	3	0	0	0.0	0.0	0
200 g ae/ha haloxyfop	3	0	0	0.0	0.0	0
400 g ae/ha haloxyfop	0	3	0	20.0	0.0	20
800 g ae/ha haloxyfop	0	0	3	73.3	10.4	70-85
1600 g ae/ha haloxyfop	0	0	3	93.3	11.5	80-100

[00267] 6.6 – *AAD-1 (v3)* as a selectable marker.

[00268] The ability to use *AAD-1 (v3)* as a selectable marker using 2,4-D as the selection agent was analyzed initially with *Arabidopsis* transformed with as described above. T_1 seed

transformed with *PAT* and *AAD1 (v3)* (pDAB 721) were sown into flats and germinated as described above and compared to similar seed treated with the normal glufosinate selection scheme (5 and 10 DAP). 2,4-D (50g ae/ha) was applied to seedling *Arabidopsis* as previously done with glufosinate. Variation in number of applications and timing of application were tested. Each tray of plants received either one or two application timings of 2,4-D in one of the following treatment schemes: 5+10 DAP, 5+14 DAP, 10 DAP, 10+14 DAP, 14 DAP. Plants were identified as Resistant or Sensitive 19 DAP and ELISA test strips run to determine frequency of successfully co-transforming an active *PAT* gene.

[00269] Fifty-three out of 70,000 seed planted were identified as resistant to 2,4-D. ELISA was used to screen a subset of 44-individuals from this population for PAT protein expression. Ninety six percent of the individuals were positive indicating the presence of the co-transformed gene, *PAT*. The low number of negative ELISA results (4%) is in line with a 3% error rate in populations of glufosinate-resistant plants (Table 15). The efficiency of selection appears to be somewhat less with 2,4-D (0.08%) vs. glufosinate (0.12%); however, the range of selection rates across all experiments would indicate both selection agents are equally good for selecting *Arabidopsis* transformed with *AAD-1 (v3)* or *PAT* genes, respectively. Two successive applications most accurately identify resistant individuals with both herbicides tested.

[00270] 6.7 – Heritability.

[00271] A variety of T_1 events were self-pollinated to produce T_2 seed. These seed were progeny tested by applying 2,4-D (200 g ae/ha) to 100 random T_2 siblings. Each individual T_2 plant was transplanted to 7.5-cm square pots prior to spray application (track sprayer at 187 L/ha applications rate). More than 60% of the T_1 families (T_2 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 ($P > 0.05$).

[00272] Seed were collected from 12 to 20 T_2 individuals (T_3 seed). Twenty-five T_3 siblings from each of eight randomly-selected T_2 families were progeny tested as previously described. Approximately one-third of the T_2 families anticipated to be homozygous (non-segregating populations) have been identified in each line tested: ranging in frequency from one to four out of the eight families tested. These data show *AAD1 (v3)* is stably integrated and inherited in a Mendelian fashion to at least three generations.

[00273] 6.8 –Additional herbicide resistance attributable to AAD-1 in *Arabidopsis*.

[00274] The ability of *AAD-1 (v3)* to provide resistance to other aryloxyphenoxyalkanoate herbicides in transgenic *Arabidopsis* was determined using a modified *in vitro* plate assay. Seeds from wild-type *Arabidopsis thaliana* as well as *Arabidopsis thaliana* containing the plant optimized AAD-1 (v3) gene (T_4 homozygous plants id = PAAD1.315.064) were sterilized by agitating for 10 min in a 50% bleach solution. These seeds were then rinsed four times with sterile water to remove the bleach.

[00275] Dose response assays utilized a nutrient media (see below) supplemented with various rates of test compounds. The test compounds were added to the heated media (55° C) as concentrated solutions in DMSO. Control wells had the appropriate amount of DMSO without any additional compound. The final concentration of DMSO never exceeded 1% (v/v). After thorough mixing, a 6 mL aliquot of the warm media containing the appropriate concentration of compound was added to each well of a 6-well, flat bottom, polystyrene tissue culture tray (Falcon 353046, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, NJ). After the media solidified, approximately 20 to 30 *Arabidopsis* seeds were applied on top of the solidified media and the remaining 2 mL of media was poured over the seeds. The plates were lightly agitated to disperse the seeds, covered and allowed to cool until the media had completely solidified. The plates were incubated for 7 days at 25°C under continual fluorescent lighting (75 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$). Nutrient Media Composition was as described in Example 2.2 and in Somerville and Orgen (1982).

[00276] Assessment of growth reduction. The apical portion of the *Arabidopsis* plants grown in the treated media was assessed visually relative to the apical portion of the plants grown in the media containing only DMSO. Values were recorded as % growth reduction. Assessments of root growth inhibition of the *Arabidopsis* plants grown in the treated media were achieved by carefully extracting the plants from the media and measuring the length of the root. These root lengths were then compared to the root length of the control plants to determine a % growth reduction. A minimum of five plants were assessed for each treatment. The values recorded are an average of all the plants assessed. The calculated concentration to reach 50% inhibition effect (I_{50}) were determined for both root and shoots of wildtype and AAD-1-transformed *Arabidopsis*. The ratios of resistant to sensitive biotypes are included in Table 19. A ratio >2 for both root and shoot measurements generally signifies significant resistance. The higher the ratio, the greater the level of resistance. All

commercial phenoxy auxins showed significant levels of resistance including oxyacetic acids (2,4-D and MCPA) as well as oxypropionic acids (dichlorprop and mecoprop). In fact, the chronic root assessment shows resistance to the oxypropionic acid is higher with AAD-1 (v3) than for the oxyacetic acids, consistent with enzymatic characteristics of AAD-1 (v1). Assessment of other auxins containing pyridine rings showed AAD-1 (v3) did not effectively protect *Arabidopsis* form pyridyloxyacetates herbicides, triclopyr and fluroxypyr, or the picolinic acid herbicide, picloram. The broad phenoxy auxin resistance is the first reported *in planta*. The alternative auxins to which AAD-1 does not protect would be viable tools for the control and containment of *AAD-1*-transformed commercial crops or experimental plant species.

Table 19. *In vitro* plate test assessment of herbicide substrate cross resistance afforded by AAD-1 (v3) in homozygous T_4 *Arabidopsis* (ARBTH).

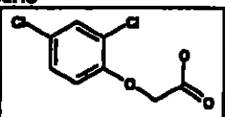
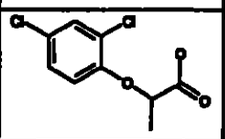
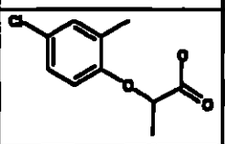
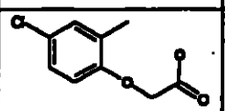
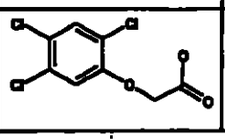
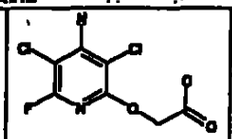
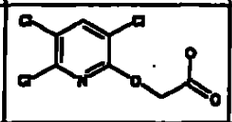
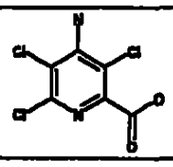
Compound	Structure	wt ARBTH shoot I50	PAAD1.315.064 T3 ARBTH shoot I50	wt ARBTH root I50	PAAD1.315.064 ARBTH root I50	--- shoot ratio	--- root ratio
		ppm					
Phenoxy auxins							
2,4-D		0.2	10	< 0.01	0.04	50	> 4
dichlorprop		2	5	0.01	1.5	2.5	150
Mecoprop		2	25	0.01	1.5	12.5	150
MCPA		0.2	1	0.01	0.03	5	3
2,4,5-T		1.5	10	<0.01	<0.01	6.67	NA

Table 19. *In vitro* plate test assessment of herbicide substrate cross resistance afforded by AAD-1 (v3) in homozygous T_4 *Arabidopsis* (ARBTH).

Compound	Structure	wt ARBTH shoot I50	PAAD1.315.064 T3 ARBTH shoot I50	wt ARBTH root I50	PAAD1.315.064 ARBTH root I50	shoot ratio	root ratio
		ppm					
Pyridine auxins							
Fluroxypyr		2	1	0.2	0.2	0.5	1
Triclopyr		0.2	0.04	0.02	0.02	0.2	1
Picloram		1	0.5	0.3	0.15	0.5	0.5

[00277] 6.9 – Foliar applications herbicide resistance in AAD-1 *Arabidopsis* .

[00278] The ability of *AAD-1 (v3)* to provide resistance to other aryloxyphenoxyalkanoate auxin herbicides in transgenic *Arabidopsis* was determined by foliar application of various substrates described in Example 6.8. T_4 generation *Arabidopsis* seed, homozygous for *AAD-1 (v3)* (line AAD1.01.315.076) 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 from a range of phenoxy auxin herbicides: 12.5-1600 g ae/ha 2,4-D dimethylamine salt (DMA) (Riverside Chemicals), 12.5-1600 g ae/ha mecoprop (AH Marks), 50-3200 g ae/ha R-dichlorprop (AH Marks), 8.75-1120 g ae/ha 2,4,5-T (technical grade); pyridyloxyacetates herbicides 50-3200 g ae/ha triclopyr (Dow AgroSciences) and 50-3200 g ae/ha fluroxypyr (Dow AgroSciences); and the 2,4-D metabolite resulting from AAD-1 activity, 2,4-dichlorophenol (DCP, Sigma) (at 50-3200 g ae/ha, technical grade). All applications were formulated in 200 mM Hepes buffer (pH 7.5). Each treatment was replicated 3-4 times. Plants were evaluated at 3 and 14 days after treatment and are averaged over two experiments.

[0279] These results (see Table 20) confirm that *AAD-1 (v3)* in *Arabidopsis* provides robust resistance to the phenoxyacetic auxins, phenoxypropionic auxins, but have not shown significant cross resistance to the pyridyloxyacetic auxins tested and corroborates the *in vitro* enzyme and whole plate substrate specificity data. Additionally, there is no effect of the metabolite, 2,4-dichlorphohenol (DCP), on wildtype or transgenic *Arabidopsis*.

Table 20. Comparison of homozygous T_4 AAD-1 (v3) and wildtype *Arabidopsis* plant response to various foliar-applied auxinic herbicides.

Phenoxypropionic auxins		
	Ave % Injury 14DAT	
Herbicide Treatment	AAD1.01.315.076.T_4 homozygous AAD1 plants	PatCry1f - Control
50 g ae/ha R-Dichlorprop	3	31
200 g ae/ha R-Dichlorprop	3	73
800 g ae/ha R-Dichlorprop	3	89
3200 g ae/ha R-Dichlorprop	3	95
12.5 g ae/ha Mecoprop	3	0
25 g ae/ha Mecoprop	0	2
50 g ae/ha Mecoprop	0	17
100 g ae/ha Mecoprop	0	33
200 g ae/ha Mecoprop	3	62
400 g ae/ha Mecoprop	0	78
800 g ae/ha Mecoprop	0	93
1600 g ae/ha Mecoprop	0	100
Phenoxyacetic auxins		
	Ave % Injury 14DAT	
Herbicide Treatment	AAD1.01.315.076.T_4 homozygous AAD1 plants	Pat/Cry1f - Control
12.5 g ae/ha 2,4-D DMA	0	67
25 g ae/ha 2,4-D DMA	0	78
50 g ae/ha 2,4-D DMA	0	93
100 g ae/ha 2,4-D DMA	0	100
200 g ae/ha 2,4-D DMA	0	100
400 g ae/ha 2,4-D DMA	0	100
800 g ae/ha 2,4-D DMA	0	100
1600 g ae/ha 2,4-D DMA	0	100
8.75 g ae/ha 2,4,5-T	0	0
17.5 g ae/ha 2,4,5-T	3	20
35 g ae/ha 2,4,5-T	0	43
70 g ae/ha 2,4,5-T	3	85
140 g ae/ha 2,4,5-T	0	95
280 g ae/ha 2,4,5-T	0	98
560 g ae/ha 2,4,5-T	17	100
1120 g ae/ha 2,4,5-T	3	100

Table 20. Comparison of homozygous T_4 AAD-1 (v3) and wildtype *Arabidopsis* plant response to various foliar-applied auxinic herbicides.

	Pyridyloxyacetic auxins	
	Ave % Injury 14DAT	
Herbicide Treatment	AAD1.01.315.076.T_4 homozygous AAD1 plants	Pat/Cry1f - Control
50 g ae/ha Triclopyr	31	36
200 g ae/ha Triclopyr	58	65
800 g ae/ha Triclopyr	74	84
3200 g ae/ha Triclopyr	97	95
50 g ae/ha Fluroxypyr	48	76
200 g ae/ha Fluroxypyr	75	85
800 g ae/ha Fluroxypyr	88	85
3200 g ae/ha Fluroxypyr	95	95
	Inactive DCP metabolite	
50 g ae/ha 2,4-DCP	0	0
200 g ae/ha 2,4-DCP	0	0
800 g ae/ha 2,4-DCP	0	0
3200 g ae/ha 2,4-DCP	0	0

[00280] 6.10 – Relationship of Plant Growth to AAD-1 (v3) Expression in *Arabidopsis*.

[00281] An experiment was designed to examine if the level of AAD-1 (v3) expression in *Arabidopsis* varies at different growth stages. A high-tolerance, homozygous, *AAD-1 (v3)* T_4 line (id=PAAD1.01.345.163) was grown in greenhouse. Half of the plants were treated with 800 g ae /ha of 2,4-D (as previously described) while the other half were not treated. Two leaves, the 3rd leaf from the top and the 5th leaf from the bottom, were harvested from 5 plants, both treated and untreated, and analyzed by ELISA and Western Blotting (as described in Example 11) experiments at 4, 10, 14, 20 and 25 DAT. Figures 8A and 8B showed that there was statistically no difference in AAD-1 (v3) expression between young and old leaves. In addition, the herbicide 2,4-D had little impact on the expression level of AAD-1 (v3) protein. The protein levels accumulated in older plants with some significant protein degradation at the later time points.

[00282] In a separate experiment, four different homozygous T_4 lines of *Arabidopsis* displaying different tolerance level to the herbicide 2,4-D were sprayed with various levels (0, 200, 800 and 3200 g/ha) of 2,4-D and their herbicide injury and AAD-1 (v3) expression were examined. Four days after the herbicide treatment, little injury was observed in three of the four lines, even at the highest dose tested (Figure 9A). These plants also expressed high

level of AAD-1 (v3), from 0.1 to 0.25% of (Figure 9B). On the contrary, the low tolerance line expressed less than 0.1% of AAD-1 (v3) in TSP and suffered observable injury. More importantly, they recovered from the injury on 14 DAT (Figure 9A), indicating that the low level of AAD-1 (v3) expression was able to protect the plants from the serious herbicide damage. All control plants suffered serious injury and died 14 DAT at doses 800 g ae/ha 2,4-D and above.

[0283] 6.11 – Molecular analysis of *AAD-1 (v3) Arabidopsis*.

[0284] Invader Assay (methods of Third Wave Agbio Kit Procedures) for PAT gene copy number and/or Southern blot analysis was performed with total DNA obtained from Qiagen DNeasy kit on multiple *AAD-1 (v3)* homozygous lines to determine stable integration of the plant transformation unit containing *PAT* and *AAD-1 (v3)*. Analysis assumed direct physical linkage of these genes as they were contained on the same plasmid.

[0285] For Southern analysis, a total of 1 µg of DNA was subjected to an overnight digest of Nsi I for pDAB721 to obtain integration data. The samples were run on a large 0.85 % agarose gel overnight at 40 volts. The gel was then denatured in 0.2 M NaOH, 0.6 M NaCl for 30 minutes. The gel was then neutralized in 0.5 M Tris HCl, 1.5 M NaCl pH of 7.5 for 30 minutes. A gel apparatus containing 20SSC was then set up to obtain a gravity gel to nylon membrane (Millipore INYC00010) transfer overnight. After the overnight transfer the membrane was then subjected to UV light via a crosslinker (stratagene UV stratalinker 1800) at 1200 X100 microjoules. The membrane was then washed in 0.1% SDS, 0.1 SSC for 45 minutes. After the 45 minute wash, the membrane was baked for 3 hours at 80° C and then stored at 4° C until hybridization. The hybridization template fragment consisted of the prepared primers (Pat 5-3 AGATACCCTTGGTTGGTTGC) (SEQ ID NO:23) and (Pat 3-3 CAGATGGATCGTTTGGAAGG) (SEQ ID NO:24) designed to obtain the coding region of *PAT*. The product was run on a 1% agarose gel and excised and then gel extracted using the Qiagen (28706) gel extraction procedure. The membrane was then subjected to a pre-hybridization at 60° C step for 1 hour in Perfect Hyb buffer (Sigma H7033). The Prime it RmT dCTP-labeling rxn (Stratagene 300392) procedure was used to develop the p32 based probe (Perkin Elmer). The probe was cleaned up using the Probe Quant. G50 columns (Amersham 27-5335-01). Two million counts CPM per ml of Perfect Hyb buffer was used to hybridize the southern blots overnight. After the overnight hybridization the blots were then

subjected to two 20 minute washes at 65° C in 0.1% SDS, 0.1 SSC. The blots were then exposed to film overnight, incubating at -80° C.

[00286] Results showed all 2,4-D resistant plants assayed contained *PAT* (and thus by inference, *AAD-1 (v3)*). Copy number analysis showed total inserts ranged from 1 to >10 copies. This correlates, too, with the AAD-1 (V3) protein expression data indicating that the presence of the enzyme yields significantly high levels of resistance (>>200 fold) to all commercially available phenoxyacetic and phenoxypropionic acids.

[00287] 6.12 – *Arabidopsis* transformed with molecular stack of *AAD-1 (v3)* and glyphosate resistance gene.

[00288] T_1 *Arabidopsis* seed was produced, as previously described, containing pDAB3230 plasmid (*AAD-1 (v3)* + *EPSPS*) coding for a putative glyphosate resistance trait. T_1 transformants were selected using *AAD-1 (v3)* as the selectable marker as described in example 6.6, except the 2,4-D rate used was 75 g ae/ha. Twenty-four T_1 individually transformed events were recovered from the first selection attempt and transferred to three-inch pots in the greenhouse as previously described. Three different control *Arabidopsis* lines were also tested: wildtype Columbia-0, *AAD-1 (v3)* + *PAT* T_3 homozygous lines (pDAB721-transformed), and *PAT* + *Cry1F* homozygous line (transformed control). Only pDAB3230 plants were pre-selected at the seedling stage for 2,4-D tolerance. Four days after transplanting, plants were evenly divided for foliar treatment by track sprayer as previously described with 0, 26.25, 105, 420, or 1680 g ae/ha glyphosate (Glyphomax Plus, Dow AgroSciences) in 200 mM Hepes buffer (pH 7.5). All treatments were replicated 4 or 5 times. Plants were evaluated 7 and 14 days after treatment. I_{50} values were calculated and show >14 fold level of tolerance imparted by *EPSPS* molecularly stacked with *AAD-1 (v3)* (*see* Figure 10). AAD-1 (v3) did not provide resistance to glyphosate itself (re: pDAB721 response). These T_1 plants will be grown to seed, self-pollinated to yield T_2 seed. The pDAB 3230 T_1 plants have demonstrated tolerance to lethal doses of 2,4-D and glyphosate. T_2 plants will be further tested to demonstrate these co-transformed plants will withstand glyphosate + 2,4-D treatments applied in tankmix as described in Example 21 and shown for *AAD-1 (v3)*-transformed corn in Example 8.

Example 7 – WHISKERS-Mediated Transformation Into Maize, and Use of *AAD-1 (v3)* as a Selectable Marker

[00289] 7.1 – Cloning of *AAD-1 (v3)*.

[00290] The *AAD-1 (v3)* fragment was received on an NcoI/SacI fragment. Construct pDAB4005 was digested with NcoI and SacI and the 5175 bp backbone fragment isolated. The two fragments were ligated together using T4 DNA ligase and transformed into DH5α cells. Minipreps were performed on the resulting colonies using Qiagen's QIA Spin mini prep kit, and the colonies were digested to check for orientation. The correct intermediate plasmid was named pDAB3403. Both pDAB3403 and pDAB8505 (OsAct1/PAT/ZmLip) were digested with NotI. The 3442 bp band from pDAB3403 and the 11017 bp band from pDAB8505 were isolated and purified. The fragments were ligated together, transformed into DH5α, and the resulting plasmids were screened for orientation. The final construct was designated pDAB3404, which contains ZmUbi1/po-aad1/ZmPer5::OsAct1/PAT/ZmLip.

[00291] 7.2 – Callus/suspension initiation.

[00292] To obtain immature embryos for callus culture initiation, F_1 crosses between greenhouse-grown Hi-II parents A and B (Armstrong *et al.* 1991) were performed. When embryos were 1.0-1.2 mm in size (approximately 9-10 days post-pollination), ears were harvested and surface sterilized by scrubbing with Liqui-Nox® soap, immersed in 70% ethanol for 2-3 minutes, then immersed in 20% commercial bleach (0.1% sodium hypochlorite) for 30 minutes.

[00293] Ears were rinsed in sterile, distilled water, and immature zygotic embryos were aseptically excised and cultured on 15Ag10 medium (N6 Medium (Chu *et al.*, 1975), 1.0 mg/L 2,4-D, 20 g/L sucrose, 100 mg/L casein hydrolysate (enzymatic digest), 25 mM L-proline, 10 mg/L $AgNO_3$, 2.5 g/L Gelrite, pH 5.8) for 2-3 weeks with the scutellum facing away from the medium. Tissue showing the proper morphology (Welter *et al.*, 1995) was selectively transferred at biweekly intervals onto fresh 15Ag10 medium for about 6 weeks, then transferred to 4 medium (N6 Medium, 1.0 mg/L 2,4-D, 20 g/L sucrose, 100 mg/L casein hydrolysate (enzymatic digest), 6 mM L-proline, 2.5 g/L Gelrite, pH 5.8) at bi-weekly intervals for approximately 2 months.

[00294] To initiate embryogenic suspension cultures, approximately 3 ml packed cell volume (PCV) of callus tissue originating from a single embryo was added to approximately 30 ml of H9CP+ liquid medium (MS basal salt mixture (Murashige and Skoog, 1962), modified MS

Vitamins containing 10-fold less nicotinic acid and 5-fold higher thiamine-HCl, 2.0 mg/L 2,4-D, 2.0 mg/L α-naphthaleneacetic acid (NAA), 30 g/L sucrose, 200 mg/L casein hydrolysate (acid digest), 100 mg/L *myo*-inositol, 6 mM L-proline, 5% v/v coconut water (added just before subculture), pH 6.0). Suspension cultures were maintained under dark conditions in 125 ml Erlenmeyer flasks in a temperature-controlled shaker set at 125 rpm at 28° C. Cell lines typically became established within 2 to 3 months after initiation. During establishment, suspensions were subcultured every 3.5 days by adding 3 ml PCV of cells and 7 ml of conditioned medium to 20 ml of fresh H9CP+ liquid medium using a wide-bore pipette. Once the tissue started doubling in growth, suspensions were scaled-up and maintained in 500 ml flasks whereby 12 ml PCV of cells and 28 ml conditioned medium was transferred into 80 ml H9CP+ medium. Once the suspensions were fully established, they were cryopreserved for future use.

[00295] 7.3 – Cryopreservation and thawing of suspensions.

[00296] Two days post-subculture, 4 ml PCV of suspension cells and 4 ml of conditioned medium were added to 8 ml of cryoprotectant (dissolved in H9CP+ medium without coconut water, 1 M glycerol, 1 M DMSO, 2 M sucrose, filter sterilized) and allowed to shake at 125 rpm at 4° C for 1 hour in a 125 ml flask. After 1 hour 4.5 ml was added to a chilled 5.0 ml Corning cryo vial. Once filled individual vials were held for 15 minutes at 4° C in a controlled rate freezer, then allowed to freeze at a rate of -0.5° C/minute until reaching a final temperature of -40° C. After reaching the final temperature, vials were transferred to boxes within racks inside a Cryoplus 4 storage unit (Forma Scientific) filled with liquid nitrogen vapors.

[00297] For thawing, vials were removed from the storage unit and placed in a closed dry ice container, then plunged into a water bath held at 40-45° C until "boiling" subsided. When thawed, contents were poured over a stack of ~8 sterile 70 mm Whatman filter papers (No. 4) in covered 100x25 mm Petri dishes. Liquid was allowed to absorb into the filters for several minutes, then the top filter containing the cells was transferred onto GN6 medium (N6 medium, 2.0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 2.5 g/L Gelrite, pH 5.8) for 1 week. After 1 week, only tissue with promising morphology was transferred off the filter paper directly onto fresh GN6 medium. This tissue was subcultured every 7-14 days until 1 to 3 grams was available for suspension initiation into approximately 30 mL H9CP+ medium in 125 ml Erlenmeyer flasks. Three milliliters PCV was subcultured into fresh H9CP+ medium every 3.5 days until

a total of 12 ml PCV was obtained, at which point subculture took place as described previously.

[00298] 7.4 – Dose response of non-transformed tissue to haloxyfop acid.

[00299] Non-transformed donor Hi-II cell lines were pooled together, WHISKERS-treated without DNA, filtered onto GN6 medium at the rate of 6 ml per filter, and allowed to callus for 2-3 weeks at 28° C. Approximately 200 mg of callused suspension tissue was transferred per treatment to selection media in 60x20 mm plates containing 30, 100 or 300 nM R-haloxyfop acid. Three replicates were used per concentration. A control medium containing 1 mg/L bialaphos (from Herbiace commercial formulation, Meiji Seika, Japan), GN6 (1H), was also included for comparison. Callus was removed after 2 weeks, weighed, and transferred to fresh media of the same concentration for another 2 weeks. After a total of 4 weeks elapsed time, tissue was removed, weighed a final time, and then discarded. Results are shown in Figure 11.

[00300] Two separate dose response studies of callus tissue to the phenol degradation products of haloxyfop and cyhalofop, respectively, were also completed to confirm that this end product would not be deleterious to callus growth. Data from a cyhalofop phenol dose response (see Figure 12) shows that at 1 μM cyhalofop phenol, growth is still 76% as high as the control without cyhalofop phenol. Data from a haloxyfop phenol dose response showed that even at 300 nM haloxyfop phenol, growth was equal to or greater than the control lacking haloxyfop phenol (data not shown).

[00301] 7.5 – WHISKERS-mediated transformation using bialaphos selection.

[00302] Approximately 24 hours prior to transformation, 12 ml PCV of previously cryopreserved embryogenic maize suspension cells plus 28 ml of conditioned medium was subcultured into 80 ml of GN6 liquid medium (GN6 medium lacking Gelrite) in a 500 ml Erlenmeyer flask, and placed on a shaker at 125 rpm at 28° C. This was repeated 2 times using the same cell line such that a total of 36 ml PCV was distributed across 3 flasks. After 24 hours the GN6 liquid media was removed and replaced with 72 ml GN6 S/M osmotic medium (N6 Medium, 2.0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 45.5 g/L sorbitol, 45.5 g/L mannitol, 100 mg/L *myo*-inositol, pH 6.0) per flask in order to plasmolyze the cells. The flasks were placed on a shaker in the dark for 30-35 minutes, and during this time a 50 mg/ml suspension of silicon carbide whiskers was prepared by adding the appropriate volume of GN6 S/M

liquid medium to ~405 mg of pre-autoclaved, silicon carbide whiskers (Advanced Composite Materials, Inc.).

[00303] After incubation in GN6 S/M, the contents of each flask were pooled into a 250 ml centrifuge bottle. Once all cells settled to the bottom, all but ~14 ml of GN6 S/M liquid was drawn off and collected in a sterile 1-L flask for future use. The pre-wetted suspension of whiskers was vortexed for 60 seconds on maximum speed and 8.1 ml was added to the bottle, to which 170 µg DNA was added as a last step. The bottle was immediately placed in a modified Red Devil 5400 commercial paint mixer and agitated for 10 seconds. After agitation, the cocktail of cells, media, whiskers and DNA was added to the contents of the 1-L flask along with 125 ml fresh GN6 liquid medium to reduce the osmoticant. The cells were allowed to recover on a shaker for 2 hours before being filtered onto Whatman #4 filter paper (5.5 cm) using a glass cell collector unit that was connected to a house vacuum line.

[00304] Either 3 or 6 mL of dispersed suspension was pipetted onto the surface of the filter as the vacuum was drawn. Filters were placed onto 60 x 20 mm plates of GN6 medium. Plates were cultured for 1 week at 28° C in a dark box that was loosely sealed with a single layer of plastic (<2 mils thick) to minimize evaporation of the individual plates.

[00305] After 1 week, filter papers were transferred to 60x20 mm plates of GN6 (1H) medium (N6 Medium, 2.0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 100 mg/L *myo*-inositol, 1.0 mg/L bialaphos; 2.5 g/L Gelrite, pH 5.8) or GN6D (1H) medium (same as GN6 (1H) except with 8.0 mg/L dicamba and 0.8 mg/L 2,4-D).

[00306] Plates were placed in boxes and cultured as before for an additional week. Two weeks post-transformation, the tissue was embedded by scraping either ½ the cells on the plate or else all cells on the plate into 3.0 mL of melted GN6 agarose medium (N6 medium, 2.0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 100 mg/L *myo*-inositol, 7 g/L Sea Plaque agarose, pH 5.8, autoclaved for only 10 minutes at 121° C) containing 1 mg/L bialaphos. The tissue was broken up and the 3 mL of agarose and tissue were evenly poured onto the surface of a 100 x 15 mm plate of GN6 (1H) or GN6D (1H) medium. This was repeated for all remaining plates. Once embedded, plates were individually sealed with Nescofilm® or Parafilm M®, and then cultured for 1 week at 28° C in dark boxes.

[00307] Putatively transformed isolates were typically first visible 5-8 weeks post-transformation. Any potential isolates were removed from the embedded plate and transferred to fresh selection medium of the same concentration in 60 x 20 mm plates. If sustained

growth was evident after approximately 2 weeks, an event was deemed to be resistant and was submitted for molecular analysis.

[00308] Regeneration was initiated by transferring callus tissue to a cytokinin-based induction medium, 28 (1H), containing 1 mg/L bialaphos, MS salts and vitamins, 30.0 g/L sucrose, 5 mg/L BAP, 0.25 mg/L 2,4-D, 2.5 g/L Gelrite; pH 5.7. Cells were allowed to grow in low light (13 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) for one week then higher light (40 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) for another week before being transferred to regeneration medium, 36 (1H), which was identical to 28 (1H) except that it lacked plant growth regulators. Small (3-5 cm) plantlets were removed and placed into 150 x 25-mm culture tubes containing selection-free SHGA medium (Schenk and Hildebrandt basal salts and vitamins, 1972; 1 g/L *myo*-inositol, 10 g/L sucrose, 2.0 g/L Gelrite, pH 5.8). Once plantlets developed a sufficient root and shoot system, they were transplanted to soil in the greenhouse.

[00309] 7.6 – WHISKERS-mediated transformation using haloxyfop selection.

[00310] DNA delivery parameters for direct selection on "fops" were identical to the bialaphos selection procedure except that 85 µg of pDAB3403 and 85 µg of construct containing a GFP (Green Fluorescent Protein) reporter gene were co-transformed together, and only 3 mL of suspension was filtered onto GN6 medium following the 2-hour recovery.

[00311] After 0-7 days on GN6 selection-free medium, filter papers were transferred to 60x20-mm plates of GN6 medium containing 2 mg/L 2,4-D plus 50, 100, or 200 nM R-haloxyfop acid. Plates were placed in boxes and cultured for one additional week. After one week, the tissue was embedded by scraping all cells from the plate into 3.0 mL of melted GN6 agarose medium containing the same concentration of selection agent as in the previous transfer. All steps afterward were identical to the PAT selection/regeneration protocol except that 100 nM R-haloxyfop acid was included in the regeneration media instead of 1 mg/L bialaphos.

[00312] 7.7 – Results. Multiple experiments testing various levels of haloxyfop and cyhalofop were initiated, and 47 isolates were recovered from direct selection. A subset of the callus events were submitted for screening using PCR and Western analyses. Following these expression data, 21 lead events were submitted for Southern analysis. Results using NcoI, a unique cutter, to obtain integration data following probing with *AAD-1 (v3)*, unequivocally demonstrate stable integration of *AAD-1 (v3)* following Whiskers-mediated transformation coupled with "fop" selection.

[00313] 7.8 – Quantitative demonstration of *in vitro* tolerance from AAD-1 (v3) expressing callus events from bialaphos selection

[00314] Ninety-seven callus isolates recovered from bialaphos selection were submitted for PAT copy number via Invader analysis and *AAD-1 (v3)* PTU analysis via PCR (see Example 7.10). AAD-1 (v3) protein expression using Western blot/Sandwich ELISA (Example 11) was completed on a subset of the events. A summary is described in Table 21 below. At least 15 T_0 plants were regenerated from each of these events and sent for spray testing and seed production.

Table 21.

Event	PAT Copy #	PCR for *AAD-1 (v3)* PTU	Callus Western
3404-001	2	+	+
3404-006	2	+	+
3404-013	3	+	+
3404-017	1	+	+
3404-020	3	+	nd
3404-022	2	+	+
3404-025	2	+	+
3404-027	3	+	+
3404-031	1	+	+
3404-033	2	+	nd
3404-036	3	+	+
3404-044	3	+	+
3404-050	3	+	+
3404-053	3	+	+
3404-074	2	+	+
3404-082	2	+	+

[00315] A smaller subset of these events was assessed in dose-response studies in comparison to a non-transformed control. A range of concentrations of haloxyfop (from Gallant Super formulation), up to 400 nM, were tested. Dose response data for one event, 3404-006, was generated using the general methods of Example 7.4, and is shown in Figure 13. This demonstrates that event 3404-006 showed no significant reduction in callus growth at haloxyfop concentrations up to 400 nM whereas non-transgenic corn callus tissue growth was inhibited at this rate. These data have not been normalized to account for inherent growth differences that are not related to the expression of the transgene.

[0316] 7.9 –WHISKERS-mediated transformation using imazethapyr selection.

[0317] The ZmUbi1/*AAD-1 (v3)*/ZmPer5 cassette was removed from pDAB3404 with AscI/SwaI and inserted into pDAB2212 to create the *AAD-1 (v3)* and *AHAS* Whiskers transformation vector pDAB3415, which is also referred to as pDAS1283) Once completed, this construct was transformed into maize via silicon carbide whiskers-mediated transformation as described in Example 7.4 except 2 mL of cells were filtered, followed by a 7-day recovery on GN6 medium followed by selection on media containing 3 μM imazethapyr from Pursuit® DG herbicide. Following Invader analysis, 36 events were identified that contained the AAD-1 (v3) and the AHAS genes.

[0318] Fifty-three corn calli events from these transformations were tested in both ELISA and Western Blotting experiments for their AAD-1 (v3) expression – a subset of the data is shown below. For the events listed in Table 22, the expression levels of those detected positive ranged from 90 to over 1000 ppm of total soluble proteins.

Table 22.		
AAD-1 Event ID Number	Expression Level (ppm)	Western Blot
1283[1]-001	2	-
1283[1]-002	206	+++
1283[1]-003	1	-
1283[1]-004	90	+++
1283[1]-005	1	-
1283[1]-006	105	+++
1283[1]-007	212	++
1283[1]-008	114	±
1283[1]-009	305	+
1283[1]-010	2	-
1283[1]-011	4	-
1283[1]-012	200	+++
1283[1]-013	134	+++
1283[1]-014	4	-
1283[1]-015	194	+++
1283[1]-016	4	-
1283[1]-017	196	+++
1283[1]-018	3	-
1283[1]-019	178	+
1283[1]-020	260	++
1283[1]-021	144	+++
1283[1]-022	140	+++
1283[1]-023	191	+++
1283[1]-024	392	++
1283[1]-025	368	++
1283[1]-026	14	-
1283[1]-027	1006	++
Neg Control	3	-
Neg Control	3	-
Standard (0.5 µg/mL)		++
Standard (5 µg/mL)		++++

[00319] 7.10– Molecular Analysis: Maize Materials and Methods.

[00320] 7.10.1 – Tissue harvesting DNA isolation and quantification. 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.

[00321] 7.10.2 – Invader assay analysis. The DNA samples are diluted to 20 ng/µl then denatured by incubation in a thermocycler at 95° C for 10 minutes. Signal Probe mix was then prepared using the provided oligo mix and $MgCl_2$ (Third Wave Technologies). An aliquot of 7.5 µl was 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 are then incubated at 63° C for 1 hour 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.

[00322] 7.10.3 – Polymerase chain reaction. A total of 100 ng of total DNA was used as the template. 20 mM of each primer was used with the Takara Ex Taq PCR Polymerase kit (Mirus TAKRR001A). Primers for the *AAD-1 (v3)* PTU were (Forward – ATAATGCCAGC CTGTTAAACGCC) (SEQ ID NO:25) and (Reverse – CTCAAGCATATGAATGACCT CGA) (SEQ ID NO:26). 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, 63° C for 30 seconds, and 72° C for 1 minute and 45 seconds followed by 72° C for 10 minutes. Primers for Coding Region PCR *AAD-1 (v3)* were (Forward – ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:27) and (Reverse – CGGGC AGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO:28). 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, 65° 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.

[00323] 7.10.4 – Southern blot analysis. Southern blot analysis was performed with total DNA obtained from Qiagen DNeasy kit. A total of 2 µg of DNA was subjected to an overnight digestion of Afl II and also EcoRV for pDAB3404, NcoI for pDAB3403, and SpeI for pDAB1421 to obtain integration data. After the overnight digestion an aliquot of ~100 ng was run on a 1% gel to ensure complete digestion. After this assurance the samples were run on a large 0.85 % agarose gel overnight at 40 volts. The gel was then denatured in 0.2 M NaOH, 0.6 M NaCl for 30 minutes. The gel was then neutralized in 0.5 M Tris HCl, 1.5 M NaCl pH of 7.5 for 30 minutes. A gel apparatus containing 20x SSC was then set up to

obtain a gravity gel to nylon membrane (Millipore INYC00010) transfer overnight. After the overnight transfer the membrane was then subjected to UV light via a crosslinker (Stratagene UV stratalinker 1800) at 1200 X100 microjoules. The membrane was then washed in 0.1% SDS, 0.1 SSC for 45 minutes. After the 45 minute wash, the membrane was baked for 3 hours at 80° C and then stored at 4° C until hybridization. The hybridization template fragment was prepared using the above coding region PCR using plasmid pDAB3404. The product was run on a 1% agarose gel and excised and then gel extracted using the Qiagen (28706) gel extraction procedure. The membrane was then subjected to a pre-hybridization at 60° C step for 1 hour in Perfect Hyb buffer (Sigma H7033). The Prime it RmT dCTP-labeling rxn (Stratagene 300392) procedure was used to develop the p32 based probe (Perkin Elmer). The probe was cleaned up using the Probe Quant. G50 columns (Amersham 27-5335-01). Two million counts CPM were used to hybridize the southern blots overnight. After the overnight hybridization the blots were then subjected to two 20 minute washes at 65° C in 0.1% SDS, 0.1 SSC. The blots were then exposed to film overnight, incubating at -80° C.

Example 8 – *In vivo* tolerance and field tolerance data generated from *PAT*-selected (pDAB3404) *AAD-1 (v3)* events

[00324] 8.1 - Tolerance of T_0 corn plants to AOPP herbicides.

[00325] If more than 15 clone plants per event were successfully regenerated, then extra plants were transferred to the greenhouse for preliminary tolerance screening with postemergence-applied AOPP herbicides on T_0 corn plants. Greenhouse-acclimated plants were allowed to grow until 2-4 new, normal looking leaves had emerged from the whorl (*i.e.*, plants had transitioned from tissue culture to greenhouse growing conditions). Plants were grown at 27° C under 16 hour light: 8 hour dark conditions in the greenhouse. Plants were then treated with commercial formulations of one of three AOPP herbicides: Assure® II (DuPont), Clincher® (Dow AgroSciences), or Gallant Super® (Dow AgroSciences) for quizalofop, cyhalofop, or haloxyfop, respectively. Herbicide applications were made with a track sprayer at a spray volume of 187 L/ha, 50-cm spray height, and all sprays contained 1% v/v Agridex crop oil concentrate adjuvant. The number of clones of each event varied from week to week due to the rate of regeneration and acclimation of each event. Overall, an attempt was made to treat representative clones of each event with a range of herbicide doses ranging from 1X

lethal dose (~1/8 X field dose) up to 8X field doses (64 X lethal dose). A lethal dose is defined as the rate that causes >95% injury to the Hi-II inbred. Hi-II is the genetic background of the transformants of the present invention.

[00326] AOPP's are generally very potent corn-killing herbicides. Three to four leaf Hi-II corn grown from seed is effectively killed (>95% injury) with 8.8, 62.5, and 4.4 g ae/ha of haloxyfop, cyhalofop, and quizalofop, respectively. Each *AAD-1 (v3)*-transformed line tested survived a minimally lethal dose of each AOPP herbicide tested. In fact, most lines tested survived with no visible injury (14 DAT) even when treated with an 8X field dose (64X lethal dose) of quizalofop. Several individual clones from events "017" and "038," however, did incur significant injury at elevated rates. This could be a function of lower gene expression due to how or where the gene was inserted.

[00327] The high level of AOPP tolerance was demonstrated in most events, even when applications were made to plants just coming out of tissue culture (T_0 stage). Significantly, this tolerance was shown for all three AOPP herbicides and likely will extend to all AOPP herbicides as previously shown for A-AD-1 *in vitro*.

[00328] Figure 14 shows the responses of several *AAD-1 (v3)*-transformed and non-transformed event clones to lethal doses of two AOPP herbicides (haloxyfop and quizalofop) applied 1 week prior.

[00329] Table 23 shows data for the responses of selected *AAD-1 (v3)*-transformed T_0 corn events to three AOPP herbicides applied postemergence.

Table 23. Selected AAD-1 (v3)-transformed T0 corn events response to three AOPP herbicides applied postemergence.

Construct	Event	Clone	Haloxyfop* g ae/ha	Cyhalofop** g ae/ha	Quizalofop*** g ae/ha	% Injury 14 DAT
3404	001	016	8.8			0
3404	001	018		62.5		0
3404	001	017			8.8	0
3404	001	019			8.8	30
3404	001	020			35	0
3404	017	018			35	0
3404	017	019			35	0
3404	017	020			70	0
3404	017	021			70	0
3404	017	022			140	0
3404	017	023			140	30
3404	017	024			280	30
3404	017	025			280	20
3404	022	019	8.8			0
3404	022	020	17.5			0
3404	022	016	17.5			0
3404	022	024		62.5		0
3404	022	018		125		0
3404	022	021			8.8	0
3404	022	017			17.5	0
3404	022	022			35	0
3404	022	023			70	0
3404	033	012			35	0
3404	033	013			70	0
3404	033	014			70	0
3404	033	015			140	0
3404	033	016			280	0
3404	038	016	8.8			0
3404	038	018		62.5		0
3404	038	017			8.8	0
3404	038	019			35	70
3404	038	020			35	80
3404	038	021			70	80
3404	038	022			70	80
			(lethal dose = 8.8 g ae/ha)	(lethal dose = 62.5 g ae/ha)	(lethal dose = 4.4 g ae/ha)	

*Gallant super® + 1% COC (v/v)
**Clincher ® + 1% COC (v/v)
***Assure II + 1% COC (v/v)
®Trademark of Dow AgroSciences, LLC

8.2 – Field tolerance of pDAB3404 T_1 corn plants to quizalofop 2,4-D, and glufosinate herbicides.

[00330] Two field trials were established at field stations in Hawaii and Indiana. Corn seed from inbred T_1 plants were utilized to evaluate sixteen AAD1 event lines for tolerance against quizalofop and 2,4-D. Three non-transformed hybrids were included for comparison purposes. The hybrid Hi-II x 5XH571 is of the same parentage as the *AAD-1 (v3)* event lines. The hybrid Croplan 585SR is a sethoxydim resistant line.

[00331] The experimental design was a split-plot with four replications. The main plot was herbicide treatment and the sub-plot was *AAD-1 (v3)* event or comparison hybrid. Plots were one row by 3.7 meters with approximately twenty-five seeds planted in each row. For AAD1 events, seeds from a different lineage within the event were planted in each replicate.

[00332] Glufosinate at 560 g ai/ha was applied to *AAD-1 (v3)* plots at the V2 stage to eliminate non-transformed plants. Experimental treatments included commercial formulations of quizalofop applied at 70 and 140 g ae/ha, 2,4-D (dimethylamine salt) at 560 and 1120 g ae/ha, and an untreated control. Treatments were applied using backpack broadcast boom equipment delivering 187 L/ha carrier volume at 130-200 kpa pressure. Quizalofop treatments were applied at the V3-V4 corn stage and 2,4-D treatments were applied at the V5-V6 stage.

[00333] Quizalofop treated plots were visually assessed for crop injury at one and three weeks after application (WAA) using a 0-100% scale, where 0 equals no injury and 100 equals complete death. 2,4-D treated plots were visually assessed for plant leaning at 2 days after application (DAA) using 0-100% scale where 0 equals no leaning from any plant and 100 equals all plants prone. Additionally, 2,4-D plots were visually assessed at 3-4 WAA for brace root deformation using a 0-10 scale.

[00334] 8.2.1 – Results.

[00335] *AAD-1 (v3)* event response to the highest rates tested of quizalofop and 2,4-D are shown in Table 24. These rates represent approximately twice the normal commercial use rates. Non-transformed hybrids were severely injured (80-100%) by quizalofop at 70 g ae/ha including the sethoxydim resistant line, although it displayed slightly better tolerance than the other two hybrids. All *AAD-1 (v3)* events except one lineage of event 3404.001 displayed excellent tolerance to quizalofop at 70 g ae/ha. No visible symptoms were observed on the *AAD-1 (v3)* events except with the events noted above.

Table 24.

Treatment (rate) =	Quizalofop (140 g ae/ha)		2,4-D amine (1120 g ae/ha)		2,4-D amine (1120 g ae/ha)		Analysis Results			Resistance Segregation Ratios following Liberty Spray		
Evaluation =	% Injury 3 WAA (0-100 scale)		% Leaning 2 DAA (0-100 scale)		Braceroot Deformation 3-4 WAA (0-10 scale)		AAD-1 copy number leaf (Southern analysis)	AAD-1 Leaf Western Blot T_0	AAD-1 Leaf ELISA T_0	T_1 Population Average		T_2 Population Average
Event or Hybrid	IN	HI	IN	HI	IN	HI				IN	HI	HI
3404.001	25	25	0	5	1	2	3	+++	+++	40%	47%	X
3404.006	0	0	0	0	0	0	1	++	+++	33%	26%	X
3404.013	0	0	0	0	0	0	1	+	+++	63%	58%	X
3404.017	0	0	1	0	0	0	2	+/-	++	48%	47%	X
3404.020	0	0	0	0	0	0	2	++	+++	50%	51%	X
3404.022	0	0	1	0	0	0	1	+	++	51%	57%	76%*
3404.025	0	0	0	0	0	0	2	+++	++++	55%	59%	X
3404.027	0	0	3	0	0	0	5	+	++	51%	50%	X
3404.031	0	0	1	0	0	0	1	++	++++	47%	43%	61%*
3404.033	0	0	0	0	0	0	2 or 3	+	++	52%	49%	X
3404.036	0	0	0	0	0	0	4	++	+++	52%	48%	X
3404.044	0	0	1	0	0	1	1	+	+/-	50%	48%	X
3404.050	0	0	0	1	0	1	2	nd	nd	38%	28%	X
3404.053	0	0	1	0	0	0	2	+++	+++	48%	56%	X
3404.074	0	0	0	0	0	0	1	++	+++	53%	52%	73%*
3404.082	0	0	0	0	0	1	3	nd	nd	38%	36%	X
DK493 HI-II X 5XH571 CROPLAN 585SR	100	100	20	23	8	9						
	100	100	13	34	7	9						
	80	96	11	33	9	9						

* Fits single locus dominant trait segregation as determined by chi square analysis (P>0.05)

[00336] 2,4-D at the 1120 g ae/ha rate caused significant levels (11-33%) of epinastic leaning in the non-transformed hybrids, a normal response when applied beyond the V4 growth stage. Little or no leaning was observed with all *AAD-1 (v3)* events except one lineage of 3404.001 (Indiana location only) where moderate levels (5-13%) of leaning occurred.

[00337] Brace roots of non-transformed hybrids were severely deformed (rating of 9 on a 0-10 scale) by 2,4-D at the 1120 g ae/ha rate. Again, this is a normal response to 2,4-D applied beyond the V4 growth stage. As with the leaning response, little or no brace root injury was observed with all *AAD-1 (v3)* events except one lineage of 3404.001.

[00338] Similar trends occurred with lower tested rates of quizalofop and 2,4-D although at reduced but still significant response levels in the non-transformed hybrids (data not shown).

[00339] These results indicate that most *AAD-1 (v3)* transformed event lines displayed a high level of resistance to quizalofop and 2,4-D at rates that were lethal or caused severe epinastic malformations to non-transformed corn hybrids. *See also* Figure 16.

[00340] 8.2.2- Expected Mendelian segregation ratios on three T_2 events. Plants from individual lineages of each event were randomly self-pollinated in the field. T_2 seed were hand harvested at physiological maturity. Based on single gene copy number (see Table 24 above) and overall performance in T_1 generation (segregation, herbicide tolerance, and vigor), three events (022, 031, and 074) were chosen for further evaluation in the field. Breeding rows of each event were planted using a precision cone planter each consisting of 2500-3000 seeds. At the V2 growth stage, all *AAD-1 (v3)* lines were sprayed with 140 g ae/ha quizalofop (Assure® II) using a backpack sprayer as previously described. This rate rapidly killed all "null" (untransformed) segregants. Each event had a segregation ratio consistent with Mendelian inheritance of a single locus, dominant gene (3 resistant:1 sensitive; or 75% survival) (see Table 24). Homozygotes and hemizygotes from event 74 were identified by zygosity testing (refer to *AAD-1 (v3)* Invader assay description for corn). Hemizygous plants were removed and homozygous *AAD-1 (v3)* plants were crossed with BE1146 corn inbred introgressed and homozygous for glyphosate resistance trait, NK603, creating a homogeneous F_1 hybrid seed that is hemizygous for glyphosate resistance, *AAD-1 (v3)*, and glufosinate resistance.

[00341] 8.3 – Stacking of *AAD-1 (v3)* and *PAT* with glyphosate resistance genes in corn.

[00342] Homozygous T_2 *AAD-1 (v3)/PAT* corn plants were crossed with glyphosate resistant corn plants producing F_1 seed containing *AAD-1 (v3)*, *PAT*, and glyphosate resistance genes as described in the previous example.

[00343] F_1 seeds were planted individually into 3-inch pots prepared with Metro-Mix® 360 growing medium (Sun Gro Horticulture). The pots were initially subirrigated with Hoagland's solution until wet, then allowed to gravity drain, and grown at 27° C under 16 hour light:8 hour dark conditions in the greenhouse. For the remainder of the study the plants were subirrigated with deionized water.

[00344] Plants were allowed to grow until 2-4 leaves had emerged from the whorl. At this point herbicide applications were made with a track sprayer at a spray volume of 187 L/ha, 50-cm spray height. The plants were sprayed with rates of 2,4-D DMA, glyphosate, glufosinate, and various combinations of the three. All applications were formulated in 200

mM Hepes buffer (pH 7.5). In spray applications where glufosinate was present the treatment was formulated with the addition of 2% w/v ammonium sulfate.

[00345] At 3 and 14 days after treatment (DAT) plants were evaluated. Plants were assigned injury rating with respect to stunting, chlorosis, and necrosis. Plants assigned an injury rating of 90% or above are considered dead. Results of the study at 14 DAT can be seen in Table 25.

Table 25.

	Field Rate	% Injury at 14 DAT	
		HI II X 5XH751	RR/PAT/AAD1
		Ave	Ave
Untreated control	-	0	0
840 g ae/ha glyphosate	1X	98	0
1680 g ae/ha glyphosate	2X	100	0
3360 g ae/ha glyphosate	4X	100	0
560 g ae/ha 2,4-D DMA	1X	10	0
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	2X	14	0
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	4X	29	0
470 g ae/ha glufosinate	1X	80	0
940 g ae/ha glufosinate	2X	90	3
1880 g ae/ha glufosinate	4X	96	15
840 g ae/ha glyphosate + 560 g ae/ha 2,4-D DMA	1X + 1X	96	1
1680 g ae/ha glyphosate +1120 g ae/ha 2,4-D DMA	2X + 2X	100	2
3360 g ae/ha glyphosate + 2240 g ae/ha 2,4-D DMA	4X + 4X	100	1
470 g ae/ha glufosinate + 560 g ae/ha 2,4-D DMA	1X + 1X	89	5
940 g ae/ha glufosinate + 1120 g ae/ha 2,4-D DMA	2X + 2X	91	10
1880 g ae/ha glufosinate + 2240 g ae/ha 2,4-D DMA	4X + 4X	97	13
840 g ae/ha glyphosate + 470 g ae/ha glufosinate	1X + 1X	90	5
1680 g ae/ha glyphosate + 940 g ae/ha glufosinate	2X + 2X	98	15
3360 g ae/ha glyphosate + 1880 g ae/ha glufosinate	4X + 4X	100	15

[00346] This study demonstrated that the *AAD-1 (v3)* gene in corn can be stacked with a glyphosate resistance gene and a glufosinate resistance gene to provide robust field-level tolerance to 2,4-D, glyphosate, and glufosinate alone or in tank mix combinations.

[00347] 8.3.1 – Resistance of *AAD-1 (v3)* corn using a tank mix of 2,4-D DMA and quizalofop. T_2BC_1 seeds of hemizygous event number 3404-025.001R/R001 Bulked.001.S058 were planted individually into 3-inch pots prepared with Metro-Mix® 360 growing medium. The pots were initially sub-irrigated with Hoagland's solution until wet, then allowed to gravity drain, and grown at 27° C under 16 hour light:8 hour dark conditions in the greenhouse. For the remainder of the study the plants were sub-irrigated with de-ionized water.

[00348] Plants were allowed to grow until V1 stage in the greenhouse. At this point the plants were selected with 560 g ae/ha Assure® II with the addition of 1% Agridex crop oil concentrate in 200 mM Hepes buffer with the research track sprayer set at 187 L/ha. Plants were allowed 4 days to show symptoms of the selection. All plants were uninjured. Herbicide applications were made with a track sprayer at a spray volume of 187 L/ha, 18-in spray height. All applications were formulated in 200 mM Hepes buffer (pH 7.5) with the addition of 1% v/v Agridex.

At 3 and 14 days after treatment (DAT) plants were evaluated. Plants were assigned injury rating with respect to stunting, chlorosis, and necrosis. Plants assigned an injury rating of 90% or above are considered dead. Plants from this particular lineage had 0% injury at 14 DAT for all tank mixed combinations, while the wild-type had 100% injury. These results indicate AAD-1 (v3) not only provides robust field level resistance to 2,4-D and quizalofop individually, but also to exaggerated rates of multiple combinations of the two chemistries. One could logically expect to implement novel weed control measures with combinations of phenoxy auxins and AOPP graminicides in corn (or other crops transformed with AAD-1) not previously enabled by a single gene HTC.

[00349] 8.3.2 - Tolerance of (pDAB3403) T_0 corn plants to quizalofop herbicide. A target of approximately eight T_0 plant clones from each of 17 events were regenerated and transferred to the greenhouse for preliminary tolerance screening with postemergence-applied discriminating rate of quizalofop herbicide applied by track sprayer at 35 g ae/ha (1X field rate, 4X lethal dose) to 3-leaf, greenhouse-adapted T_0 corn plants using track sprayer conditions previously described. Plants were rated as Resistant or Sensitive 7 days after treatment. Control, non-transgenic corn was included with each spray application. Two events, Event 014 and 047, had two or more T_0 clones sensitive to 35 g ae/ha quizalofop, indicating an unexpected level of sensitivity for this event. The 15 other events showed stable integration, protein expression, and the ability to tolerate a 4X lethal dose of quizalofop at the whole plant level.

[00350] 8.3.3 Expression of AAD-1 (v3) with respect to quizalofop tolerance.

[00351] Three different T2 lineages from 3404 transformations that were pre-screened with Liberty® (as described previously) to remove nulls were chosen to compare their tolerance to quizalofop with respect to their AAD-1 (v3) expression. Expression was measured at 14 DAT (data not shown) and at 30 DAT (see Figure 15.). The highest tolerance line, event

3404-074, always expressed with a higher amount of AAD-1 (v3) than the other two events at 1X and higher field rates. This data concludes that corn expressing AAD-1 (v3) can be protected from quizalofop injury at the highest level tested (2,240 g/ha), which is 16 times the 1X field dose of 35 g/ha. In addition, the expression level was consistent throughout the period of the experiment.

Example 9 - *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Maize with *AAD-1 (v3)*

[00352] 9.1 - Plant material.

[00353] Seeds of a "High II" (*i.e.*, Parent A and B) F_1 cross (Armstrong *et al.*, 1991) are planted directly into 5 gallon-pots containing 95:5 Metro-Mix® 360: Mineral soil. The plants are grown in the greenhouse with a 16 hour photoperiod supplemented by a combination of high pressure sodium and metal halide lamps.

[00354] 9.2 - Tissue source.

[00355] For obtaining immature Hi-II (F2) embryos, controlled sib-pollinations were performed. On the day of pollination, actively shedding tassels are bagged, and fresh pollen is collected and applied carefully onto the silks. Immature embryos were isolated as described in Example 7.2.

[00356] 9.3 - Preparation of a superbinary vector.

[00357] Construction of an *Agrobacterium* construct, pDAB2272, containing the *AAD-1 (v3)* gene in combination with the AHAS selectable marker gene was accomplished by isolating the 3443 base pair NotI fragment from pDAB3404 containing ZmUbi1 v2/ *AAD-1 (v3)*/ZmPer5 v2 and inserting it into the NotI site of pDAB8549. The resulting plasmid contains the ZmUbi1 v2/ *AAD-1 (v3)*/ ZmPer5 v2 and the OsAct1 v2/AHAS v3/ZmLip v1 cassettes flanked by non-identical MAR regions in the direct orientation. This was subsequently transformed into LBA4404/pSB1 to create the superbinary vector, which was named pDAB3602 but was also referred to as pDAS1421.

[00358] 9.4 - Bacterial supply.

[00359] All transformations use the "Super Binary" vector from Japan Tobacco described in U.S. Patent No. 5,591,616 ("Method for Transforming Monocotyledons"). To prepare the *Agrobacterium* suspension for treatment, 1-2 loops of pDAS1421 recombinant bacteria from a YP streak plate was put into 5 ml of LS-inf. Mod medium (LS Basal Medium (Linsmaier and Skoog, 1965), N6 vitamins, 1.5 mg/L 2,4-D, 68.5 g/L sucrose, 36.0 g/L glucose, 6 mM L-proline, pH 5.2). The mixture was vortexed until a uniform suspension was achieved. The

bacterial concentration was taken using a Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter by reading the density of the solution. The solution was adjusted to a concentration of Klett 200 (~ $1x10^9$ cfu/ml) and 100 µM acetotosyringone added to the solution.

[00360] 9.5 - Infection and cocultivation.

[00361] The immature embryos are isolated directly into a microfuge tube containing 2 ml LS-inf. Mod liquid medium. Each tube, containing ~100 embryos, is vortexed for 3-5 sec. The medium is removed and replaced with fresh liquid medium and the vortex is repeated. The liquid medium is again removed and this time replaced with an *Agrobacterium* solution at the Klett 200 concentration. The *Agrobacterium* and embryo mixture is vortexed for 30 sec. Following a 5 minute incubation at room temperature, the embryos were transferred to LS-As Mod medium (LS Basal Medium, N6 vitamins, 1.5 mg/L 2,4-D, 30.0 g/L sucrose, 6 mM L-proline, 0.85 mg/L $AgNO_3$,1, 100 µM acetotosyringone, 3.0 g/L Gelrite, pH 5.8) for a 5-day co-cultivation at 25° C.

[00362] 9.6 - Dose response using immature embryos.

[00363] Dose response studies were initiated using immature embryos treated with *Agrobacterium* strain LBA4404 lacking a plasmid as described previously. Once treated, embryos were allowed to co-cultivate for 5 days at 25° C and were then transferred to selection media containing various levels of R-haloxyfop or R-cyhalofop. Embryos were also transferred to media containing 1 mg/L bialaphos and 100 nM imazethapyr as negative controls. Embryos were scored for % embryogenic callus formation after 2 weeks, and then again after 4 weeks. Embryos were tested on R-haloxyfop levels up to 30 nM; however, insufficient reduction of callus formation was seen at the highest levels, so higher concentrations (50 – 100 nM) were used during transformation experiments. Data from embryos grown on cyhalofop-containing media is shown in Figure 17.

9.7 – Selection.

[00364] After co-cultivation, the embryos were moved through a 2-step selection scheme after which transformed isolates were obtained. For selection, LSD Mod medium (LS Basal Medium, N6 vitamins, 1.5 mg/L 2,4-D, 0.5 g/L MES, 30.0 g/L sucrose, 6 mM L-proline, 1.0 mg/L $AgNO_3$, 250 mg/L cephotaxime, 2.5 g/L Gelrite, pH 5.7) was used along with one of two selection levels of either haloxyfop, cyhalofop, or imazethapyr. Throughout the selection phase, the embryos are cultured in the dark at 28° C. The embryos were first transferred to an initial level of selection (50-100 nM R-haloxyfop or 300 nM R-cyhalofop) for 14 days, then

moved up to a higher selection level (250-500 nM R-haloxyfop acid or 1.5 μM cyhalofop) at a rate of 5 embryos/plate. A subset of embryos were similarly stepped-up from 100 to 500 nM imazethapyr from Pursuit® DG as a positive control. Pursuit® is used as the chemical selection agent when the *AHAS* gene is used, based on U.S. Patent No. 5,731,180. Tissue was transferred at biweekly intervals on the same medium until embryogenic colonies were obtained. These colonies were maintained on the high selection pressure for the remainder of the culture period. The recovered transgenic colonies were bulked up by transferring to fresh selection medium at 2-week intervals for regeneration and further analysis.

[00365] 9.8. – Regeneration and seed production.

[00366] For regeneration, the cultures are transferred to 28 "induction" medium and 36 "regeneration" medium as described previously containing either 100 nM R-haloxyfop or 1.5 μM cyhalofop for differentiation of plantlets. When plantlets were established, they were transferred to SHGA tubes to allow for further growth and development of the shoot and roots as described previously. Controlled pollinations for seed production were conducted as described previously.

[00367] 9.9 - Event recovery and analysis particulars: whole plant screening of T_0 corn lineages containing *AAD-1 (v3)* and *AHAS* (pDAS1421).

[00368] Seventy-two *Agrobacterium*-transformed events were selected on various levels of R-haloxyfop acid and R-cyhalofop acid *in vitro*. Twenty-two callus samples were analyzed by Southern blot analysis for stable integration of *AAD-1 (v3)* into the genome as described previously. Ten single copy events, as indicated in Table 26, were chosen to be regenerated.

Table 26.

Corn event	*In vitro* Selection agent	Southern Copy # (callus)	Western Blot (AAD-1) T_0 Callus	Assessment of T_0 lineages resistant to 35 g ae/ha quizalofop	
	(nM)	AAD-1		Resistant	Sensitive
1421[21]-016	50 Haloxyfop	1	+	8	0
1421[22]-020	100 Haloxyfop	1	++	8	0
1421[22]-022	100 Haloxyfop	1	+	8	0
1421[22]-023	100 Haloxyfop	1	++	8	0
1421[3]-036	100 Haloxyfop	1	++	8	0
1421[4]-031	300 Cyhalofop	1	++	9	0
1421[4]-032	300 Cyhalofop	1	++	8	0
1421[4]-033	300 Cyhalofop	1	++	12	0
1421[4]-034	300 Cyhalofop	1	++	8	0
1421[4]-035	300 Cyhalofop	1	++	6	0
Events with more than 1 copy were not taken to the greenhouse					

[00370] A minimum six regenerated clonal lineages per event were moved to soil in the greenhouse and screened using a track sprayer as previously described to apply 35 g ae/ha quizalofop when 2-4 new, normal leaves had emerged (see section 8.3.3). Presence of AAD-1 protein on a Western blot correlated perfectly with herbicide resistance in the T_0 generation regardless of which AOPP herbicide was used for selection. There is no negative impact of the second HTC gene (*AHAS*) on the function of the *AAD-1 (v3)*.

Example 10 – Purification of AAD-1 (v1) for Antibody Creation and Biochemical Characterization

[00371] All operations during purification were carried out at 4° C. Frozen or fresh *E. coli* cells from approximately 1 L culture, grown and induced as in Example 3, were re-suspended in 200 ml of extraction buffer containing 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, and 2 ml of Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), and disrupted by ultrasonication treatment on ice using a Branson sonifier. The soluble extract was obtained by centrifugation in a GSA rotor (Sorvall) at 12,000 rpm (24,000g) for 20 minutes. The supernatant was then loaded onto a Mono Q ion exchange column (Pharmacia HR 10/10) equilibrated with 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, and the column was washed with same buffer for 10 CV (80 ml). The protein was eluted with 80 ml of a 0 to 0.25 M NaCl linear gradient in column buffer, while 2 ml fractions were collected. The fractions containing AAD-1 (v1) were pooled and concentrated using MWCO 30 kDa membrane centrifugation spin columns (Millipore). The sample was then further separated on a Superdex 200 size exclusion column (Pharmacia, XK 16/60) with buffer containing 20 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, and 1 mM DTT, pH 8.0 at a flow rate of 1 ml/min. Purification procedures were analyzed by SDS-PAGE, and protein concentration was determined by Bradford assay using bovine serum albumin as standard.

Example 11 – Recombinant AAD1 Purification and Antibody Production

[00372] Plasmid pDAB3203 containing the *AAD-1 (v1)* gene was maintained frozen at -80° C in TOP10F' cells (Invitrogen) as Dow Recombinant strain DR1878. For expression, plasmid DNA purified from TOP10F' cell culture using Promega's Wizard Kit (Fisher cat. #PR-A1460) was transformed into BL-21 Star (DE3) cells (Invitrogen cat. #C6010-03) following manufacturer's protocol. After transformation, 50 µL of the cells were plated onto LB S/S agar plates, and incubated overnight at 37° C. All colonies from the entire agar plate were

scraped into 100 mL LB in a 500 mL tribaffled flask and incubated at 37° C with 200 rpm shaking for 1 hr. Gene expression was then induced with 1 mM IPTG, and incubated for 4 hrs at 30° C with 200 rpm shaking. All 100 mL of culture was centrifuged at 4000 rpm for 20 min. The supernatant were then discarded, and the pellets were resuspended in 200 mL of extraction containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, and 2 mL of Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), and disrupted by ultrasonication treatment on ice using a Branson sonifier. The lysate was centrifuged at 24,000x g for 20 min to remove cell debris. The supernatant containing the AAD-1 protein was then subjected to purification protocol.

[00373] All AAD-1 (v1) purifications were conducted at 4° C as discussed in Example 10, unless otherwise stated. The cell lysate was loaded onto a Mono Q ion exchange column (Pharmacia Cat. #HR 10/10) equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA, followed by 80 mL of washing with the same buffer. The proteins were eluted with 80 mL of a 0 to 0.25 M NaCl linear gradient in column buffer, while 2 mL fractions were collected. The fractions containing AAD-1 were pooled and concentrated using MWCO 30 kDa membrane centrifugation spin columns (Millipore). The sample was then further separated on a Superdex 200 size exclusion column (Pharmacia, XK 16/60) with buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.15 M NaCl and 1 mM DTT. Protein concentration was determined by Bradford assay using bovine serum albumin as standard.

[00374] Five milligrams purified AAD-1 (v1) was delivered to Zymed Laboratories, Inc. (South San Francisco, CA) for rabbit polyclonal antibody production. The rabbit received 5 injections in the period of 5 weeks with each injection containing 0.5 mg of the purified protein suspended in 1 mL of Incomplete Freund's Adjuvant. Sera were tested in both ELISA and Western blotting experiments to confirm specificity and affinity before affinity purification and horseradish peroxidase (HRP) conjugation (Zymed Lab Inc).

[00375] 11.1 – Extracting AAD-1 (v3) from plant leaves.

[00376] Approximately 50 to 100 mg of leaf tissue was cut into small pieces and put into microfuge tubes containing 2 stainless steel beads (4.5 mm; Daisy Co., cat. #145462-000) and 300 µL plant extraction buffer (PBS containing 0.1 % Triton X-100 and 10 mM DTT). The tubes were shaken for 4 min with a bead beater at maximum speed followed by centrifugation for 10 min at 5,000x g. The supernatant containing the plant soluble proteins were analyzed for both total soluble protein (TSP) and AAD-1 (v3) concentrations.

[00377] 11.2 – Bradford assay.

[00378] Total soluble protein concentration from plant leaf tissues were determined by Bradford assay using bovine serum albumin (BSA) as standard. Five micro-liter of serially diluted BSA in PBS or plant extract was transferred to 96-well microtiter plate in triplicates. For standards, concentrations were ranged from 2000 to 15.6 µg/mL. The protein assay concentrate was first diluted 5 fold in PBS and 250 µL was added to each well and incubated at room temp for 5 min. Each optical density (OD) was measured at 595 nm using a microplate reader. The protein concentration of each sample was extrapolated from standard curve using the Softmax® Pro (ver. 4.0) (Molecular Devices).

[00379] 11.3 – Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA).

[00380] The assay was conducted at room temperature unless otherwise stated. One hundred micro-liter of purified anti-AAD-1 antibody (0.5 µg/mL) was coated on 96-well microtiter well and incubated at 4° C for 16 hours. The plate was washed four times with washing buffer (100 mM phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) containing 0.05% Tween 20) using a plate washer, followed by blocking with 4% skim milk dissolved in PBS for 1 hour. After washing, 100 µL standard AAD-1 of known concentrations or plant extract (see previous section) was incubated in the wells. For standard curve, purified AAD-1 concentrations ranged from 100 to 1.6 ng/mL in triplicates. Plant extracts were diluted 5, 10, 20, and 40 fold in PBS and analyzed in duplicates. After 1 hour incubation, the plate was washed as above. One hundred micro-liter anti-AAD-1 antibody-HRP conjugate (0.25 ug/mL) was incubated in each well for 1 hour before washing. One hundred micro-liter HRP substrate, 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (Pierce), was incubated in each well for 10 minutes before the reaction was stopped by adding 100 µL 0.4N H_2SO_4. The OD of each well was measured using a microplate reader at 450 nm. To determine the concentrations of AAD-1 in plant extract, the OD value of duplicates were averaged and extrapolated from the standard curve using the Softmax® Pro ver. 4.0 (Molecular Devices).

[00381] For comparison, each sample was normalized with its TSP concentration and percent expression to TSP was calculated.

[00382] 11.4 – Western blotting analysis.

[00383] Plant extracts or AAD-1 standards (5 and 0.5 µg/mL) were incubated with Laemmli sample buffer at 95° C for 10 minutes and electrophoretically separated in 8-16% Tris-Glycine Precast gel. Proteins were then electro-transferred onto nitrocellulose membrane

using standard protocol. After blocking in 4% skim milk in PBS, AAD-1 protein was detected by anti-AAD1 antiserum followed by goat anti-rabbit/HRP conjugates. The detected protein was visualized by chemiluminescence substrate ECL Western Analysis Reagent (Amersham cat. #RPN 21058).

Example 12 – Tobacco Transformation

[0384] 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. Kentucky 160) 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 pDAB721, *AAD-1 (v3)* + *PAT*), grown overnight in a flask on a shaker set at 250 rpm at 28° C, were 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 bacteria, 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.

[00185] 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 was removed. Plants were grown under ordinary warm greenhouse conditions (30° C, 16 hour day, 8 hour night, minimum natural + supplemental light = 500 $\mu E/m^2s^1$).

[00186] Prior to propagation, T_0 plants were sampled for DNA analysis to determine the insert copy number. The *PAT* gene which was molecularly linked to *AAD-1 (v3)* 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 florometer (BioTek) with known standards to obtain the concentration in ng/µl.

[00187] The DNA samples were diluted to 9 ng/µl, then denatured by incubation in a thermocycler at 95° C for 10 minutes. Signal Probe mix was then prepared using the provided oligo mix and MgCl2 (Third Wave Technologies). An aliquot of 7.5 µl was 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 then incubated at 63° C for 1.5 hours and read on the florometer (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 (Table 27).

Table 27. Tobacco T0 events transformed with pDAB721 (*AAD-1(v3) + PAT*).				
Event	PAT copy number (Southern)	Coding Region PCR for AAD-1	ELISA (µg AAD-1 / ml plant extract)	Relative tolerance T0 spray with 2,4-D *
721(1)1	1	+	0.9	Medium
721(2)1	nd	nd	0.6	Medium
721(2)2	5	+	0.3	Low
721(2)3	3	+	2.6	Medium
721(2)5	5	+	4.1	Variable
721(2)6	3	+	0.5	Variable
721(2)8	5	+	0.3	High
721(2)11	3	+	n/a	High
721(2)12	3	+	4.1	Medium
721(2)13	2	+	0.5	Medium
721(2)14	5	+	0.2	High
721(2)16	4	+	3.2	Medium
721(2)17	3	+	nd	High
721(2)18	5	+	nd	High
721(2)19	>10	+	nd	Low
721(2)20	5	+	nd	Medium
721(2)21	4	+	nd	High
721(2)22	7	+	nd	Medium
721(2)23	>10	+	nd	Variable
721(3)003	3	+	nd	Variable
721(3)008	2	+	nd	High
721(3)012	1	+	nd	High
721(3)4	2	+	0.5	High
721(3)5	9	+	3.3	High
721(3)6	4	+	7.1	Variable
721(3)9	2	+	1	Low
721(3)10	3	+	0.6	High
721(3)11	7	+	6	Low
721(3)13	4	+	0.1	High
721(3)014	2	+	0.1	Medium

nd = not done

Legend:	Relative tolerance*	Injury at 3200 g ae/ha 2,4-D (14DAT)
	Low	>50% injury
	Medium	20-50% injury
	High	<20% injury
	Variable	inconsistent

[00588] Copy number estimations were confirmed by Southern Analysis on several events. Southern blot analysis was performed with total DNA obtained from Qiagen DNeasy kit. A total of 2 µgs of DNA was subjected to an overnight digest of NsiI and also HindIII for pDAB721 to obtain integration data. After the overnight digestion an aliquot of ~100 ngs

was run on a 1% gel to ensure complete digestion. After this assurance the samples were processed using same protocol as in Example 6 section 11.

[00389] All events were also assayed for the presence of the *AAD-1 (v3)* 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 (Mirus TAKRR001A). Primers for the Coding Region PCR AAD-1 were (RdpAcodF ATGGCTCA TGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:27) and (RdpAcodR CGGGCAGGCCTAACTCCACC AA) (SEQ ID NO:28). 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. Four to 12 clonal lineages from each of 30 PCR positive events were regenerated and moved to the greenhouse.

[00390] A representative plant from each of 19 events was assayed for AAD-1 (v3) expression by ELISA methods previously described. All events assayed showed detectable levels of AAD-1 (v3) (Table 27). Protein expression varied across events.

[00391] T_0 plants from each of the 30 events were challenged with a wide range of 2,4-D sprayed on plants that were 3-4 inches tall. Spray applications were made as previously described using a track sprayer at a spray volume of 187 L/ha. 2,4-D dimethylamine salt (Riverside Corp) was applied at 0, 50, 200, 800, or 3200 g ae/ha to representative clones from each event mixed in deionized water. Each treatment was replicated 1-3 times. Injury ratings were recorded 3 and 14 DAT. Every event tested was more tolerant to 2,4-D than the untransformed control line KY160. In several events, some initial auxinic herbicide-related epinasty occurred at doses of 800 g ae/ha or less. Some events were uninjured at this rate (equivalent to 1.5X field rate). All events suffered some level temporary auxinic damage 3 DAT when treated with 3200 g ae/ha. Some leaf burning also occurred at this high rate due to the acidity of the spray solution. Future trials at high 2,4-D rates were buffered. Response of T_0 plants treated with 3200 g ae/ha 2,4-D (~6X field rate) was used to discern relative tolerance of each event into "low" (>50% injury 14 DAT), "medium" (20-50% injury), "high" (<20% injury). Some events were inconsistent in response among replicates and were deemed "variable" (Table 27).

[00392] Verification of high 2,4-D tolerance.

[00393] Two to four T_0 individuals surviving high rates of 2,4-D were saved from each event and allowed to self fertilize in the greenhouse to give rise to T_1 seed. Two *AAD-1 (v3)* tobacco lines (event 721(2)-013.010 and 721(3)-008.005) were chosen from the T_0 generation. The T_1 seed was stratified, and sown into selection trays much like that of *Arabidopsis* (Example 6.4), followed by selective removal of untransformed nulls in this segregating population with 280 g ai/ha glufosinate (PAT selection). Survivors were transferred to individual 3-inch pots in the greenhouse. These lines provided medium and high levels of robustness to 2,4-D in the T_0 generation. Improved consistency of response is anticipated in T_1 plants not having come directly from tissue culture. These plants were compared against wildtype KY 160 tobacco. All plants were sprayed with the use of a track sprayer set at 187L/ha. The plants were sprayed from a range of 70-4480 g ae/ha 2,4-D dimethylamine salt (DMA), R-Dichlorprop, and a 50/50 mix of the two herbicides. All applications were formulated in 200mM Hepes buffer (pH 7.5). Each treatment was replicated 4 times. Plants were evaluated at 3 and 14 days after treatment. Plants were assigned injury rating with respect to stunting, chlorosis, and necrosis. The T_1 generation is segregating, so some variable response is expected due to difference in zygosity. (Table 28). No injury was observed at rates below 1X field rates (560 g ae/ha) for 2,4-D or R-dichlorprop in either event. Very little injury was observed even up to 8 times field rates (4480 g ae/ha) and this was exhibited as stunting, not auxinic herbicide damage. These results indicated commercial level tolerance can be provided by *AAD-1 (v3)*, even in a very auxin-sensitive dicot crop like tobacco. These results also show resistance can be imparted to both chiral (2,4-dichlorophenoxypropionic acid) and achiral (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) phenoxy auxin herbicides alone or in tank mix combination.

Table 28. Segregating AAD-1 T_1 tobacco plants' response to phenoxy auxin herbicides.			
Herbicide	KY160 – Wildtype	721(2)013.010 (medium tolerance in T_0 generation)	721(3)008.005 (high tolerance in T_0 generation)
	Average % Injury of Replicates 14 DAT		
560 g ae/ha 2,4-D DMA	75	5	0
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	80	5	2
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	90	5	0
4480 g ae/ha 2,4-D DMA	95	5	5
560 g ae/ha R-dichlorprop	70	5	0
1120 g ae/ha R-dichlorprop	75	5	0
2240 g ae/ha R-dichlorprop	88	5	0
4480 g ae/ha R-dichlorprop	95	10	5
560 g ae/ha 2,4-D DMA/R-dichlorprop	80	5	5
1120 g ae/ha 2,4-D DMA/R-dichlorprop	80	10	10
2240 g ae/ha 2,4-D DMA/R-dichlorprop	95	15	15
4480 g ae/ha 2,4-D DMA/R-dichlorprop	95	15	15

[0039] A 100 plant progeny test was also conducted on each of the two *AAD-1_(v3)* lines (events 721(2)-013.010 and 721(3)-008.005). The seeds were stratified, sown, and transplanted with respect to the procedure above except null plants were not removed by Liberty selection. All plants were then sprayed with 560 g ae/ha 2,4-D DMA as previously described. After 14 DAT, resistant and sensitive plants were counted. Both event '013' and '008' segregated as a single locus, dominant Mendelian trait (3R:1S) as determined by Chi square analysis. AAD-1 is heritable as a robust phenoxy auxin resistance gene in multiple species.

[0039] Field level tolerance will be demonstrated by planting T_1 or T_2 seed in the greenhouse, selectively removing the null plants by Liberty selection as previously described, and rearing individual seedlings in 72-well transplant flats (Hummert International) in Metro 360 media according to growing conditions indicated above. Individual plants will be transplanted into the field plots using an industrial vegetable planter. Drip or overhead irrigation will be used to keep plants growing vigorously. Once plants reach 6-12 inches in height, tobacco plants will be sprayed with a broad range of phenoxy auxins and rated as shown above. Environmental stresses are more significant under field conditions; however, based on previous experience with *AAD-1 (v3)*-transformed corn, robust translation of resistance from the greenhouse to the field is expected.

Example 13 – Soybean Transformation

[00396] Soybean improvement via gene transfer techniques has been accomplished for such traits as herbicide tolerance (Padgette *et al.*, 1995), amino acid modification (Falco *et al.*, 1995), and insect resistance (Parrott *et al.*, 1994). Introduction of foreign traits into crop species requires methods that will allow for routine production of transgenic lines using selectable marker sequences, containing simple inserts. The transgenes should be inherited as a single functional locus in order to simplify breeding. Delivery of foreign genes into cultivated soybean by microprojectile bombardment of zygotic embryo axes (McCabe *et al.*, 1988) or somatic embryogenic cultures (Finer and McMullen, 1991), and *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary explants (Hinchee *et al.*, 1988) or zygotic embryos (Chee *et al.*, 1989) have been reported.

[00397] Transformants derived from *Agrobacterium*-mediated transformations tend to possess simple inserts with low copy number (Birch, 1991). There are benefits and disadvantages associated with each of the three target tissues investigated for gene transfer into soybean, zygotic embryonic axis (Chee *et al.*, 1989; McCabe *et al.*, 1988), cotyledon (Hinchee *et al.*, 1988) and somatic embryogenic cultures (Finer and McMullen, 1991). The latter have been extensively investigated as a target tissue for direct gene transfer. Embryogenic cultures tend to be quite prolific and can be maintained over a prolonged period. However, sterility and chromosomal aberrations of the primary transformants have been associated with age of the embryogenic suspensions (Singh *et al.*, 1998) and thus continuous initiation of new cultures appears to be necessary for soybean transformation systems utilizing this tissue. This system needs a high level of 2,4-D, 40 mg/L concentration, to initiate the embryogenic callus and this poses a fundamental problem in using the *AAD-1 (v3)* gene since the transformed locus could not be developed further with 2,4-D in the medium. So, the meristem based transformation is ideal for the development of 2,4-D resistant plant using *AAD-1 (v3)*.

[00398] 13.1 – Transformation Method 1: cotyledonary node transformation of soybean mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

[00399] The first reports of soybean transformation targeted meristematic cells in the cotyledonary node region (Hinchee *et al.*, 1988) and shoot multiplication from apical meristems (McCabe *et al.*, 1988). In the *A. tumefaciens*-based cotyledonary node method, explant preparation and culture media composition stimulate proliferation of auxiliary meristems in the node (Hinchee *et al.*, 1988). It remains unclear whether a truly

dedifferentiated, but totipotent, callus culture is initiated by those treatments. The recovery of multiple clones of a transformation event from a single explant and the infrequent recovery of chimeric plants (Clemente *et al.*, 2000; Olhoft *et al.*, 2003) indicates a single cell origin followed by multiplication of the transgenic cell to produce either a proliferating transgenic meristem culture or a uniformly transformed shoot that undergoes further shoot multiplication. The soybean shoot multiplication method, originally based on microprojectile bombardment (McCabe *et al.*, 1988) and, more recently, adapted for *Agrobacterium*-mediated transformation (Martinell *et al.*, 2002), apparently does not undergo the same level or type of dedifferentiation as the cotyledonary node method because the system is based on successful identification of germ line chimeras. The range of genotypes that have been transformed via the *Agrobacterium*-based cotyledonary node method is steadily growing (Olhoft and Somers, 2001). This *de novo* meristem and shoot multiplication method is less limited to specific genotypes. Also, this is a non 2,4-D based protocol which would be ideal for 2,4-D selection system. Thus, the cotyledonary node method may be the method of choice to develop 2,4-D resistant soybean cultivars. Though this method was described as early as 1988 (Hinchee *et al.*, 1988), only very recently has it been optimized for routine high frequency transformation of several soybean genotypes (Zhang *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2004).

[00400] 13.1.1 – *Agrobacterium* preparation. The plasmid, pDAB721, contains the *AAD-1 (v3)* gene under the control of the *Arabidopsis* Ubi10 promoter. This plasmid also carries the *PAT* gene under the control of rice actin promoter coding for an enzyme that degrades glufosinate which can be used as a selection agent for transformants. This vector can be used in the transformation experiment described below. The construct pDAB721 was mobilized into the *Agrobacterium* strain EHA101S by electroporation.

[00401] *Agrobacterium* cultures harboring pDAB721 used in the transformations can be grown in YEP medium (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract and 5 g/L NaCl, pH 7.0). *Agrobacterium* cultures are pelleted at low speed and resuspended in SCM liquid medium (see below) to OD660 of 0.6 for use in the inoculations.

[00402] 13.1.2 – Plant transformation. Seeds of "Thorne," "Williams82," or "NE3001," public genotypes of soybean, can be disinfected by a 20-minute wash in 20% (v/v) commercial bleach (NaClO) amended with 2 drops of Liqui-Nox®. The seeds should be rinsed five times with sterile water on hormone-free SHGA medium and allowed to

germinate for 5 days at 24° C, with an 18/6 hour light/dark regime. B5 medium consists of macro and micro nutrients and vitamins described by Gamborg *et al.* (1968) (Sigma, cat. #G 5893, St. Louis). All media are solidified with 0.8% (w/v) washed agar (Sigma cat. #A 8678). Alternatively, certain genotypes of soybean can undergo a dry surface sterilization procedure using chlorine gas (Cl_2) whereby mature seeds are placed into 100 x 25 mm Petri plates in a single layer using about 130 seeds per plate. Approximately 3-4 plates are placed into a desiccator within a fume hood in such a way that all the plates are half open and that there is enough space for a 250 ml beaker in the middle of the desiccator. The beaker is filled with 95 ml of commercial bleach, to which 5 ml of concentrated (12N) HCl is added dropwise along the side of the beaker. The desiccator is immediately closed and allowed to stand for at least 16 hours in a fume hood. Following sterilization, the plates are closed, then brought to a laminar flow hood and left open for about 30 minutes to remove any excessive Cl_2 gas. Seeds are then germinated as described previously. The dry surface sterilized seeds will remain sterile at room temperature for about 2 weeks. Explants are prepared for inoculation as previously described (Hinchee *et al.*, 1988).

[00403] Explants should be inoculated for 30 minutes. Cocultivation and *Agrobacterium* re-suspension medium consists of B5 medium supplemented with 1 mg/L BAP, 1 mg/L GA3, 3% (w/v) sucrose, 20 mM MES(2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid), 400 mg/L L-cysteine (Olhoft and Somers, 2001) pH 5.7, 0.99 mM dithiothreitol (DTT), and 200 μM acetosyringone (AS). Explants are cocultivated for 5 days at 25° C. Following cocultivation, explants were washed in the cocultivation medium containing 100 mg/L timentin and 200 mg/L cefotaxime, without MES and AS.

[00404] Explants are to be placed on shoot induction medium and transferred every 14 days for a total of 28 days prior to herbicide selection. The shoot induction medium consists of full-strength B5 medium supplemented with 1.7 mg/L BAP, 100 mg/L timentin , 200 mg/L cefotaxime pH 5.7 and 3% (w/v) sucrose. Cotyledons should be placed adaxial side up with the cotyledonary nodal region flush to the medium, amended with increasing levels of Basta (2, 5, 6 then 7 mg/L glufosinate ammonium) or sublethal levels of 2,4-D ranging from 10 mg to 400 mg/L every 2 weeks for a total of 8 weeks.

[00405] Differentiating explants are subsequently transferred to shoot elongation medium for an additional 4 to 10 weeks under the same glufosinate selection or under decreased 2,4-D selection pressure ranging from10 mg to 100 mg/L. The elongation medium consisted of B5

medium (Sigma cat. #M0404) amended with 1 mg/L zeatin riboside, 0.1 mg/L IAA (indole-3-acetic acid), 0.5 mg/L GA3, 50 mg/L glutamine, 50 mg/L asparagine, and 3% (w/v) sucrose, pH 5.8. Elongated shoots should be rooted, without further selection, on half-strength MS/B5 medium with full-strength vitamins plus 0.5 mg/L NAA (α-naphthaleneacetic acid) or 0.1 mg/L IAA and 2% (w/v) sucrose.

[00406] The antibiotics, timentin and cefotaxime, are maintained within the media throughout selection. Cultures are transferred to fresh medium every 2 weeks. Plantlets are acclimated for 1 to 2 weeks prior to transfer to the greenhouse.

[00407] 13.1.3 – Progeny evaluation. T_0 plants will be allowed to self fertilize in the greenhouse to give rise to T_1 seed. T_1 plants (and to the extent enough T_0 plant clones are produced) will be sprayed with a range of herbicide doses to determine the level of herbicide protection afforded by *AAD-1 (v3)* and *PAT* genes in transgenic soybean. Rates of 2,4-D used on T_0 plants will typically use one or two selective rates in the range of 100-400 g ae/ha. T_1 seed will be treated with a wider herbicide dose ranging from 50-3200 g ae/ha 2,4-D. Likewise, T_0 and T_1 plants can be screened for glufosinate resistance by postemergence treatment with 200-800 and 50-3200 g ae/ha glufosinate, respectively. Analysis of protein expression will occur as described in Example 9 for *Arabidopsis* and corn. Determination of the inheritance of *AAD-1 (v3)* will be made using T_1 and T_2 progeny segregation with respect to herbicide tolerance.

[00408] 13.2 – Transformation Method 2: "No-shake" *Agrobacterium* mediated transformation of non-regenerable soybean suspension cells.

[00409] The DAS Soybean cell suspensions were cultured on a 3d cycle with 10 ml of settled suspension volume transferred to 115 ml of fresh liquid medium. Settled cell volume was determined by allowing the cell suspension to settle for 2 min in the 125-mL flask after vigorous swirling and then drawing cells from the bottom of the flask with a wide bore 10 ml pipette. The flasks were then transferred to orbital shakers at 140 rpm.

[00410] Aliquots of 4 ml of the suspension cells at 0.72 OD^{600} was transferred along with 200 μM acetosyringone (AS) onto a 100x25 sterile Petri plate. EHA105 *Agrobacterium* suspension at a density of 1.2 OD^{650} in a 100 μL volume was added and mixed well. The *Agrobacterium* and suspension cell mixture was swirled well and the plate was transferred to dark growth chamber where the temperature was maintained at 25° C.

[0411] 13.2.1 – Selection of soybean suspension cells and isolation of transformed colonies. After 4 days of co-cultivation the plate was swirled again to mix the suspension well and a 1.5 ml aliquot was transferred to the selection medium and spread on the gel medium on a 100x15 ml Petri-plate. The selection medium consisted of full-strength B5 medium supplemented with 1.7 mg/L BAP, 100 mg/L timentin, 200 mg/L cefotaxime pH 5.7 and 3% (w/v) sucrose and the medium was amended with glufosinate ammonium at 5 mg/L level. After a 10 min drying in the hood the plates were incubated for 4 weeks in dark at 28° C. Colonies appeared in selection and a total of 11 colonies were transferred to fresh medium from 3 different experiments and maintained for 3-4 months. All the 11 resistant colonies produced calli that were growing on the 5 mg/L glufosinate containing selection medium. The non-transformed suspension cells were sensitive when plated on to 0.5 mg/l glufosinate ammonium medium. However, the transformed colonies were resistant to 5x concentration of glufosinate ammonium and were maintained for up to 4 months.

[0412] Callus events were sampled for analyses when they reached 2 to 3 cm in diameter. At least two of colony isolates, one each from two different experiments, were analyzed for AAD1 protein expression. The ELISA and Western analysis carried out on these two isolates showed positive expression of AAD1 proteins. Both ELISA (Table 29) and Western Blotting (Figure 18) analysis on two separate soybean calli transformed with *AAD-1 (v3)* gene indicated that the callus cells are expressing AAD-1 (v3) protein. The sandwich ELISA detected 0.0318% and 0.0102% total soluble protein of AAD-1 (v3) in two different callus tissue samples. Due to the sensitivity and cross reactivity of the antiserum, multiple bands were observed in the western blot. However, AAD-1 (v3) specific band was observed in both callus samples but not in the wild type (negative) tissue. Coding region PCR analyses showed the expected size products of the AAD1 and the PAT coding regions in these colonies indicating that they were transformed.

Table 29. PCR and ELISA data for transgenic soybean events.

Event	AAD-1 Coding region PCR	PAT Coding region PCR	T SP (µg/mL)	AAD-1 (ng/mL)	% Expression
1-1	+	+	1995.13	633.89	0.0318%
2-1	+	+	2018.91	205.92	0.0102%
Negative Control	-	-	2074.63	-1.22	-0.0001%

[0013] 13.3 – Transformation Method 3: aerosol-beam mediated transformation of embryogenic soybean callus tissue.

[0014] Culture of embryogenic soybean callus tissue and subsequent beaming were as described in U.S. Patent No. 6,809,232 (Held *et al.*).

[0015] Embryogenic calluses of several Stine elite varieties, including 96E750, 96E94, 97E986, 96E144 and 96E692, were separately collected into the center of plates of B1-30 3Co5My or B1-30 3Co5My0.25PA0.5K three days after transfer to fresh medium. The tissue was then beamed with pDAB3295 using linearized DNA at a concentration of approximately 0.2 μg/ml. After beaming, the embryogenic callus was transferred to fresh B1-30 3Co5My or B1-30 3Co5My0.25PA0.5K for one passage of a month. The tissue was then transferred to selective medium containing 1 mg/l bialaphos. With bialaphos, selection typically was maintained at 1 mg/l for the first two one-month passages and then increased to 2 mg/l for the following three to seven months. Transgenic events were identified when callus tissue generated by transformation experiments began to organize and develop into embryogenic structures while still on selective media containing 2,4-D plus bialaphos. Once identified, the maturing structures were regenerated into plants according to the following protocol: Embryogenic structures were transferred off B1-30 3Co5My or B1-30 3/co5My0.25PA0.5K to B3 medium. After 3 to 4 weeks' growth on B3 medium, individual structures were transferred to fresh medium. After another 3 to 4 weeks, maturing embryos were transferred to B5G medium and placed in the light. Embryos that had elongated and produced roots were transferred to tubes containing 1/2 B5G medium where they continued development into plantlets; and these plantlets were removed from the tubes and placed into pots.

[0016] Variations of media referred to in Table 30 were tested, *e.g.*, B1-30 3Co5My, which was made by adding 3% coconut water and 5 gm/l myo-inositol to B1-30. Other variations included: B1-30 3Co5My0.25 PA0.5K which contained B1-30 basal medium plus 3% coconut water, 5 gm/l myo-inositol, 0.25 gm/l phytic acid, and 0.5 gm/l additional KH_2PO_4 and 1/2 B5G which contained all ingredients of B5G medium at half strength.

Table 30. Growth Media for Soybean			
	Ingredients in 1 Liter		
	B1-30	B3	B5G
Ms Salts	4.43 g	4.43 g	
B5 Salts			3.19 g
NaEDTA	37.3 mg	37.3 mg	37.3 mg
2,4-D	30 mg		
Activated charcoal		5 g	
Phytagar	8g	8g	
Gelrite			2g
pH	5.8	5.8	5.8

Example 14 – *AAD-1 (v3)* Enablement in Cotton

[00417] 14.1 – Cotton transformation protocol.

[00418] Cotton seeds (Co310 genotype) are surface-sterilized in 95% ethanol for 1 minute, rinsed, sterilized with 50% commercial bleach for twenty minutes, and then rinsed 3 times with sterile distilled water before being germinated on G-media (Table 31) in Magenta GA-7 vessels and maintained under high light intensity of 40-60 μE/m2, with the photoperiod set at 16 hours of light and 8 hours dark at 28° C.

[00419] Cotyledon segments (~5mm) square are isolated from 7-10 day old seedlings into liquid M liquid media (Table 31) in Petri plates (Nunc, item #0875728). Cut segments are treated with an *Agrobacterium* solution (for 30 minutes) then transferred to semi-solid M-media (Table 31) and undergo co-cultivation for 2-3 days. Following co-cultivation, segments are transferred to MG media (Table 31). Carbenicillin is the antibiotic used to kill the *Agrobacterium* and glufosinate-ammonium is the selection agent that would allow growth of only those cells that contain the transferred gene.

[00420] *Agrobacterium* preparation. Inoculate 35ml of Y media (Table 31) (containing streptomycin (100 mg/ml stock) and erythromycin (100 mg/ml stock)), with one loop of bacteria to grow overnight in the dark at 28° C, while shaking at 150 rpm. The next day, pour the *Agrobacterium* solution into a sterile oakridge tube (Nalge-Nunc, 3139-0050), and centrifuge for in Beckman J2-21 at 8,000 rpm for 5 minutes. Pour off the supernatant and resuspend the pellet in 25 ml of M liquid (Table 31) and vortex. Place an aliquot into a glass culture tube (Fisher, 14-961-27) for Klett reading (Klett-Summerson, model 800-3). Dilute the new suspension using M liquid media to a Klett-meter reading of 10^8 colony forming units per mL with a total volume of 40 mL

[0421] After three weeks, callus from the cotyledon segments is isolated and transferred to fresh MG media. The callus is transferred for an additional 3 weeks on MG media. Callus is then transferred to CG-media (Table 31), and transferred again to fresh selection medium after three weeks. After another three weeks the callus tissue is transferred to D media (Table 31) lacking plant growth regulators for embryogenic callus induction. After 4-8 weeks on this media, embryogenic callus is formed, and can be distinguished from the non-embryogenic callus by its yellowish-white color and granular cells. Embryos start to regenerate soon after and are distinct green in color.

[0422] Larger, well-developed embryos are isolated and transferred to DK media (Table 31) for embryo development. After 3 weeks (or when the embryos have developed), germinated embryos are transferred to fresh media for shoot and root development. After 4-8 weeks, any well-developed plants are transferred into soil and grown to maturity. Following a couple of months, the plant has grown to a point that it can be sprayed to determine if it has resistance to 2,4-D.

Table 31. Media for Cotton Transformation

Ingredients in 1 liter	G	M liquid	M	MG	CG	D	DK	Y
LS Salts (5X)	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml			
Glucose		30 grams	30 grams	30 grams	30 grams	20 grams		
modified B5 vit (1000x)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	10 ml	1 ml	
kinetin (1mM)		1ml	1 ml	1 ml	4.6 ml		0.5ml	
2,4-D (1mM)		1ml	1 ml	1 ml				
agar	8 grams		8 grams	8 grams	8 grams	8 grams	8 grams	
DKW salts (D190)						1 package	1 package	
MYO-Inositol (100x)						1 ml	10 ml	
Sucrose 3%	30 grams						30 grams	10 grams
NAA								
Carbenicillin (250 mg/ml)				2 ml	0.4 ml			
GLA (10mg/ml)				0.5 ml	0.3 ml			
Peptone								10 grams
Yeast Extract								10 grams
NaCl								5 grams

[00423] 14.2 – Experiment specifics.

[00424] For this experiment 500 cotyledon segments were treated with pDAB721. Of the 500 segments treated, 475 had callus isolated while on selection (95% transformation frequency). The callus was selected on glufosinate-ammonium, due to the inclusion of the *PAT* gene in the construct, since there was already a selection scheme developed. Callus line analysis in the form of PCR and Invader were initiated to determine the insertion patterns and to be sure the gene was present at the callus stage, then callus lines that were embryogenic were sent for Western analysis.

[00425] 14.3 – Callus analysis results.

[00426] The object of the analysis is to eliminate any lines that do not have the complete PTU, show no expression or that have high copy number, so those lines are not regenerated. Of the 475 pDAB721 transformed callus lines, 306 were sent for PCR analysis and Invader assay (Table 32). Very few lines were PCR negative. The Invader results are not complete at this time, because some samples had low DNA amounts when extracted, and these have been resubmitted. However, the current Invader data shows a few of the lines submitted have high copy number (copy number of >2) (Table 32). Due to the large number of lines that passed analysis, it was necessary to decrease the number of embryogenic callus lines being maintained due to the volume. Ninety lines have been sent for Western analysis, and eight of those were negative. The western analysis showed high expression from the majority of the lines (Table 32). Eighty-two embryogenic callus lines are being maintained for plant regeneration based on analysis results (and results pending).

Table 32. Analysis of cotton callus

Line	Copy #	PTU	Western	Line	Copy #	PTU	Western
1	2	pos	***	43	1	pos	*****
2	1	pos	***	44	low DNA	pos	*****
3	1	pos	***	45	1	pos	*****
4	2	pos	***	46	2	pos	*****
5	1	pos	***	47	1	pos	***
6	1	pos	neg	48	1	pos	***
7	1	pos	****	49	3	faint pos	neg
8	1	pos	*****	50	1	pos	****
9	2	pos	*	51	4	pos	neg
10	1	pos	*	52	2	pos	****
11	1	pos	*****	53	1	pos	***
12	1	pos	*	54	1	pos	****

Table 32. Analysis of cotton callus

Line	Copy #	PTU	Western
13	1	pos	*
14	1	pos	**
15	1	pos	****
16	1	pos	*****
17	1	pos	*
18	1	pos	***
19	1	pos	**
20	1	pos	*****
21	2	pos	*****
22	1	pos	*****
23	1	pos	*****
24	4	pos	* or neg
25	1	pos	****
26	1	pos	****
27	low DNA	pos	*****
28	low DNA	pos	**
29	low DNA	pos	*****
30	17	pos	*
31	low DNA	pos	*****
32	low DNA	pos	*****
33	low DNA	pos	****
34	low DNA	faint pos	*****
35	low DNA	pos	****
36	low DNA	pos	neg
37	low DNA	pos	****
38	low DNA	neg	*****
39	1	pos	****
40	low DNA	pos	*
41	low DNA	pos	*
42	low DNA	pos	**
standard	AAD1	5ug/ml	*****
standard	AAD1	0.5ug/ml	**

Line	Copy #	PTU	Western
55	1	pos	neg
56	5	pos	*
57	2	faint pos	neg
58	8	pos	****
59	2	pos	****
60	5	pos	*****
61	1	pos	**
62	1	pos	**
63	1	pos	***
64	1	pos	***
65	3	pos	****
66	5	pos	*
67	6	pos	*
68	Low DNA	pos	neg
69	Low DNA	pos	****
70	low DNA	pos	**
71	low DNA	faint pos	**
72	low DNA	pos	****
73	low DNA	neg	***
74	low DNA	faint pos	***
75	Low DNA	pos	***
76	Low DNA	pos	neg
77	low DNA	faint pos	****
78	low DNA	pos	****
79	1	pos	**
80	low DNA	pos	***
81	low DNA	pos	***
82	low DNA	pos	***
83	low DNA	neg	****
84	low DNA	pos	***
85	low DNA	pos	**
86	low DNA	pos	*

[00427] 14.4 – Plant regeneration.

[00428] Two *AAD-1 (v3)* cotton lines have produced plants according to the above protocol that have been sent to the greenhouse. To demonstrate the *AAD-1 (v3)* gene provides resistance to 2,4-D in cotton, both the *AAD-1 (v3)* cotton plant and wild-type cotton plants were sprayed with a track sprayer set at 187 L/ha. The plants were sprayed at 560 g ae/ha 2,4-DMA formulated in 200 mM Hepes buffer (pH 7.5). The plants were evaluated at 3, 7, and 14 days after treatment. Plants were assigned injury ratings with respect to stunting,

chlorosis, and necrosis. Plants assigned an injury rating of 90% or above are considered dead. Three days after treatment (DAT) the wild-type plant began showing epinasy and received a rating of 15%; in contrast, the *AAD-1 (v3)* plant showed 0% injury. By 7 DAT epinasy continued on the wild-type and the new growth shoots began turning brown. It received a rating of 50% at this time. At 14 DAT the *AAD-1 (v3)* plant was still uninjured, whereas the wild-type was severely stunted, and the new growth areas were brown and shriveled. Thus, the wild-type received a rating of 90% at 14 DAT.

[00429] This study demonstrates that the *AAD-1 (v3)* gene in cotton provides substantial tolerance to 2,4-D up to at least 560 g ae/ha.

Example 15 – *Agrobacterium* Transformation of Other Crops

[00430] 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 trans-formation of rye, *see, e.g.*, Popelka and Altpeter (2003). For *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean, *see, e.g.*, Hinchee *et al.*, 1988. 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.

[00431] The Latin names for these and other plants are given below. It should be clear that these and other (non-*Agrobacterium*) transformation techniques can be used to transform *AAD-1 (v3)*, for example, into these and other plants, including but not limited to Maize (*Gramineae Zea mays*), Wheat (*Pooideae Triticum* spp.), Rice (*Gramineae Oryza* spp. and *Zizania* spp.), Barley (*Pooideae Hordeum* spp.), Cotton (*Abroma Dicotyledoneae Abroma augusta*, and *Malvaceae Gossypium* spp.), Soybean (*Soya Leguminosae Glycine max*), Sugar beet (*Chenopodiaceae Beta vulgaris altissima*), Sugar cane (*Arenga pinnata*), Tomato (*Solanaceae Lycopersicon esculentum* and other spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* and other spp., and *Cyphomandra betacea*), Potato, Sweet potato, Rye (*Pooideae Secale* spp.), Peppers (*Solanaceae Capsicum annuum, sinense*, and *frutescens*), Lettuce (*Compositae Lactuca sativa, perennis*, and *pulchella*), Cabbage, Celery (*Umbelliferae Apium graveolens*), Eggplant (*Solanaceae Solanum melongena*), Sorghum (all *Sorghum* species), Alfalfa (*Leguminosae Medicago sativum*), Carrot (*Umbelliferae Daucus carota sativa*), Beans

(*Leguminosae Phaseolus* spp. and other genera), Oats (*Avena Sativa* and *Strigosa*), Peas (*Leguminosae Pisum, Vigna*, and *Tetragonolobus* spp.), Sunflower (*Compositae Helianthus annuus*), Squash (*Dicotyledoneae Cucurbita* spp.), Cucumber (*Dicotyledoneae genera*), Tobacco (*Solanaceae Nicotiana* spp.), *Arabidopsis* (*Cruciferae Arabidopsis thaliana*), Turfgrass (*Lolium, Agrostis*, and other families), and Clover (*Leguminosae*). Such plants, with *AAD-1 (v3)* genes, for example, are included in the subject invention.

Example 16 – Stacking *AAD-1 (v3)* with AHAS Herbicide Resistance Gene

[0432] Stacking *AAD-1 (v3)* with an AHAS herbicide resistance gene is described in Example 7.9.

Example 17 – Further Evidence of Surprising Results: *AAD-1 vs. AAD-2*

[0433] 17.1 – *AAD-2 (v1)* initial cloning.

[0434] Another gene was identified from the NCBI database (see the ncbi.nlm.nih.gov website; accession #AP005940) as a homologue with only 44% amino acid identity to *tfdA*. This gene is referred to herein as *AAD-2 (v1)* for consistency. Percent identity was determined by first translating both the *AAD-2* and *tfdA* DNA sequences (SEQ ID NO:12 and GENBANK Accession No. M16730, respectively) to proteins (SEQ ID NO:13 and GENBANK Accession No. M16730, respectively), then using ClustalW in the VectorNTI software package to perform the multiple sequence alignment.

[0435] The strain of *Bradyrhizobium japonicum* containing the *AAD-2 (v1)* gene was obtained from Northern Regional Research Laboratory (NRRL, strain #B4450). The lyophilized strain was revived according to NRRL protocol and stored at -80° C in 20% glycerol for internal use as Dow Bacterial strain DB 663. From this freezer stock, a plate of Tryptic Soy Agar was then struck out with a loopful of cells for isolation, and incubated at 28° C for 3 days. A single colony was used to inoculate 100 ml of Tryptic Soy Broth in a 500 ml tri-baffled flask, which was incubated overnight at 28° C on a floor shaker at 150 rpm. From this, total DNA was isolated with the gram negative protocol of Qiagen's DNeasy kit (Qiagen cat. #69504). The following primers were designed to amplify the target gene from genomic DNA, Forward: 5' ACT AGT AAC AAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA CGA T 3' [(brjap 5'(spel) SEQ ID NO:14 (added Spe I restriction site and Ribosome Binding Site

(RBS))] and Reverse: 5' TTC TCG AGC TAT CAC TCC GCC GCC TGC TGC TGC 3' [(br jap 3' (xhoI) SEQ ID NO:15 (added a Xho I site)].

[00436] Fifty microliter reactions were set up as follows: Fail Safe Buffer 25 µl, ea. primer 1 µl (50 ng/µl), gDNA 1 µl (200 ng/µl), H_2O 21 µl, Taq polymerase 1 µl (2.5 units/µl). Three Fail Safe Buffers—A, B, and C—were used in three separate reactions. PCR was then carried out under the following conditions: 95° C 3.0 minutes heat denature cycle; 95° C 1.0 minute, 50° C 1.0 minute, 72° C 1.5 minutes, for 30 cycles; followed by a final cycle of 72° C 5 minutes, using the FailSafe PCR System (Epicenter cat. #FS99100). The resulting ~1 kb PCR product was cloned into pCR 2.1 (Invitrogen cat. #K4550-40) following the included protocol, with chemically competent TOP10F' *E. coli* as the host strain, for verification of nucleotide sequence.

[00437] Ten of the resulting white colonies were picked into 3 µl Luria Broth + 1000 µg/ml Ampicillin (LB Amp), and grown overnight at 37° C with agitation. Plasmids were purified from each culture using Nucleospin Plus Plasmid Miniprep Kit (BD Biosciences cat. #K3063-2) and following included protocol. Restriction digestion of the isolated DNA's was complete:l to confirm the presence of the PCR product in the pCR2.1 vector. Plasmid DNA was digested with the restriction enzyme EcoRI (New England Biolabs cat. #R0101S). Sequencing was carried out with Beckman CEQ Quick Start Kit (Beckman Coulter cat. #608120) using M13 Forward [5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'] (SEQ ID NO:16) and Reverse [5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'] (SEQ ID NO:17) primers, per manufacturers instructions. This gene sequence and its corresponding protein was given a new general designation *AAD-2 (v1)* for internal consistency.

[00438] 17.2 – Completion of *AAD-2 (v1)* binary vector.

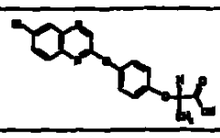
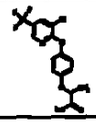
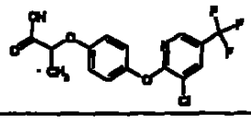
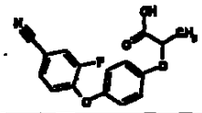
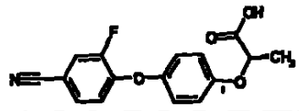
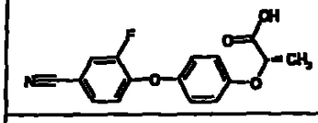
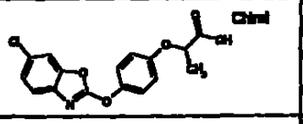
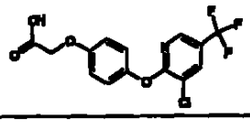
[00439] The *AAD-2 (v1)* gene was PCR amplified from pDAB3202. During the PCR reaction alterations were made within the primers to introduce the AflIII and SacI restriction sites in the 5' primer and 3' primer, respectively. The primers "NcoI of Brady" [5' TAT ACC ACA TGT CGA TCG CCA TCC GGC AGC TT 3'] (SEQ ID NO:18) and "SacI of Brady" [5' GAG CTC CTA TCA CTC CGC CGC CTG CTG CTG CAC 3'] (SEQ ID NO:19) were used to amplify a DNA fragment using the Fail Safe PCR System (Epicentre). The PCR product was cloned into the pCR 2.1 TOPO TA cloning vector (Invitrogen) and sequence verified with M13 Forward and M13 Reverse primers using the Beckman Coulter "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" sequencing reagents. Sequence data identified a

clone with the correct sequence (pDAB716). The AflIII/SacI *AAD-2 (v1)* gene fragment was then cloned into the NcoI/SacI pDAB726 vector. The resulting construct (pDAB717); AtUbi10 promoter: Nt OSM 5'UTR: *AAD-2 (v1)*: Nt OSM3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR was verified with restriction digests (with NcoI/SacI). This construct was cloned into the binary pDAB3038 as a NotI – NotI DNA fragment. The resulting construct (pDAB767); AtUbi10 promoter: Nt OSM5'UTR: *AAD-2 (v1)*: Nt OSM 3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR: CsVMV promoter: *PAT*: ORF25/26 3'UTR was restriction digested (with NotI, EcoRI, HinDIII, NcoI, PvuII, and SalI) for verification of the correct orientation. The completed construct (pDAB767) was then used for transformation into *Agrobacterium*.

[00440] 17.3 – Comparison of substrate specificities of AAD-2 (v1) and AAD-1 (v1)

[00441] The activity of an extract from *E. coli* expressing AAD-2 (v1) (pDAB3202) prepared as in Example 11 was tested on four herbicides, 2,4-D, (R,S)-dichlorprop, (R,S)-haloxyfop and (R)-haloxyfop (all at a final concentration of 0.5 mM) using 3 µl (42 µg) of *E. coli* extract per assay with a 15 min assay period. Figure 22 shows that the relative AAD-2 (v1) activity on the substrates was 2,4-D = dichlorprop > (R,S)-haloxyfop >> (R)-haloxyfop. Thus AAD-2 (v1) differs from AAD-1 (v1) in that it has a similar level of activity on 2,4-D as on dichlorprop (whereas the activity of AAD-1 (v1) on 2,4-D is ~10% that of dichlorprop). AAD-2 (v1) also differs from AAD-1 (v1) in that it is unable to act on (R)-haloxyfop. Table 33 shows data from additional substrates tested with AAD-1 (v1) and AAD-2 (v1) that confirm that AAD-2 (v1) is specific for (S)-enantiomer substrates, in contrast to AAD-1 (v1) which is specific for (R)-enantiomers. In another test, AAD-2 (v1) was found to differ from AAD-1 (v1) in that it releases little or no detectable phenol from 2,4-D sulfonate (in which a sulfonate group replaces the carboxylate of 2,4-D) whereas AAD-1 (v1) produces significant levels of phenol from this compound (~25% of 2,4-D.)

Table 33. Comparison of AAD1 and AAD2 activity on various substrates. Substrates were assayed at 0.5 mM for 15 min in 25 mM MOPS pH 6.8, 200 μM Fe^{2+}, 200 μM Na ascorbate, 1 mM α-ketoglutarate using 4 μl AAD1 (32 μg protein) extract or 3 μl AAD2 extract (42 μg protein).

				A510	
STRUCTURE	Reg ID	Compound	Enantiomer	AAD1	AAD2
	18706	quizalofop	R	0.27	0.01
	8671	haloxyfop	R	0.12	0
	66905	haloxyfop	R,S	0.1	0.3
	14623	cyhalofop	R,S	0.12	0.1
	14603	cyhalofop	R	0.14	0
	7466	cyhalofop	S	0	0.15
	11044492	fenoxaprop	R	0.14	0
	43865	haloxyfop-acetate	–	0	0.22

[00442] The enzyme kinetics of partially purified AAD-1 (v1) and AAD-2 (v1) were compared using 2,4-D as substrate. *See* Figure 19. The K_m values for 2,4-D were 97 and 423 μM for AAD-1 (v1) and AAD-2 (v1) respectively and the apparent V_{max} values were 0.11 and 0.86 A_{510} units, respectively (Table 34). Because equivalent amounts of enzyme were used in the assays (as determined by SDS-PAGE analysis), it can be concluded that the k_{cat} of AAD-2 (v1) for 2,4-D is almost 8-fold higher than AAD-1 (v1) and the k_{cat}/K_m is 2-

fold higher. Thus AAD-2 (v1) is significantly more efficient at cleaving 2,4-D *in vitro* than AAD-1 (v1). This is in surprising contrast to the *in planta* findings reported below, where plants expressing AAD-1 (v1) are significantly better in conferring 2,4-D resistance relative to AAD-2 (v1).

Table 34. Comparison of the Km and "Vmax" values for the aryloxyalkanoate dioxygenases (AADs) from pDAB3202 (AAD-2) and pDAB3203 [AAD-1 (v1)] with different herbicide substrates:

Enzyme	Compound	Km (μM) ±SE	Vmax (A510 units)	Km/Vmax (arbitrary units)
AAD-2	2,4-D	423 (±1)	0.86	2.03
AAD-1 (v1)	2,4-D	97 (±21)	0.11	1.16

Notes: Assays were performed in MOPS pH 6.75 + 1 mM α-ketoglutarate + 0.1 mM Na ascorbate + 0.1 mM Fe2+ and the released phenols colorimetrically detected using 4-aminoantipyrine/ferricyanide.

[00443] 17.4 – Evaluation of transformed *Arabidopsis*.

[00444] Freshly harvested T_1 seed transformed with a native [*AAD-1 (v2)*], plant optimized [*AAD-1 (v3)*], or native *AAD-2 (v1)* gene was allowed to dry for 7 days at room temperature. T_1 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 T_1 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.

[00445] Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) was covered with fine vermiculite and subirrigated with Hoagland's solution until wet and 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).

[00446] Five to six days after planting (DAP) and again 10 DAP, T_1 plants (cotyledon and 2-4-lf 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 5-7 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. Domes were subsequently removed and

plants moved to the greenhouse (22±5° C, 50±30% RH, 14 hours light:10 dark, minimum 500 $\mu E/m^2s^1$ natural + supplemental light) at least 1 day prior to testing for the ability of *AAD-1 (v3)*, *AAD-1 (v2)*,or *AAD-2 (v1)* to provide phenoxy auxin herbicide resistance.

[00447] Random individual T_1 plants selected for glufosinate resistance above were confirmed for expression of the PAT protein using a PAT ELISA kit (Part no. 7000045, Strategic Diagnostics, Inc., Newark, DE) to non-destructively confirm fidelity of selection process (manufacturer's protocol). Plants were then randomly assigned to various rates of 2,4-D (50-800 g ae/ha).

[00448] 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).

17.5 – Results of selection of transformed plants

The first *Arabidopsis* transformations were conducted using *AAD-1 (v3)*. T_1 transformants were first selected from the background of untransformed seed using a glufosinate selection scheme. Over 400,000 T_1 seed were screened and 493 glufosinate resistant plants were identified (*PAT* gene), equating to a transformation/ selection frequency of 0.12%. Depending on the lot of seed tested, this ranged from 0.05-0.23% (see Table 15 in Example 6.5 above). A small lot of native *AAD-1 (v2)* transformed seed were also selected using the glufosinate selection agent. Two hundred seventy eight glufosinate-resistant T_1 individuals were identified out of 84,000 seed screened (0.33% transformation/selection frequency). Surprisingly, *Arabidopsis* transformations using the native *AAD-2(v1)* gene provided a very low transformation frequency when selected for glufosinate tolerance (*PAT* selectable marker function). Approximately 1.3 million seed have been screened and only 228 glufosinate transformants were recovered, equating to a transformation/selection frequency of 0.018% (*see* Table 15). Transformation frequency for native *AAD-2 (v1)* was only 6% of that of native *AAD-1 (v2)*. The native *AAD2 (v1)* gene was subsequently synthetically optimized, cloned, and transformed as pDAB3705, into Arabidopsis using methods previously described (see Example 5). The plant optimized *AAD2 (v2)* (SEQ ID NO:29, which encodes SEQ ID NO:30) yielded a normal T_1 *Arabidopsis* selection frequency using Liberty herbicide of approximately 0.11% (*see* Table 15).

[00449] T_1 plants selected above were subsequently transplanted to individual pots and sprayed with various rates of commercial aryloxyalkanoate herbicides. Table 16 (in

Example 6.5 above) compares the response of *AAD-1 (v2)*, *AAD-1 (v3)*, *AAD-2 (v1)* and *AAD-1(v2)* genes to impart 2,4-D resistance to *Arabidopsis* T_1 transformants. All genes did provide some significant 2,4-D resistance versus the transformed and untransformed control lines; however, individual constructs were widely variable in their ability to impart 2,4-D resistance to individual T_1 *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 16 simply to demonstrate the significant difference between the plants transformed with *AAD-1 (v2)*, *AAD-1 (v3)*, *AAD-2 (v1)* or *AAD-2 (v2)* versus the wildtype or *PAT/Cry1F* transformed controls.

[0450] Surprisingly, *AAD-2 (v1)* transformants were far less resistant to 2,4-D than either *AAD-1 (v2)* or *AAD-1 (v3)* genes (Table 16) 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%. Conversely, 56% (45 of 80) *AAD-1 (v2)*-transformed T_1 plants survived 200 g ae/ha 2,4-D uninjured (population injury average = 34%), and >73% (11 of 15) *AAD-1 (v3)* T_1 plants were uninjured (population injury average = 14%). *See* Figure 20. Tolerance improved slightly for plant-optimized *AAD2 (v2)* versus the native gene; however, comparison of both *AAD-1* and *-2* plant optimized genes indicates a significant advantage for *AAD-1 (v3) in planta* (see Table 16).

[0451] These results are unexpected given that *in vitro* comparison of native AAD-1 (v2) and AAD-2 (v1) indicated 2,4-D was better degraded by AAD-2 (v1). AAD-2 (v1) is expressed in individual T_1 plants to varying levels with the anticipated size; however, little protection from 2,4-D injury is afforded by this expressed protein. Little correlation exists between expression level noted on the Western blot and the level of injury from 2,4-D on the same plants. *See* Figure 21. No large difference was evident in protein expression level (*in planta)* for the native and plant optimized *AAD-2* genes. These data corroborate earlier findings that make the functional expression of AAD-1 (v3) *in planta* for imparting herbicide resistance to 2,4-D and AOPP herbicides is unexpected .

Example 18 – Preplant Burndown Applications

[00452] This and the following Examples are specific examples of novel herbicide uses made possible by the subject AAD-1 invention.

[00453] 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, 2003 or online at cdms.net/manuf/manuf.asp). With *AAD-1 (v3)* 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, 2003) and uses described in Agriliance Crop Protection Guide (2003), 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-1 (v3)* gene if stably transformed.

Example 19 – In-Crop Use of Phenoxy Auxins Herbicides in *AAD-1 (v3)* Only Transformed Soybeans, Cotton, and Other Dicot Crops

[0454] *AAD-1 (v3)* can enable the use of phenoxy auxin herbicides (*e.g.*, 2,4-D, dichlorprop, MCPA, *et al.*) 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 a complete weed control system, grass weeds must be controlled. A variety of broad spectrum graminicide herbicides, including but not limited to haloxyfop, quizalofop, fenoxaprop, fluazifop, sethoxydim, and clethodim are currently registered for use in most dicot crops which are naturally tolerant to these herbicides. A combination of quizalofop (20 – 100 g ae/ha) plus 2,4-D (420 – 840 g ae/ha) could provide two herbicide modes of action in an *AAD-1 (v3)*-transformed dicot crop (*i.e.*, soybean or cotton) that would control most agronomic weeds in a similar fashion to glyphosate in glyphosate tolerant crops (*see* weed control spectra by reference to Agriliance Crop Protection Guide performance ratings).

[0455] 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/or AOPP herbicides 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 rotate 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-1 (v3)* HTC rotation strategy, whether one rotates crops species or not. Additionally, the grass and broadleaf weed control components of this system are independent of one another, thus allowing one skilled in the are of weed control to determine the most cost effective and efficacious ratio of auxin and AOPP herbicide. For example, if

broadleaf weeds were the only significant weeds present when herbicide applications were needed, an herbicide application of 560 to 1120 g ae/ha 2,4-D could be made without another herbicide. This would reduce unnecessary herbicide applications, provide flexibility to reduce input costs and reduce environmental loads of pesticides, and reduce unnecessary selection pressure for the development of herbicide resistant weeds.

[00456] Further benefits could include tolerance to 2,4-D drift or volatilization as mechanisms for off-site 2,4-D injury to dicot crops; no interval required before planting following 2,4-D 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. Dicamba (and other herbicides) can still be used for the subsequent control of *AAD-1 (v3)*-transformed dicot crop volunteers.

[00457] 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-1 (v3)* gene if stably transformed. One skilled in the art of weed control will now recognize that use of various commercial phenoxy auxin herbicides alone or in combination with any commercial AOPP herbicide is enabled by *AAD-1 (v3)* 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 Agriliance (2003). Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-1 (v3)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 20 - In-Crop Use of Phenoxy Auxins and AOPP Herbicides in *AAD-1 (v3)* Only Transformed Corn, Rice, and Other Monocot Species

[00458] 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-1 (v3)* would allow the use of highly efficacious AOPP graminicides in crops normally sensitive to these herbicides. Most grass species have a natural tolerance to auxinic herbicides such as the phenoxy auxins (i.e., 2,4-D, dichlorprop, et al.). However, a relatively low level of crop selectivity has resulted in diminished utility in these crops due to a shortened window of application timing and alternative broadleaf weeds. *AAD-1 (v3)*-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 would be used. A variety of broad spectrum AOPP graminicide herbicides (including but not limited to haloxyfop, quizalofop, fenoxaprop, and fluazifop) could be utilized for effectively controlling a wide selection of grass weeds. Cyclohexanedione graminicidal herbicides like sethoxydim, clethodim, *et al.* could not be used in this system as shown for dicot crops since AAD-1 would not protect from this chemistry, and grass crops will be naturally sensitive to the cyclohexanedione chemistries. However, this attribute would enable the use of cyclohexanedione herbicides for the subsequent control of *AAD-1 (v3)*-transformed grass crop volunteers. Similar weed control strategies are now enabled by AAD-1 for the dicot crop species. A combination of quizalofop (20 – 100 g ae/ha) plus 2,4-D (420 – 840 g ae/ha) could provide two herbicide modes of action in an *AAD-1 (v3)* transformed monocot crop (*e.g.*, corn and rice) that would control most agronomic weeds in a similar fashion to glyphosate in glyphosate tolerant crops (see weed control spectra by reference to Agriliance Crop Protection Guide performance ratings).

[00459] 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/or AOPP herbicides when used at higher rates. 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 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-1 (v3)* HTC rotation strategy, whether one rotates crops species or not. Additionally, the grass and broadleaf weed control components of this system are independent of one another, thus allowing one skilled in the are of weed control to determine the most cost effective and efficacious ratio of auxin and AOPP herbicide. For example, if broadleaf weeds were the only significant weeds present when herbicide applications were needed, an herbicide application of 560 to 1120 g ae/ha 2,4-D could be made without another herbicide. This would reduce unnecessary herbicide applications, provide flexibility to reduce input costs and reduce environmental loads of pesticides, and reduce unnecessary selection pressure for the development of herbicide resistant weeds. The increased tolerance of corn, and other monocots to the phenoxy 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," crop leaning, growth regulator-induced stalk brittleness in corn, or deformed brace roots.

[00460] Those skilled in the art will now also recognize that the above example can be applied to any monocot crop that would be protected by the *AAD-1 (v3)* gene from injury by any AOPP herbicide. One skilled in the art of weed control will now recognize that use of various commercial phenoxy auxin herbicides alone or in combination with any commercial AOPP herbicide is enabled by *AAD-1 (v3)* 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, 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 Agriliance (2003). Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-1 (v3)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 21 – *AAD-1 (v3)* Stacked With Glyphosate Tolerance Trait in Any Crop

[00461] The vast majority of cotton, canola, 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-1 (v3)* 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-1 (v3)*, one can selectively

apply AOPP herbicides in monocot crops, monocot crops will have a higher margin of phenoxy auxin safety, and phenoxy auxins can be selectively applied in dicot crops. Several scenarios for improved weed control options can be envisioned where *AAD-1 (v3)* 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 *Conyza canadensis* or weeds inherently difficult to control with glyphosate (*e.g.*, *Commelina* spp), 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.

b) 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 grass species like *Lolium rigidum* or *Eleusine indica*, 10-200 g ae/ha (preferably 20-100 g ae/ha) quizalofop can be applied sequentially, tank mixed, or as a premix with glyphosate to provide effective control.

c) 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-1 (v3)* + 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. An AOPP herbicide like quizalofop at 10-200 g ae/ha (preferably 20-100 g ae/ha and more preferably 20-35 g ae/ha), could be for more robust grass weed control and/or for delaying the development of glyphosate resistant grasses. 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.

[0062] One skilled in the art of weed control will recognize that use of one or more commercial phenoxy auxin herbicides alone or in combination (sequentially or

independently) with one or more commercial AOPP herbicide is enabled by *AAD-1 (v3)* 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 Agriliance (2003). Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-1 (v3)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 22 - *AAD-1 (v3)* Stacked with Glufosinate Tolerance Trait in Any Crop

[00163] Glufosinate tolerance (*PAT or 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 (Agriliance, 2003).

[00164] By stacking *AAD-1 (v3)* 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. As mentioned in previous examples, by transforming crops with *AAD-1 (v3)*, one can selectively apply AOPP herbicides in monocot crops, monocot crops will have a higher margin of phenoxy auxin safety, and phenoxy auxins can be selectively applied in dicot crops. Several scenarios for improved weed control options can be envisioned where *AAD-1 (v3)* 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.

i) Inherently tolerant grass weed species (e.g., *Echinochloa spp* or *Sorghum spp*) could be controlled by tank mixing 10-200 g ae/ha (preferably 20-100 g ae/ha) quizalofop.

ii) Inherently tolerant broadleaf weed species (e.g., *Cirsium arvensis* and *Apocynum cannabinum*) 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.

b) A three-way combination of glufosinate (200-500 g ae/ha) + 2,4-D (280-1120 g ae/ha) + quizalofop (10-100 g ae/ha), 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.

[00465] One skilled in the art of weed control will recognize that use of one or more commercial phenoxy auxin herbicides alone or in combination (sequentially or independently) with one or more commercial AOPP herbicide is enabled by *AAD-1 (v3)* 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 Agriliance (2003). Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-1 (v3)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

. . . . .

Example 23 - *AAD-1 (v3)* Stacked with *AHAS* Trait in Any Crop

[00466] 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.* Imidazolinone tolerant HTCs to date have the advantage of being non-transgenic. 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 (Agriliance, 2003). Additionally, imidazolinone herbicides have a mode of action (inhibition of acetolactate synthase, ALS) to which many weeds have developed resistance (Heap, 2004). By stacking *AAD-1 (v3)* 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-1 (v3)*, one can selectively apply AOPP herbicides in monocot crops, monocot crops will have a higher margin of phenoxy auxin safety, and phenoxy auxins can be selectively applied in dicot crops. Several scenarios for improved weed control options can be envisioned where *AAD-1 (v3)* 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, 2004) could be controlled by tank mixing 280-2240 g ae/ha, more preferably 560-1120 g ae/ha, 2,4-D.

   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.

   iii) ALS-inhibitor resistant grass weeds like *Sorghum halepense* and *Lolium* spp. can be controlled by tank mixing 10-200 g ae/ha (preferably 20-100 g ae/ha) quizalofop.

iv) Inherently tolerant grass weed species (e.g., *Agropyron repens*) could also be controlled by tank mixing 10-200 g ae/ha (preferably 20-100 g ae/ha) quizalofop.

b) A three-way combination of imazethapyr (35 to 280 g ae/ha, preferably 70-140 g ae/ha) + 2,4-D (280-1120 g ae/ha) + quizalofop (10-100 g ae/ha), 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.

[00467] One skilled in the art of weed control will recognize that use of any of various commercial imidazolinone herbicides, phenoxy auxin herbicides, or AOPP herbicide, alone or in multiple combinations, is enabled by *AAD-1 (v3)* 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 Agriliance (2003). Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-1 (v3)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 24 – *AAD-1 (v3)* in Rice

[00468] 24.1 – Media description.

[00469] Culture media employed were adjusted to pH 5.8 with 1 M KOH and solidified with 2.5 g/l Phytagel (Sigma). Embryogenic calli were cultured in 100 x 20 mm Petri dishes containing 40 ml semi-solid medium. Rice plantlets were grown on 50 ml medium in Magenta boxes. Cell suspensions were maintained in 125-ml conical flasks containing 35 ml liquid medium and rotated at 125 rpm. Induction and maintenance of embryogenic cultures took place in the dark at 25–26° C, and plant regeneration and whole-plant culture took place in a 16-h photoperiod (Zhang *et al.* 1996).

[00470] Induction and maintenance of embryogenic callus took place on NB basal medium as described previously (Li *et al.* 1993), but adapted to contain 500 mg/l glutamine. Suspension cultures were initiated and maintained in SZ liquid medium (Zhang *et al.* 1998) with the inclusion of 30 g/l sucrose in place of maltose. Osmotic medium (NBO) consisted of NB

medium with the addition of 0.256 M each of mannitol and sorbitol. Hygromycin-B-resistant callus was selected on NB medium supplemented with 50 mg/l hygromycin B for 3–4 weeks. Pre-regeneration took place on medium (PRH50) consisting of NB medium without 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), but with the addition of 2 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP), 1 mg/l α-naphthaleneacetic acid (NAA), 5 mg/l abscisic acid (ABA) and 50 mg/l hygromycin B for 1 week. Regeneration of plantlets followed via culture on regeneration medium (RNH50) comprising NB medium without 2,4-D, and supplemented with 3 mg/l BAP, 0.5 mg/l NAA, and 50 mg/l hygromycin B until shoots regenerated. Shoots were transferred to rooting medium with half-strength Murashige and Skoog basal salts and Gamborg's B5 vitamins, supplemented with 1% sucrose and 50 mg/l hygromycin B (1/2MSH50).

[0071] 24.2 – Tissue culture development.

[0072] Mature desiccated seeds of *Oryza sativa* L. japonica cv. Taipei 309 were sterilized as described in Zhang et al. 1996. Embryogenic tissues were induced by culturing sterile mature rice seeds on NB medium in the dark. The primary callus approximately 1 mm in diameter, was removed from the scutellum and used to initiate cell suspension in SZ liquid medium. Suspensions were then maintained as described in Zhang 1995. Suspension-derived embryogenic tissues were removed from liquid culture 3–5 days after the previous subculture and placed on NBO osmotic medium to form a circle about 2.5 cm across in a Petri dish and cultured for 4 h prior to bombardment. Sixteen to 20 h after bombardment, tissues were transferred from NBO medium onto NBH50 hygromycin B selection medium, ensuring that the bombarded surface was facing upward, and incubated in the dark for 14–17 days. Newly formed callus was then separated from the original bombarded explants and placed nearby on the same medium. Following an additional 8–12 days, relatively compact, opaque callus was visually identified, and transferred to PRH50 pre-regeneration medium for 7 days in the dark. Growing callus, which became more compact and opaque was then subcultured onto RNH50 regeneration medium for a period of 14–21 days under a 16-h photoperiod. Regenerating shoots were transferred to Magenta boxes containing ½ MSH50 medium. Multiple plants regenerated from a single explant are considered siblings and were treated as one independent plant line. A plant was scored as positive for the hph gene if it produced thick, white roots and grew vigorously on ½ MSH50 medium. Once plantlets had reached the top of Magenta boxes, they were transferred to soil in a 6-cm pot under 100% humidity for a week, then

moved to a growth chamber with a 14-h light period at 30° C and in the dark at 21° C for 2–3 weeks before transplanting into 13-cm pots in the greenhouse. Seeds were collected and dried at 37° C for one week prior to storage at 4° C.

[00473] 24.3 – Microprojectile bombardment.

[00474] All bombardments were conducted with the Biolistic PDS-1000/He™ system (Bio-Rad, Laboratories, Inc.). Three milligrams of 1.0 micron diameter gold particles were washed once with 100% ethanol, twice with sterile distilled water and resuspended in 50 µl water in a siliconized Eppendorf tube. Five micrograms plasmid DNA representing a 1:6 molar ratio of pDOW3303(Hpt-containing vector) to pDAB3403, 20 µl spermidine (0.1 M) and 50 µl calcium chloride (2.5 M) were added to the gold suspension. The mixture was incubated at room temperature for 10 min, pelleted at 10000 rpm for 10 s, resuspended in 60 µl cold 100% ethanol and 8–9 µl was distributed onto each macrocarrier. Tissue samples were bombarded at 1100 psi and 27 in of Hg vacuum as described by Zhang *et al.* (1996).

[00475] 24.4 – Tolerance testing.

[00476] Rice plantlets at the 3-5 leaf stage were sprayed with a 0.3% (v/v) solution of DuPont™ Assure® II containing 1% (v/v) Agridex crop oil concentrate using a DeVilbiss bulb sprayer (model 15-RD glass atomizer). This concentration corresponds to approximately 140 g ae/ha. Each plant was spayed in a fume hood at a distance of 8-12 inches with 6 full squirts of the sprayer directed so that the entire plant was covered with an equal portion of herbicide. Each squirt delivered approximately 100 µl solution to the plantlet. Once sprayed, plantlets were allowed to dry for one hour before being moved out of the fume hood. Rating for sensitivity or resistance was done at 10-14 days after treatment (DAT) and is shown in Table 35 below.

Table 35.

Sample Name	140 g ae/ha quizalofop
Control	Dead
63-1A	No injury
63-1F	No injury
63-4B	No injury
63-4D	No injury
63-6C	Dead

[00477] 24.5 – Tissue harvesting, DNA isolation and quantification.

[00478] 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 scanned in the florometer (BioTek) with known standards to obtain the concentration in ng/μl.

[00479] 24.6 – Southern blot analysis.

[00480] Southern blot analysis was performed with total DNA obtained from the Qiagen DNeasy kit. A total of 2 μg of DNA was subjected to an overnight digest of HindIII for pDAB3403 to obtain integration data. Likewise a total of 2 ug of DNA was subjected to an overnight digest of MfeI to obtain the PTU data. After the overnight digestion an aliquot of ~100 ng was run on a 1% gel to ensure complete digestion. After this assurance the samples were run on a large 0.85% agarose gel overnight at 40 volts. The gel was then denatured in 0.2 M NaOH, 0.6 M NaCl for 30 minutes. The gel was then neutralized in 0.5 M Tris HCl, 1.5 M NaCl pH of 7.5 for 30 minutes. A gel apparatus containing 20 x SSC was then set-up to obtain a gravity gel to nylon membrane (Millipore INYC00010) transfer overnight. After the overnight transfer the membrane was then subjected to UV light via a crosslinker (Stratagene UV stratalinker 1800) at 1200 X100 microjoules. The membrane was then washed in 0.1% SDS, 0.1 SSC for 45 minutes. After the 45 minute wash, the membrane was baked for 3 hours at 80°C and then stored at 4° C until hybridization. The hybridization template fragment was prepared using coding region PCR using plasmid pDAB3404. A total of 100 ng of total DNA was used as template. 20mM of each primer was used with the Takara Ex Taq PCR Polymerase kit (Mirus TAKRR001A). Primers for Southern fragment PCR AAD-1 were (Forward - ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:31) and (Reverse - GGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO:32). 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, 65°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute and 45 seconds followed by 72°C for 10 minutes.

[00481] The product was run on a 1% agarose gel and excised then gel extracted using the Qiagen (28706) gel extraction procedure. The membrane was then subjected to a pre-hybridization at 60°C step for 1 hour in Perfect Hyb buffer (Sigma H7033). The Prime it

RmT dCTP-labeling reaction (Stratagene 300392) procedure was used to develop the p32 based probe (Perkin Elmer). The probe was cleaned-up using the Probe Quant. G50 columns (Amersham 27-5335-01). Two million counts CPM were used to hybridize the Southern blots overnight. After the overnight hybridization the blots were then subjected to two 20 minute washes at 65°C in 0.1% SDS, 0.1 SSC. The blots were then exposed to a phosphor image screen overnight and scanned using a storm scanner (MOLECULAR DEVICES). A summary of the results is presented in Table 36.

Table 36. Southern Results.

Event	Integration Southern data Number of bands	PTU Southern data Expected size 3049bp
63-1 A	8	yes, 7 distinct bands
63-1 F	5	yes, 9 distinct bands
63-4 A	20	yes, 20 distinct bands
63-4 D	20	yes, 19 distinct bands
63-6 C	2	Insufficient DNA yield for both cuts

[00483] Plants 63-1 A and 63-1 F are not the same event; Plants 63-4 A and 63-4 D are the same event. These events have the expected size PTU's, but they are very complex. This Southern blot PTU data correlates with expression data and the spray data. Sample 63-6 C did not have enough DNA present to perform both Integration and PTU southern blots.

[00484] 24.7 – Western data

[00485] Sample preparation and analysis conditions were as described previously. Five transgenic rice lines and 1 non-transgenic control were analyzed for AAD-1 expression using ELISA and Western blot. AAD-1 was detected in four lines (63-1A, 63-1F, 63-4B and 63-4D) but not in line 63-1C or the control plant. Expression levels ranged from 15.6 to 183 ppm of total soluble protein. A summary of the results is presented in Table 37.

Table 37.

Lane	Sample Name	TSP (µg/mL)	ELISA [AAD1] (ng/mL)	ELISA Expression (ppm)	Western
1	Control	6719.58	0.00	0.00	-
2	63-1A	8311.87	351.17	42.25	±
3	63-1F	11453.31	2092.35	182.69	++
4	63-4B	13835.09	216.00	15.61	+
5	36-4D	13656.49	717.05	52.51	++
6	63-6C	5343.63	0.00	0.00	-
7	AAD1 Standard (0.5 µg/mL)				+++
8	AAD1 Standard (5.0 µg/mL)				+++++

Example 25 – Turf Grass Transformation Procedures

[00486] Genetic transformation, with *AAD-1 (v3)* substituted for the "bar" gene as described below, of creeping bentgrass mediated by Agrobacterium tumefaciens could be achieved through embryogenic callus initiated from seeds (cv. Penn-A-4), as described generally below. *See* "Efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated turfgrass (*Agrostis stolonifera* L) transformation" (Luo *et. al.*, 2004).

[00487] Callus is infected with an *A. tumefaciens* strain (LBA4404) harboring a super-binary vector that contained an herbicide-resistant bar gene driven either by a rice ubiquitin promoter. The overall stable transformation efficiency ranged from 18% to 45%. Southern blot and genetic analysis confirmed transgene integration in the creeping bentgrass genome and normal transmission and stable expression of the transgene in the T_1 generation. All independent transformation events carried one to three copies of the transgene, and a majority (60–65%) contained only a single copy of the foreign gene with no apparent rearrangements.

[00488] 25.1 – Seed preparation for embryogenic callus induction.

[00489] Mature seeds were dehusked with sand paper and surface sterilized in 10% (v/v) Clorox bleach (6% sodium hypochlorite) plus 0.2% (v/v) Tween 20 (Polysorbate 20) with vigorous shaking for 90 min. Following rinsing five times in sterile distilled water, the seeds were placed onto callus-induction medium (MS basal salts and vitamins, 30 g/l sucrose, 500 mg/l casein hydrolysate, 6.6 mg/l 3,6-dichloro-*o*-anisic acid (dicamba), 0.5 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP) and 2 g/l Phytagel. The pH of the medium was adjusted to 5.7 before autoclaving at 120°C for 20 min).

[00490] 25.2 – Embryogenic callus induction.

[00491] The culture plates containing prepared seed explants were kept in the dark at room temperature for 6 weeks. Embryogenic calli were visually selected and subcultured on fresh callus-induction medium in the dark at room temperature for 1 week before co-cultivation.

[00492] 25.3 – *Agrobacterium* infection and co-cultivation.

[00493] One day before agro-infection, the embryogenic callus was divided into 1- to 2-mm pieces and placed on callus-induction medium containing 100 μM acetosyringone. A 10-ul aliquot of Agrobacterium (LBA4404) suspension (OD=1.0 at 660 nm) was then applied to each piece of callus, followed by 3 days of co-cultivation in the dark at 25°C.

[00494] 25.4 – Resting stage and *Agrobacterium* control.

[00495] For the antibiotic treatment step, the callus was then transferred and cultured for 2 weeks on callus-induction medium plus 125 mg/l cefotaxime and 250 mg/l carbenicillin to suppress bacterial growth.

[00496] 25.5 – Selection and potential transgenic colony identification.

[00497] Subsequently, for selection, the callus was moved to callus-induction medium containing 250 mg/l cefotaxime and 10 mg/l phosphinothricin (PPT) for 8 weeks. Antibiotic treatment and the entire selection process were performed at room temperature in the dark. The subculture interval during selection was typically 3 weeks.

[00498] 25.6 – Regeneration of transgenic plants.

[00499] For plant regeneration, the PPT-resistant proliferating callus events are first moved to regeneration medium (MS basal medium, 30 g/l sucrose, 100 mg/l myo-inositol, 1 mg/l BAP and 2 g/l Phytagel) supplemented with cefotaxime, PPT or hygromycin. These calli were kept in the dark at room temperature for 1 week and then moved into the light for 2–3 weeks to develop shoots. No Albino plants with PPT selection (Hygromycin if used as a selection agent, produces a high level of albino plants).

[00500] 25.7 – Root induction and transfer to greenhouse.

[00501] Small shoots were then separated and transferred to hormone-free regeneration medium containing PPT and cefotaxime to promote root growth while maintaining selection pressure and suppressing any remaining *Agrobacterium* cells. Plantlets with well-developed roots (3–5 weeks) were then transferred to soil and grown either in the greenhouse or in the field.

[00502] 25.8 – Vernalization and out-crossing of transgenic plants.

[00503] Transgenic plants were maintained out of doors in a containment nursery (3-6 months) until the winter solstice in December. The vernalized plants were then transferred to the greenhouse and kept at 25°C under a 16/8 h photoperiod and surrounded by non-transgenic wild-type plants that physically isolated them from other pollen sources. The plants started flowering 3-4 weeks after being moved back into the greenhouse. They were out-crossed with the pollen from the surrounding wild type plants. The seeds collected from each individual transgenic plant were germinated in soil at 25°C, and T1 plants were grown in the greenhouse for further analysis.

[00504] 25.9 – Other target grasses.

[00505] Other grasses that can be targeted for AAD-1 transformation according to the subject invention include Annual meadowgrass (*Poa annua*), Bahiagrass, Bentgrass, Bermudagrass, Bluegrass, Bluestems, Bromegrass, Browntop bent (*Agrostis capillaries*), Buffalograss, Canary Grass, Carpetgrass, Centipedegrass, Chewings fescue (*Festuca rubra commutate*), Crabgrass, Creeping bent (*Agrostis stolonifera*), Crested hairgrass (*Koeleria macrantha*), Dallisgrass, Fescue, Festolium, Hard/sheeps fescue (*Festuca ovina*), Gramagrass, Indiangrass, Johnsongrass, Lovegrass, mixes (Equine, Pasture, etc.), Native Grasses, Orchardgrass, Perennial ryegrass (*Lolium perenne*), Redtop, Rescuegrass, annual and perennial Ryegrass, Slender creeping red fescue (*Festuca rubra trichophylla*), Smooth-stalked meadowgrass (*Poa pratensis*), St. Augustine, Strong creeping red fescue (*Festuca rubra rubra*), Sudangrass, Switchgrass, Tall fescue (*Festuca arundinacea*), Timothy, Tufted hairgrass (*Deschampsia caespitosa*), Turfgrasses, Wheatgrass, and Zoysiagrass.

Example 26 – *AAD-1 (v3)* in Canola .

[00506] 26.1 – Canola transformation.

[00507] The *AAD-1 (v3)* gene conferring resistance to 2,4-D was used to transform *Brassica napus* var. Nexera* 710 with *Agrobacterium*-mediated transformation. The construct contained *AAD-1 (v3)* gene driven by CsVMV promoter and Pat gene driven by AtUbi10 promoter.

[00508] Seeds were surface-sterilized with 10% commercial bleach for 10 minutes and rinsed 3 times with sterile distilled water. The seeds were then 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.

[00509] Hypocotyl segments (3-5 mm) were 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 were then transferred into a petri plate, treated with *Agrobacterium* Z707S or LBA4404 strain containing pDAB721. The *Agrobacterium* was grown overnight at 28° C in the dark on a shaker at 150 rpm and subsequently re-suspended in the culture medium.

[00510] After 30 min treatment of the hypocotyl segments with *Agrobacterium*, these were placed back on the callus induction medium for 3 days. Following co-cultivation, the

segments were placed K1D1TC (callus induction medium containing 250 mg/l Carbenicillin and 300 mg/l Timentin) for one week of recovery. Alternately, the segments were placed directly on selection medium K1D1H1 (above medium with 1 mg/l Herbiace). Carbenicillin and Timentin were the antibiotics used to kill the *Agrobacterium*. The selection agent Herbiace allowed the growth of the transformed cells.

[0511] Callus samples from 35 independent events were tested by PCR. All the 35 samples tested positive for the presence of *AAD-1 (v3)*,whereas the non-transformed controls were negative (section on PCR assay). Ten callus samples were confirmed to express the AAD-1 protein as determined by ELISA (section on protein analysis).

[0512] Calused hypocotyl segments were then 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 mg/l silver nitrate, 1 mg/l Herbiace, Carbenicillin and Timentin) shoot regeneration medium. After 3 weeks shoots started regenerating. 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 3 weeks.

[0513] Shoots were excised from the hypocotyl segments and transferred to shoot elongation medium MESH10 (MS, 0.5 gm/l MES, 10 mg/l Herbiace, Carbenicillin, Timentin) for 2-4 weeks. The elongated shoots are cultured for root induction on MSL1 (MS with 0.1 mg/l Indolebutyric acid). Once the plants had a well established root system, these were transplanted into soil. The plants were acclimated under controlled environmental conditions in the Conviron for 1-2 weeks before transfer to the greenhouse.

[0514] The transformed T0 plants were self-pollinated in the greenhouse to obtain T1 seed. The T0 plants and T1 progeny were sprayed with a range of herbicide concentrations to establish the level of protection by the *AAD-1 (v3)* gene.

[0515] 26.2 – "Molecular analysis": canola materials and methods

[0516] 26.2.1 – Tissue harvesting DNA isolation and quantification: 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 floromeler (BioTek) with known standards to obtain the concentration in ng/ul.

[00317] 26.2.2 - Polymerase chain reaction. A total of 100 ng of total DNA was used as the template. 20mM of each primer was used with the Takara Ex Taq PCR Polymerase kit (Mirus TAKRR001A). Primers for Coding Region PCR *AAD-1 (v3)* were (Forward – ATGGCTCATG CTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:27) and (Reverse - CGGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO:28). 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, 65°C for 30 seconds, and 72°C for 2 minutes followed by 72°C for 10 minutes. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with EtBr. 35 samples from 35 plants with *AAD-1 (v3)* events tested positive. Three negative control samples tested negative.

[00318] 26.3 – ELISA.

[00319] Using established ELISA described in previous section, AAD-1 protein was detected in 10 different canola transformation events. Expression levels ranged from 150 to over 1000 ppm of total soluble protein (TSP). Three different untransformed calli samples were tested in parallel with little signal detected, indicating that the antibodies used in the assay have minimal cross reactivity to the canola cell matrix. A summary of the results is presented in Table 38.

Table 38. Expression of AAD1 in Canola calli.

Sample #	Weight (mg)	[TSP] (µg/mL)	[AAD1] (ng/mL)	Expression (ppm TSP)	PCR for AAD1
1	114	757.02	119.36	157.67	+
2	55	839.79	131.84	156.99	+
3	53	724.41	202.12	279.01	+
4	52	629.01	284.89	452.92	+
5	55	521.75	175.88	337.08	+
6	61	707.69	74.24	153.71	+
7	51	642.02	559.11	1026.73	+
8	65	707.69	270.73	382.56	+
9	51	642.02	197.90	308.25	+
10	51	1417.42	220.63	156.66	+
Control 1	53	2424.67	18.67	7.70	-
Control 2	61	2549.60	35.00	13.73	-
Control 3	59	2374.41	22.79	9.60	-

References

Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker, and D.V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. Gene 36:289-300.

Agriliance Crop Protection Guide. 2003. Agriliance, LLC. St Paul, MN. 588 p.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alighment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.

Altschul, S. F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z, Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein databasesearch programs. Nucl. Acids Res. 25:3389-3402.

An, G., B.D. Watson, S. Stachel, M.P. Gordon, E. W. Nester. 1985. New cloning vehicles for transformation of higher plants. EMBO J. 4:277-284.

Armstrong C.L., C.E. Green, R.L. Phillips. 1991. Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. Maize Genet Coop News Lett 65:92-93.

Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbas, and F.C. Kafatos. 1983 Methods of Enzymology, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100:266-285

Birch R.G. and T. Franks. 1991. Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. Aust. J. Plant Physiol. 18:453-469.

CDMS. Crop Data Management Systems Labels and MSDS. Online. Internet. March 13, 2004. Available at net/manuf/manuf.asp.

Chee P.P., K.A. Fober, J.L. Slightom. 1989. Transformation of soybean (Glycine max) by infecting germinating seeds with Agrobacterium tumefaciens. Plant Physiol. 91:1212-1218.

Cheng M., J.E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, T.W. Conner, and Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol 115: 971-980.

Chu C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu, F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sinica 18:659-668.

Clemente T.E., R.J. LaVallee, A.R. Howe, D. Conner-Ward, R.J. Rozman, P.E. Hunter, D.L. Broyles, D.S. Kasten, M.A. Hinchee. 2000. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. Crop Sci 40: 797-803.

CPR: Crop Protection Reference. 2003 Chemical and Pharmaceutical Press, New York, NY. 2429 p.

Devine, M. D. 2005. Why are there not more herbicide-tolerant crops? Pest Manag. Sci. 61:312-317.

Dietrich, Gabriele Elfriede (1998) Imidazolinone resistant AHAS mutants. U.S. Patent 5,731,180.

Didierjean L, L. Gondet, R. Perkins, S.M. Lau, H. Schaller, D.P. O'Keefe, D. Werck-Reichhart. 2002. Engineering Herbicide Metabolism in Tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a Cytochrome P450 Enzyme from Jerusalem Artichoke. Plant Physiol 2002, 130:179-189.

Ditta, G. S. Stranfield, D. Corbin, and D.R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction ofa gene bank of *Rhizobium leliloti.* PNAS 77:7347-7351.

Edwards, R. A., L. H. Keller, and D. M. Schifferli. 1998. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. Gene 207:149-157.

Falco S.C., T. Guida, M. Locke, J. Mauvais, C. Sanders, R.T. Ward, P. Webber. 1995. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. Bio/Technology 13:577-582.

Finer J. and M. McMullen. 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. In Vitro Cell. Dev. Biol. 27P:175-182.

Fraley, R.T., D.G. Rogers, and R. B. Horsch. 1986. Genetic transformation in higher plants. Crit. Rev. Plant Sci. 4:1-46.

Frame B.R., P.R. Drayton, S.V. Bagnall, C.J. Lewnau, W.P. Bullock, H.M. Wilson, J.M. Dunwell, J.A. Thompson, and K. Wang. 1994. Production of fertile maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. Plant J. 6:941-948.

Fukumori, F., and R.P. Hausinger. 1993. Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase. J. Biol. Chem. 268: 24311-24317.

Gamborg, O.L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutirent requirements of suspensions of cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.

Gay, P., D. Le Coq , M. Steinmetz, E. Ferrari, and J. A. Hoch. 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Eschericia coli.* J. Bacteriol. 153:1424-1431.

Gianessi, L. R. 2005 Economic and herbicide use impacts of glyphosate-resistant crops. Pest. Manag. Sci. 61:241-245.

Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. March 18, 2005 . Available at weedscience.com.

Hiei Y., T. Komari, and T. Kubo. 1997. Tranformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Mol. Biol. 35:205-218.

Hiei, Y., T. Komari (1997) Method for Transforming Monocotyledons. U.S. Patent 5,591,616.

Hinchee M.A.W., D.V. Conner-Ward, C.A. Newell, R.E. McDonnell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley, R.B. Horsch. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Bio/Technology 6:915-922.

Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal cristal proteins of *Bacillus thuringiensis*. 1989. Microbiol. Rev. 53:242-255.

Hoekema, A. 1985. In: *The Binary Plant Vector System*, Offset-durkkerij Kanters B.V., Alblasserdam, Chapter 5.

Hogan, D.A.; S.R. Smith, E.A. Saari, J. McCracken, R.P.Hausinger. 2000. Site-directed mutagenesis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/a-ketoglutarate dioxygenase. Identification of residues involved in metallocenter formation and substrate binding. J. Biol. Chem. 275:12400-12409.

Holsters, M., D. De Waele, A. Depicker, E. Messens, M. Van Montagu, and J. Schell. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen. Genet. 163:181-187.

Horsch, R., J. Fry, N. Hoffman, J. Neidermeyer, S. Rogers, and R. Fraley. 1988. In Plant Molecular Biology Manual, S. Gelvin *et al.*, eds., Kluwer Academic Publishers, Boston

Horvath, M., G. Ditzelmüller, M. Lodl, and F. Streichsbier. 1990. Isolation and characterization of a 2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid-degrading soil bacterium. Appl. Microbiol Biotechnol. 33:213-216.

Jefferson, R. A. M. Bevan, and T. Kavanagh. 1987. The use of *Escherichia coli* ß-glucuronidase gene as a gene fustion marker for studies of gene expression in higher plants. Biochem. Soc. Trans. 15: 17-19.

Karlin, S. and S.F. Altschul. 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. PNAS 87:2264-2268.

Karlin, S. and S.F. Altschul. 1993. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. PNAS 90:5873-5877

Keller, G.H., and M.M. Manak. 1987. DNA Probes. Stockton Press, New York, NY, pp. 169-170.

Kohler, H.P.E. 1999. *Sphingobium herbicidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. J. Ind Microbiol and Biotech. 23:336-340.

Li L, Qu R, Kochko A de, Fauquet CM, Beachy RN (1993) An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Rep 12:250–255

Linsmaier, E.M. and F. Skoog (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18:100-127.

Lorraine-Colwill, D. F., S. B. Powles, T. R. Hoawkes, P.H. Hollingshead, S.A.J. Arner, and C. Preston. 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. Pestic. Biochem. Physiol. 74:62-73.

Luo , H., Q. Hu, K. Nelson, C. Longo, A. P. Kausch, J. M. Chandlee, J. K. Wipff and C. R. Fricker. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. Plant Cell Reports 22: 645-652.

Lyon, B.R., D. J. Llewellyn, J. L. Huppatz, E. S. Dennis, and W. J. Peacock. 1989. Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Plant Mol. Bio. 13:533-540.

Lyon, B.R., Y. L. Cousins, D. J. Llewellyn, and E. S. Dennis. 1993. Cotton plants transformed with a bacterial degradation gene are protected from accidental spray drift damage by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Transgenic Res. 2: 166-169.

Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Martin, J.R. and W.W. Witt. 2002. Response of glyphosate tolerant and susceptible biotypes of horseweed (Conyza canadensis) to foliar applied herbicides. Proc.North Cent.Weed Sci.Soc. 57:185.

Martinell B.J., L.S. Julson, C.A. Emler, H. Yong, D.E. McCabe, E.J. Williams. 2002. Soybean Agrobacterium transformation method. U.S. Patent Application No. 6384301

McCabe D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell, P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (Glycine max) by particle acceleration. Bio/Technology 6:923-926.

Miller S.D., P.W. Stahlman, P. Westra, G.W. Wicks, R.G. Wilson, J.M. Tichota. 2003. Risks of weed spectrum shifts and herbicide resistance in glyphosate-resistant cropping systems. Proc.West.Soc.Weed Sci. 56:61-62.

Muller R, S. Jorks, S. Kleinsteuber, W. Babel. 1999. *Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. Microbiol. Res. 154:241-246.

Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Murphy G.P., T.E. Dutt, R.F. Montgomery, T.S. Willard, G.A. Elmore. 2002. Control of horseweed with glyphosate. Proc.North Cent.Weed Sci.Soc. 57:194.

Ng, C.H., R. Wickneswari, S. Salmigah, Y.T. Teng, and B.S. Ismail. 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and –susceptible biotypes of *Eleustne indica* from Malaysia. Weed Res. 43:108-115.

Olhoft P.M. and D.A. Somers. 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 706-711

Olhoft, P.M., L.E. Flagel, C.M. Donovan, and D.A. Somers. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. Planta 216:723-735

Padgette S.R., K.H. Kolacz, X. Delannay, D.B. Re, B.J. LaVallee, C.N. Tinius, W.K. Rhodes, Y.I. Otero, G.F. Barry, D.A. Eichholtz, V.M. Peschke, D.L. Nida, N.B. Taylor, and G.M. Kishore. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Sci. 1995;35:1451-1461.

Parrott W.A., J. N. All, M.J. Adang, M.A. Bailey, H.R. Boerma, and C.N. Stewart, Jr. 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki insecticidal gene. In Vitro Cell. Dev. Biol. 30P:144-149.

Popelka, J. C. and F. Altpeter 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereale* L) Mol. Breed 11:203-211

Saari, R.E., D.A. Hogan, and R.P. Hausinger. 1999. Stereospecific degradation of the pheonxypropionate herbicide dichlorprop. J. Mol. Catal. B: Enz. 6:421-428.

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic Amplification of β-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230:1350-1354.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2000. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt (1972) Methods and techniques for induction and growth of monocotyledenous and dicotyledenous plant cell cultures. Can. J. Bot.. 50:199-204.

Sfiligoj, E. 2004. Spreading resistance. Crop Life. March issue.

Simarmata, M., J.E. Kaufmann, and D. Penner. 2003. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium* rigidum). Weed Sci. 51:678-682.

Singh R.J., T.M. Kleiu, C.J. Mauvais, S. Knowlton, T. Hymowitz, C.M. Kostow. Cytological characterization of transgenic soybean. Theor. Appl. Genet. 1998; 96:319-324.

Smejkal, C.W., T. Vallaeys, S.K. Burton, and H.M. Lappin-Scott. 2001. Substrate specificity of chlorophenoxyalkanoic acid-degrading bacteria is not dependent upon phylogenetically related tfdA gene types. Biol. Fertil. Sols 33:507-513.

Streber, W. and L. Willmitzer. 1989. Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. Bio/Technology 7:811-816.

Streber, W.R., K.N. Timmis, and M. H. Zenk. 2000. Microorganisms and plasmids for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) monooxygenase formation and process for the production of these plasmids and strains. US Pat. 6,153,401.

Streber, W.R., K.N. Timmis, and M.H. Zenk. 1987. Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenixyacetic monooxygenase gene tfdA of Alcaligenes eutrophus JMP134. J. Bacteriol. 169:2950-2955.

Suggs, S.V., T. Miyake, E.H. Kawashime, M.J. Johnson, K. Itakura, and R.B. Wallace. 1981. *ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes*, D.D. Brown [ed.], Academic Press, New York, 23:683-693.

Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fleg, W. Mingbo, S. Thornton, and R. Bretell. 1997. *Agrobacterium tunefaciens*-mediated barley transformation. Plant J. 11:1369-1376.

Weigel, D. and J. Glazebrook. 2002. *Arabidopsis*: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, N. Y.. 358 pp.

Weising, K., J. Schell, and G. Kahl. 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. Ann. Rev. Genet. 22:421-477.

Welter, M.E., D.S. Clayton, M.A. miler, and J.F. Petolino. 1995. Morphotypes of friable embryogenic maize callus. Plant Cell Rep. 14:725-729.

Westendorf A., D. Benndorf, R. Muller, W. Babel. 2002. The two enantiospecific dichlorprop/α-ketoglutarate-dioxygenases from Delftia acidovorans MC1-protein and sequence data of *RdpA* and *SdpA*. Microbiol. Res. 157:317-22.

Westendorf, A., R.H. Muller, and W. Babel. 2003. Purification and characterization of the enantiospecific dioxygenases from Delftia acidovorans MC1 initiating the degradation of phenoxypropionates and phenoxyacetate herbicides. Acta Biotechnol. 23: 3-17.

WSSA. 2002. Herbicide Handbook (8th ed). Weed Science Society of America. Lawrence, KS 492 pp.

Zeng P, D. Vadnais, Z. Zhang, and J. Polacco. 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [Glycine max (L.) Merr.]. Plant Cell Rep. 22: 478 – 482.

Zhang S (1995) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. Plant Cell Rep 15:68–71

Zhang S, Chen L, Qu R, Marmey P, Beachy RN, Fauquet CM (1996) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. Plant Cell Rep15:465–469.

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

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

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

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

Claims

Claim 1.

A transgenic plant cell comprising a polynucleotide that encodes an AAD-1 protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:9 or a variant of SEQ ID NO:9 wherein said variant has aryloxyalkanoate dioxygenase activity, at least one amino acid deletion or conserved substitution, and at least 95% sequence identity with SEQ ID NO:9.

Claim 2.

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

Claim 3.

The cell of claim 2 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.

Claim 4.

The cell of claim 2 wherein said plant cell is a monocotyledonous cell selected from the group consisting of a rice cell and a maize cell.

Claim 5.

A transgenic plant comprising a plurality of cells according to claim 1, wherein expression of said polynucleotide renders said cells tolerant to an aryloxyalkanoate herbicide.

Claim 6.

The plant of claim 5 wherein said herbicide is a phenoxy auxinic herbicide.

Claim 7.

The plant of claim 5 wherein said herbicide is selected from the group consisting of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, MCPA, dichlorprop, and mecoprop.

Claim 8.

The plant of claim 5 wherein said herbicide is an aryloxyphenoxypropionate.

Claim 9.

The plant of claim 5 wherein said herbicide is selected from the group consisting of fluazifop, haloxyfop, diclofop, quizalofop, fenoxaprop, metamifop, cyhalofop, and clodinofop.

Claim 10.

The plant of claim 5 wherein expression of said polynucleotide renders said plant resistant to both a phenoxy auxin herbicide and an aryloxyphenoxypropionate herbicide.

Claim 11.

The plant of claim 5 wherein said plant further comprises a second herbicide resistance gene.

Claim 12.

The plant of claim 11 wherein said second herbicide resistance gene renders said plant resistant to a herbicide selected from the group consisting of glyphosate, glufosinate, ALS inhibitors, inhibitors of 4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase (HPPD), and inhibitors of protoporphyrinogen oxidase (PPO).

Claim 13.

A method of controlling at least one weed in a field, wherein said field contains at least one plant of claim 5, wherein said method comprises applying to at least a portion of said field a first herbicide selected from the group consisting of a phenoxy auxin herbicide and an aryloxyphenoxypropionate herbicide.

Claim 14.

The method of claim 13 wherein said herbicide is an R-enantiomer of a chiral phenoxy auxin.

Claim 15.

The method of claim 14 wherein said herbicide is selected from the group consisting of R-dichlorprop and R-mecoprop.

Claim 16.

The method of claim 13 wherein said herbicide is an achiral phenoxy auxin.

Claim 17.

The method of claim 16 wherein said herbicide is selected from the group consisting of 2,4-D and MCPA.

Claim 18.

The method of claim 13 wherein said first herbicide is an aryloxyphenoxypropionate and said plant is a monocot.

Claim 19.

The method of claim 18 wherein said monocot is selected from the group consisting of corn, rice, wheat, barley, rye, turf grass, oats, sorghum, and pasture grasses.

Claim 20.

The method of claim 13 wherein said first herbicide is a phenoxy auxin and said plant is a dicot.

Claim 21.

The method of claim 20 wherein said dicot is selected from the group consisting of cotton, tobacco, canola, and soybean.

Claim 22.

The method of claim 13 wherein said method comprises applying a second herbicide.

Claim 23.

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

Claim 24.

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

Claim 25.

The method of claim 22 wherein said first herbicide is a phenoxy auxin and second herbicide is an aryloxyphenoxypropionate.

Claim 26.

The method of claim 13 wherein said plant is resistant to glyphosate.

Claim 27.

The method of claim 14 wherein said R-enantiomer is a component of a racemic mixture.

Claim 28.

The method of claim 22 wherein said plant further comprises a second herbicide resistance gene that renders said plant resistant to said second herbicide.

Claim 29.

The method of claim 28 wherein said second gene is selected from the group consisting of a modified AHAS (acetohydroxyacid synthase), SurA, SurB, Csr1, Csr1-1, Csr1-2, a modified EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), GOX, GAT, PAT (phosphinothricin-N-acetyltransferase), bar, and a dicamba-degrading enzyme.

Claim 30.

The method of claim 28 wherein said second herbicide is selected from the group consisting of glyphosate, glufosinate, dicamba, acetolactate synthase inhibitors, protoporphyrinogen oxidase inhibitors, and hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase inhibitors.

Claim 31.

The method of claim 30 wherein said second herbicide is an acetolactate synthase inhibitor selected from the group consisting of imidazolinones, sulfonyl ureas, and triazolopyrimidine herbicides.

Claim 32.

The method of claim 31 wherein said second herbicide is an imidazolinone selected from the group consisting of imazamox, imazethapyr, imazaquin, and imazapic.

Claim 33.

The method of claim 28 wherein said first herbicide is a phenoxy auxin and said second herbicide is selected from the group consisting of glyphosate and glufosinate.

Claim 34.

The method of claim 33 wherein said phenoxy auxin is 2,4-D and said second herbicide is glyphosate.

Claim 35.

The method of claim 28 wherein said first herbicide is an aryloxyphenoxypropionate and said second herbicide is glyphosate.

Claim 36.

The method of claim 35 wherein said first herbicide is selected from the group consisting of quizalofop, haloxyfop, and cyhalofop.

Claim 37.

The method of claim 31 wherein said second herbicide is a sulfonyl urea selected from the group consisting of amidosulfuron, bensulfuron, chlorimuron, chlorsulfuron, cinosulfuron, flupyrsulfuron, foramsulfuron, halosulfuron, nicosulfuron, primisulfuron, prosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, thifensulfuron, triasulfuron, trifloxysulfuron, and triflusulfuron.

Claim 38.

The method of claim 28 wherein said method further comprises applying a third herbicide.

Claim 39.

The method of claim 38 wherein said herbicides are 2,4-D; quizalofop; and glufosinate.

Claim 40.

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 an aryloxyphenoxypropionate.

Claim 41.

The method of claim 40 wherein said first herbicide is an acid, an inorganic salt, an organic salt, an ester, an R-enantiospecific isomer, or a component of a racemic mixture.

Claim 42.

The method of claim 40 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.

Claim 43.

The method of claim 42 wherein said second herbicide is selected from the group consisting of glyphosate, gramoxone, and glufosinate

Claim 44.

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:3, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:5.

Claim 45.

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

Claim 46.

The polynucleotide of claim 44 wherein said polynucleotide comprises SEQ ID NO:5.

Claim 47.

An isolated polynucleotide that encodes a protein that enzymatically degrades a herbicide selected from the group consisting of a phenoxy auxin and an aryloxyphenoxypropionate, 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:3, SEQ ID NO:4, and SEQ ID NO:5, wherein said polynucleotide is operably linked to a promoter that is functional in a plant cell.

Claim 48.

The polynucleotide of claim 47 wherein said promoter is a plant promoter.

Claim 49.

The polynucleotide of claim 47 wherein said promoter is a cassava vein mosaic virus promoter.

Claim 50.

A method of selecting for a transformed plant cell wherein said method comprises subject a plurality of plant cells to transformation with a polynucleotide of claim 44 or 47 and 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 an aryloxyphenoxyalkanoate.

Claim 51.

The method of claim 50 wherein said cells are cells of a plant and said method is used for selecting a transformed plant.

Claim 52.

A polynucleotide of claim 47 or 50 wherein said polynucleotide is used as a selectable marker in the method of claim 50.

Claim 53.

A method of detecting whether a plant comprises a polynucleotide of claim 47 or 50 wherein said method comprises collecting a sample from said plant and assaying said sample for the presence of said polynucleotide.

Claim 54.

The method of claim 53 wherein said method comprises assaying said sample for the presence of a protein encoded by said polynucleotide.

Claim 55.

The method of 53 wherein said method comprises using a PCR primer or probe to detect for the presence of said polynucleotide.

Claim 56.

The method of 54 wherein said method comprises using an antibody to detect for the presence of said protein.

Claim 57.

A seed comprising a plant cell of claim 1.

Claim 58.

A plant grown from the seed of claim 57.

Claim 59.

A part, progeny, or asexual propagate of the plant of claim 5.

Claim 60.

The method of claim 13 wherein said method is used to treat or prevent herbicide-resistant weeds.

Claim 61.

The plant of claim 5 wherein said plant further comprises an insect-resistance gene derived from an organism selected from the group consisting of *Bacillus thuringiensis*, *Photorhabdus*, and *Xenorhabdus*.

Claim 62.

The plant of claim 5 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.

Claim 63.

A method of conferring 2,4-D herbicide resistance to a crop wherein said method comprises introducing into at least one plant cell of said crop a nucleic-acid-encoding enzyme having R-specific aryloxyalkanoate dioxygenase activity relative to a 2,4-D herbicide.

Claim 64.

A method of controlling glyphosate-resistant weeds in a field of glyphosate tolerant crop plants, wherein said plants comprise a polynucleotide of claim 47, and said method comprises applying an aryloxyalkanoate herbicide to at least a portion of said field.

Claim 65.

The method of claim 64 wherein said herbicide is a phenoxy auxin.

Claim 66.

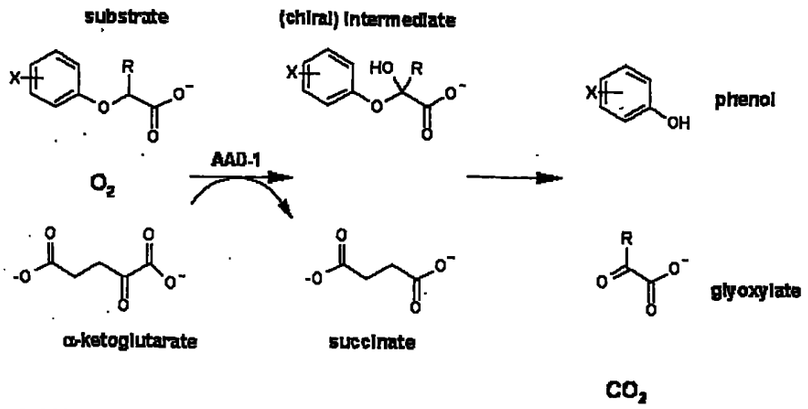
The method of claim 64 wherein said herbicide is an aryloxy phenoxypropionate.

Claim 67.

The method of claim 64 wherein said plants are dicots.

Claim 68.

The method of claim 64 wherein said plants are monocots.



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

Fig. 1

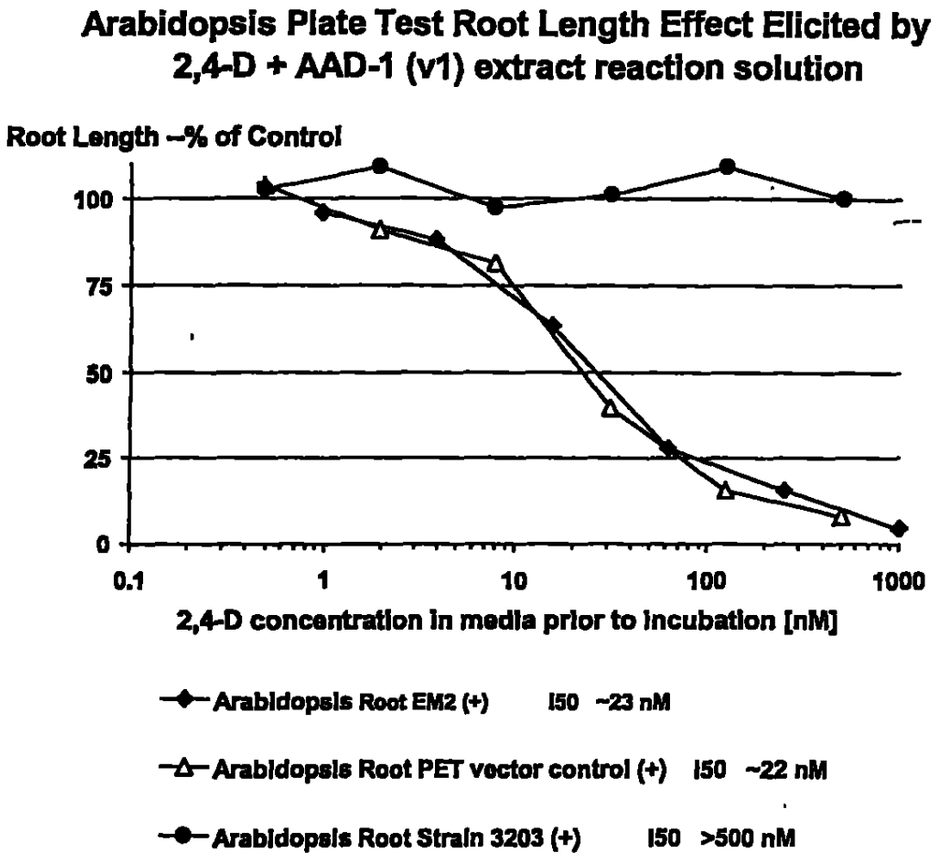

Arabidopsis Plate Test Root Length Effect Elicited by 2,4-D + AAD-1 (v1) extract reaction solution
Root Length --% of Control
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
2,4-D concentration in media prior to incubation [nM]
Arabidopsis Root EM2 (+) I50 ~23 nM
Arabidopsis Root PET vector control (+) I50 ~22 nM
Arabidopsis Root Strain 3203 (+) I50 >500 nM

Fig. 2

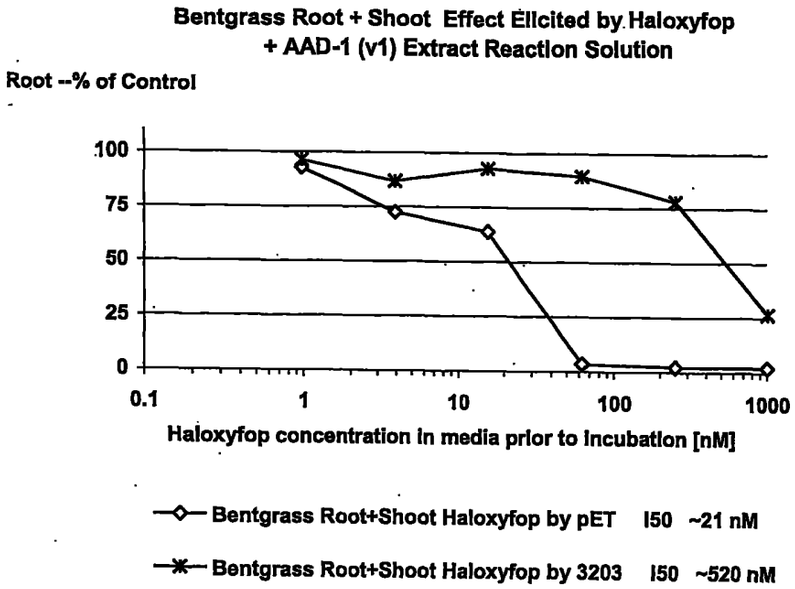

Bentgrass Root + Shoot Effect Elicited by Haloxyfop
+ AAD-1 (v1) Extract Reaction Solution
Root --% of Control
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Haloxyfop concentration in media prior to incubation [nM]
Bentgrass Root+Shoot Haloxyfop by pET I50 ~21 nM
Bentgrass Root+Shoot Haloxyfop by 3203 I50 ~520 nM

Fig. 3

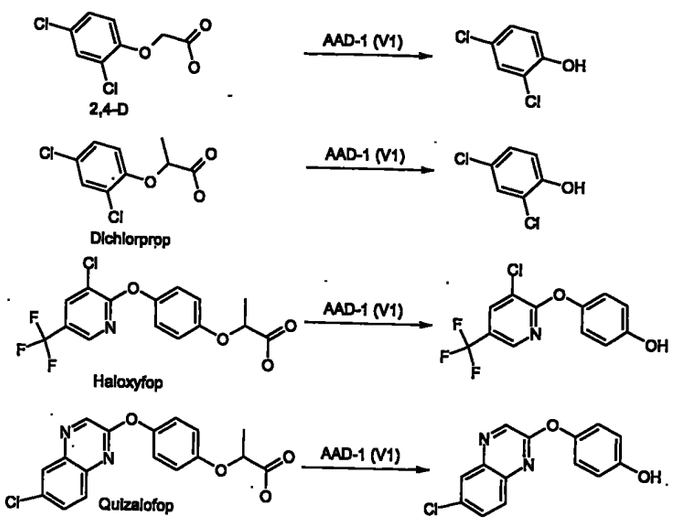

AAD-1 (V1)
2,4-D
AAD-1 (V1)
Dichlorprpp
AAD-1 (V1)
Haloxyfop
AAD-1 (V1)
Quizalofop

Fig. 4

WO 2005/107437

PCT/US2005/014737

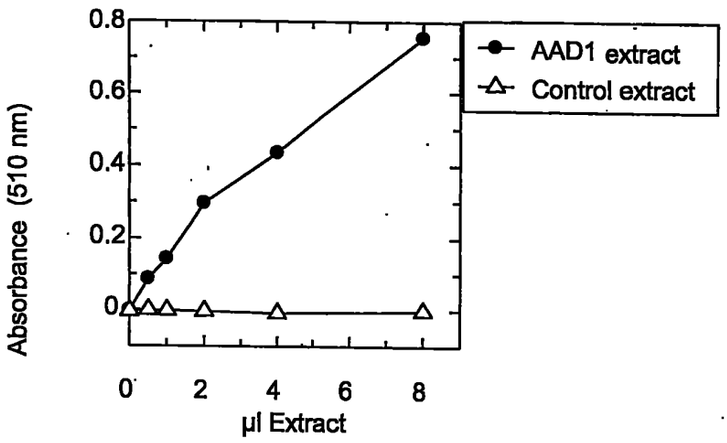


Fig. 5

Absorbance (510 nm)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2,4-D
(RS)-dichlorprop
(RS)-mecoprop
(RS)-haloxyfop
(RS)-diclofop

Fig. 6A

Absorbance (510 nm)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
RS-dichlorprop
RS-haloxyfop
R-haloxyfop
S-cyhalofop

Fig. 6B

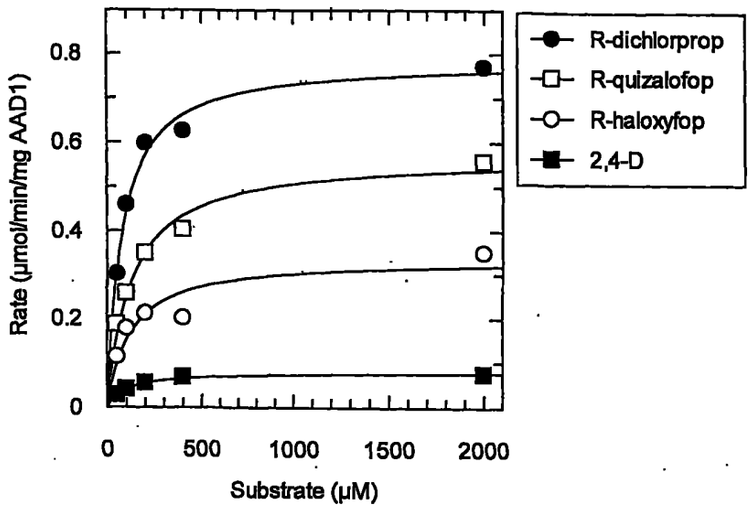

Rate (µmol/min/mg AAD1)
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
500
1000
1500
2000
Substrate (µM)
R-dichlorprop
R-quizalofop
R-haloxyfop
2,4-D

Fig. 7

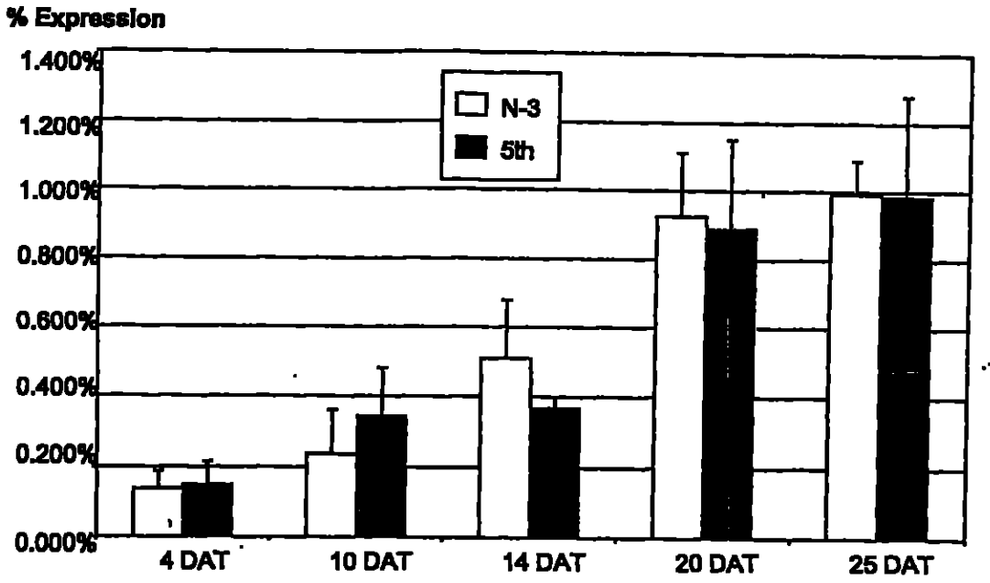

% Expression
1.400%
1.200%
1.000%
0.800%
0.600%
0.400%
0.200%
0.000%
N-3
5th
4 DAT
10 DAT
14 DAT
20 DAT
25 DAT

Fig. 8A

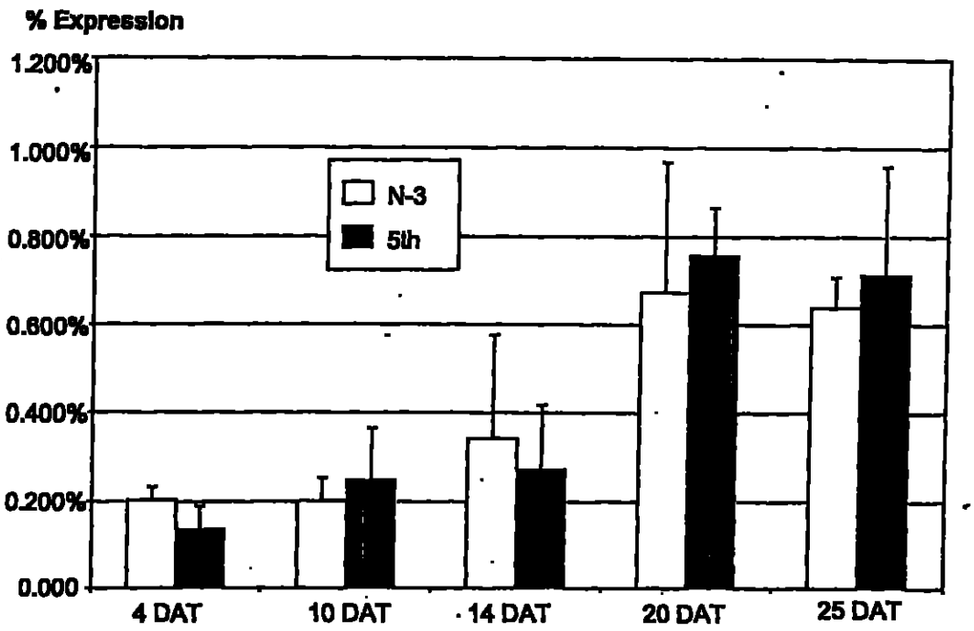

% Expression
1.200%
1.000%
0.800%
0.600%
0.400%
0.200%
0.000
N-3
5th
4 DAT
10 DAT
14 DAT
20 DAT
25 DAT

Fig. 8B

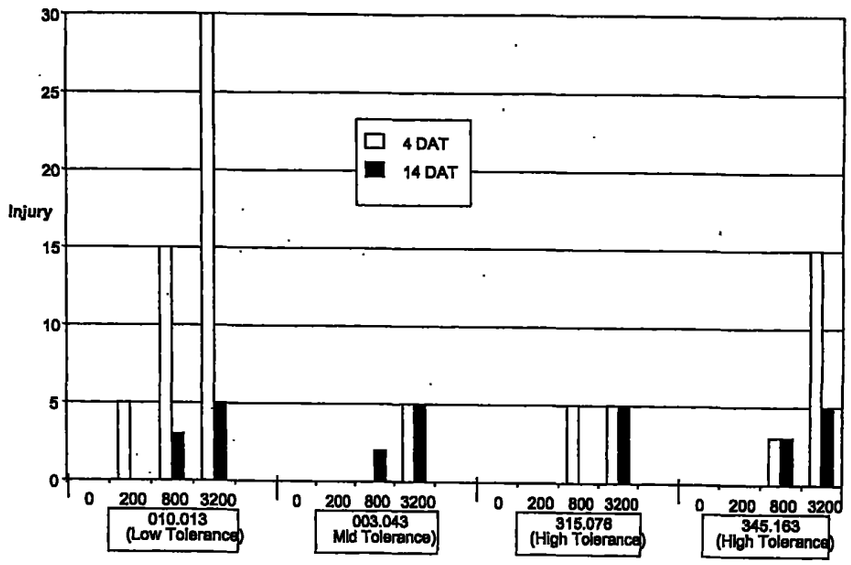

30
25
20
Injury
15
10
5
0
4 DAT
14 DAT
0 200 800 3200
010.013
(Low Tolerance)
0 200 800 3200
003.043
Mid Tolerance)
0 200 800 3200
315.076
(High Tolerance)
0 200 800 3200
345.163
(High Tolerance)

Fig. 9A

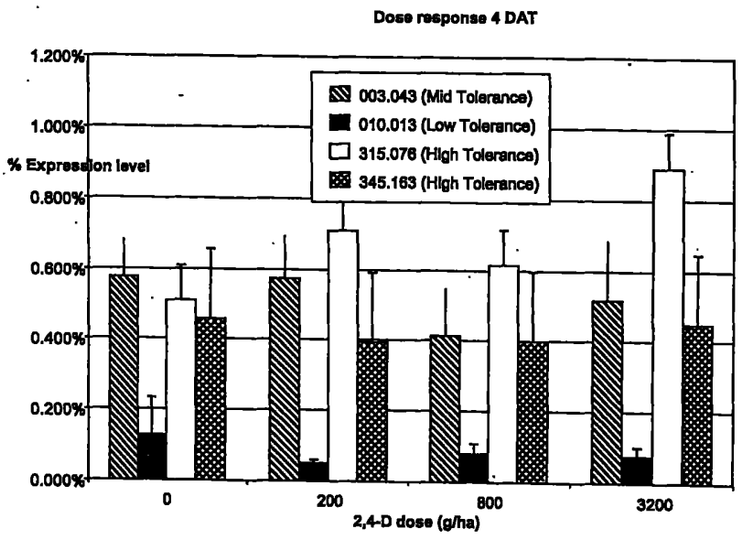

Dose response 4 DAT
1.200%
1.000%
0.800%
0.600%
0.400%
0.200%
0.000%
% Expression level
003.043 (Mid Tolerance)
010.013 (Low Tolerance)
315.076 (High Tolerance)
345.163 (High Tolerance)
0
200
800
3200
2,4-D dose (g/ha)

Fig. 9B

WO 2005/107437

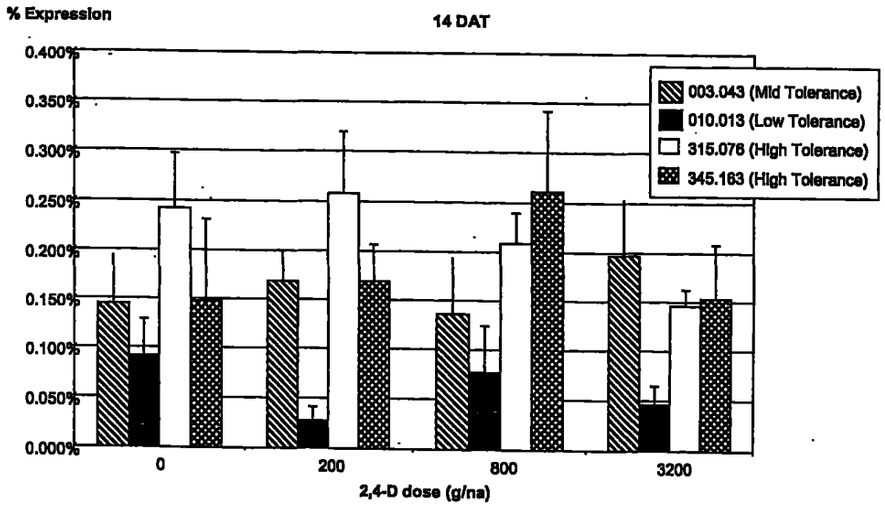


Fig. 9C

PCT/US2005/014737

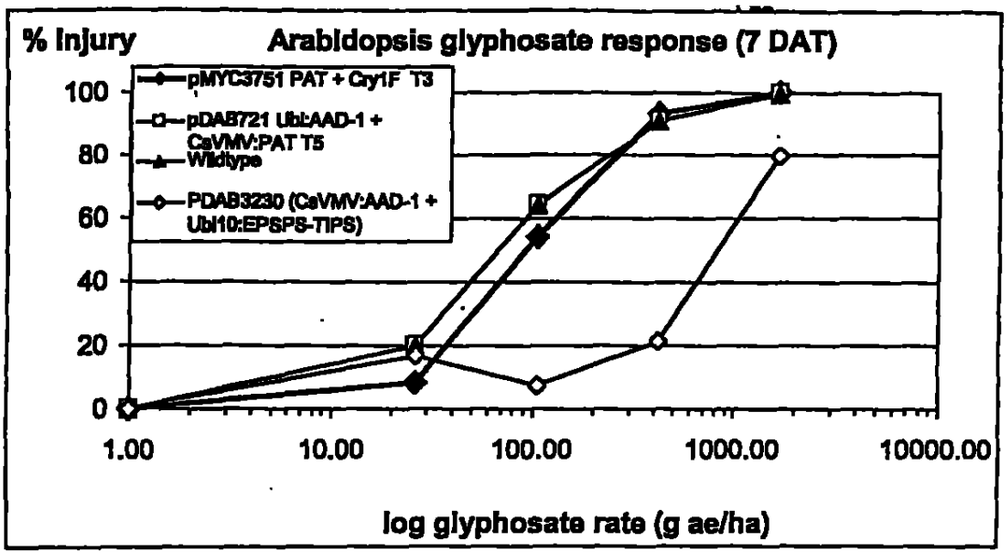

% Injury
Arabidopsis glyphosate response (7 DAT)
pMYC3751 PAT + Cry1F T3
pDAB721 Ubi:AAD-1 + CsVMV:PAT T5
Wildtype
PDAB3230 (CsVMV:AAD-1 + Ubi10:EPSPS-TIPS)
100
80
60
40
20
0
1.00
10.00
100.00
1000.00
10000.00
log glyphosate rate (g ae/ha)

Fig. 10

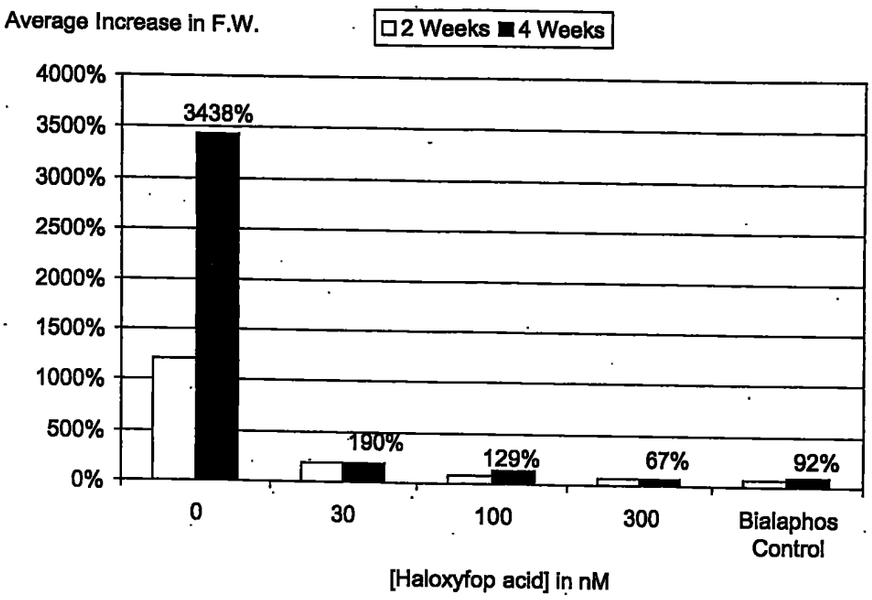

Average Increase in F.W.
2 Weeks
4 Weeks
4000%
3500%
3000%
2500%
2000%
1500%
1000%
500%
0%
3438%
190%
129%
67%
92%
0
30
100
300
Bialaphos Control
[Haloxyfop acid] in nM

Fig. 11

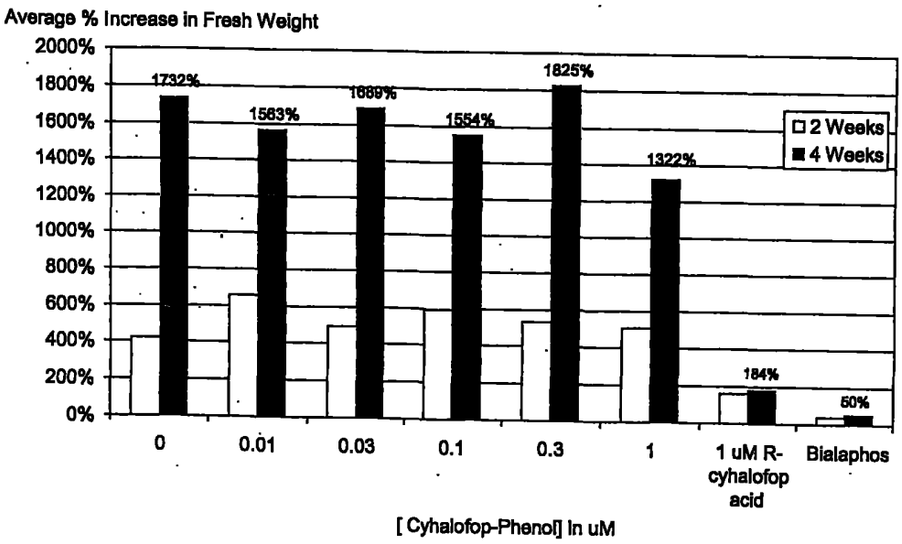

Average % Increase in Fresh Weight
2000%
1800%
1600%
1400%
1200%
1000%
800%
600%
400%
200%
0%
1732%
1563%
1689%
1554%
1825%
1322%
184%
50%
2 Weeks
4 Weeks
0
0.01
0.03
0.1
0.3
1
1 uM R-cyhalofop acid
Bialaphos
[Cyhalofop-Phenol] In uM

Fig. 12

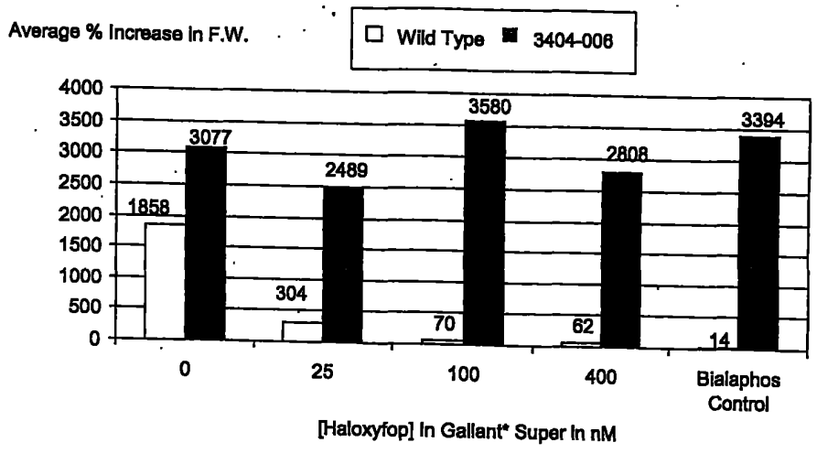

Average % Increase in F.W.
Wild Type
3404-006
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1858
3077
304
2489
70
3580
62
2808
14
3394
0
25
100
400
Bialaphos Control
[Haloxyfop] In Gallant* Super in nM

Fig. 13

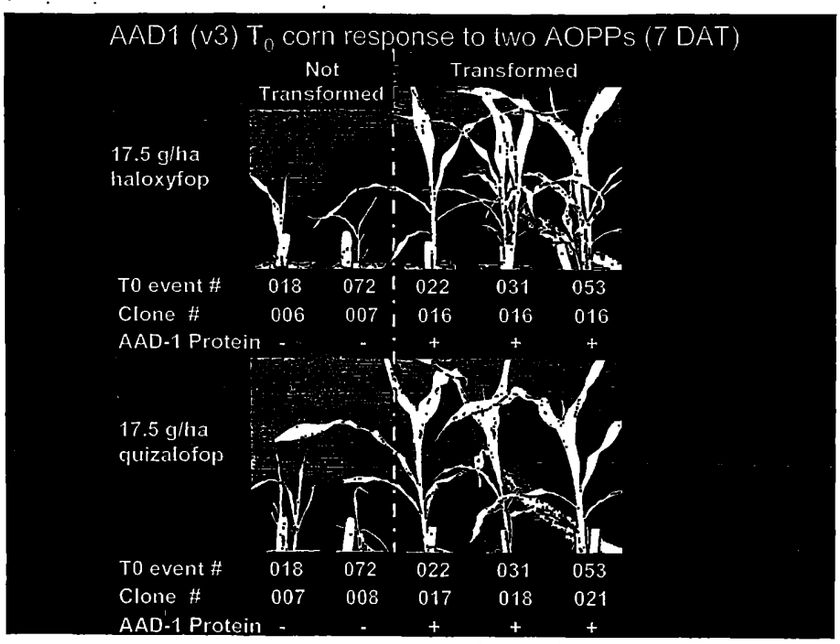

AAD1 (v3) T0 corn response to two AOPPs (7 DAT)
Not Transformed
Transformed
17.5 g/ha haloxyfop
T0 event # 018 072 022 031 053
Clone # 006 007 016 016 016
AAD-1 Protein - - + + +
17.5 g/ha quizalofop
T0 event # 018 072 022 031 053
Clone # 007 008 017 018 021
AAD-1 Protein - - + + +

Fig. 14

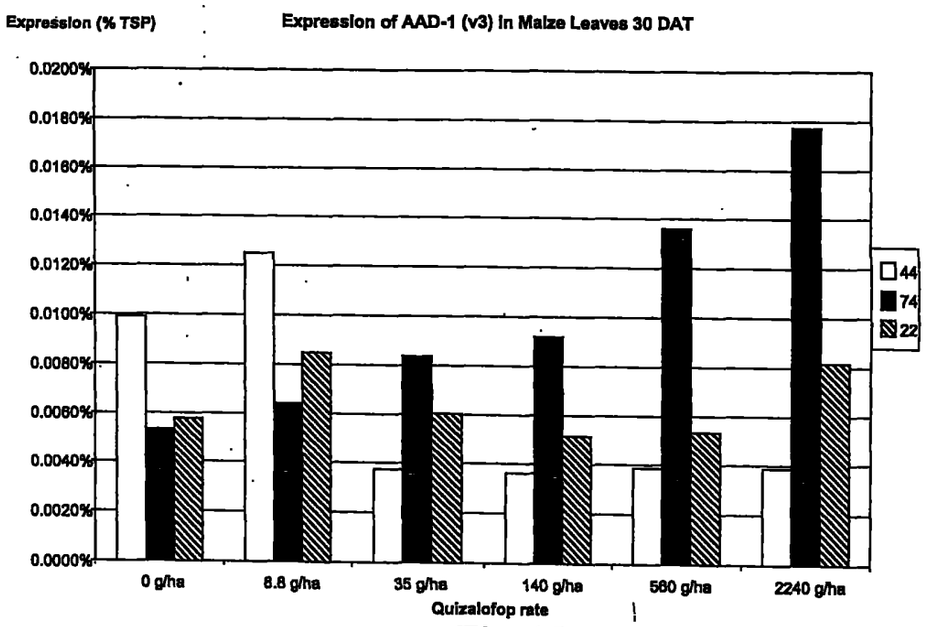

Expression (% TSP)
Expression of AAD-1 (v3) in Maize Leaves 30 DAT
0.0200%
0.0180%
0.0160%
0.0140%
0.0120%
0.0100%
0.0080%
0.0060%
0.0040%
0.0020%
0.0000%
0 g/ha
8.8 g/ha
35 g/ha
140 g/ha
560 g/ha
2240 g/ha
Quizalofop rate
44
74
22

Fig. 15


Corn response to 280 g ae/ha Quizalofop* 9 DAA
(untransformed)
(AAD-1 transformed)

Fig. 16

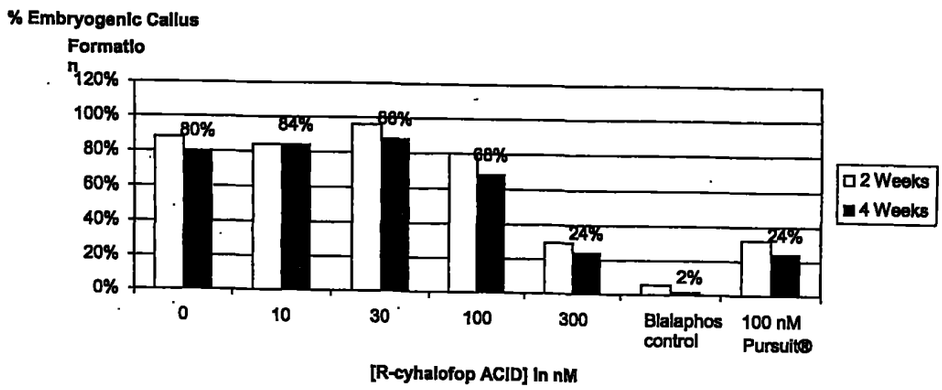


Fig. 17

WO 2005/107437
PCT/US2005/014737



Western

Lane	
1	CalII #1
2	CalII #2
3	Negative
4	AAD1 Corn
5	Standard 5 ug/mL
6	Standard 0.5 ug/mL

Fig. 18

WO 2005/107437

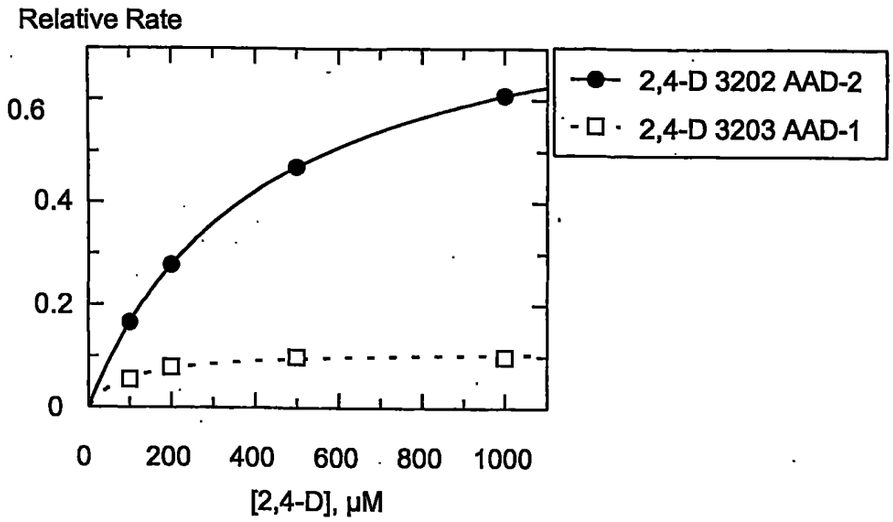


Fig. 19

PCT/US2005/014737

193

WO 2005/107437

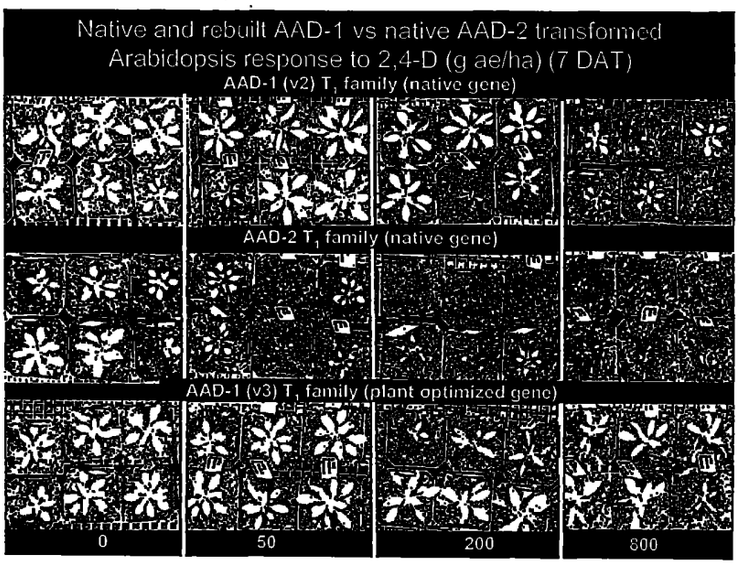


Fig. 20

PCT/US2005/014737

194

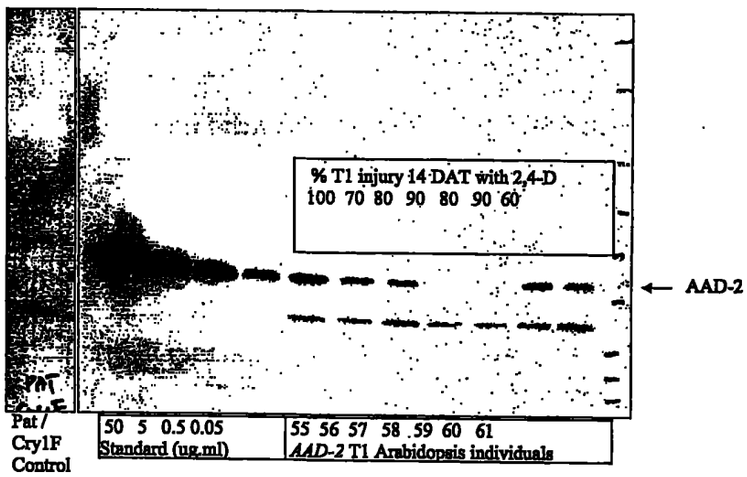

% T1 injury 14 DAT with 2,4-D
100 70 80 90 80 90 60
AAD-2
Pat / Cry1F Control
50 5 0.5 0.05
Standard (ug.ml)
55 56 57 58 59 60 61
AAD-2 T1 Arabidopsis individuals

Fig. 21

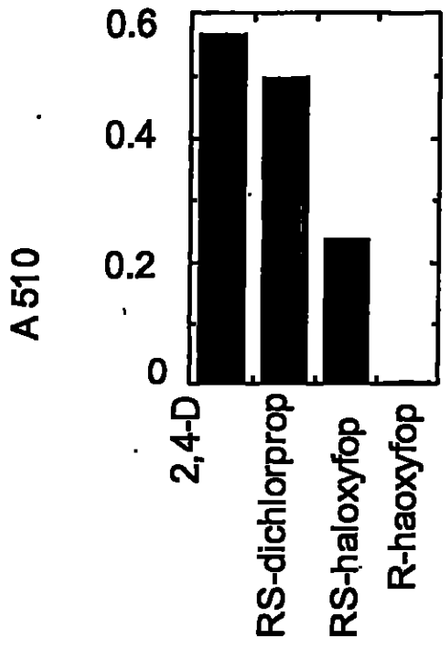


Fig. 22

SEQUENCE LISTING

<110> Dow AgroSciences LLC

<120> Novel Herbicide Resistance Genes

<130> DAS-115XC1

<150> US 60/567,052
<151> 2004-04-30

<160> 32

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer used to amplify the rdpA/AAD-1 (v1) gene

<400> 1
tctagaagga gatataccat gcatgctgca ctgtcccccc tctcccagcg 50

<210> 2
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer used to amplify the rdpA/AAD-1 (v1) gene

<400> 2
ctcgagttac tagcgcgccg ggcgcacgcc accgaccg 38

<210> 3
<211> 915
<212> DNA
<213> Sphingobium herbicidovorans

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(18)
<223> Primer linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (907)..(915)
<223> Primer linker

<400> 3
tctagaagga gatataccat gcatgctgca ctgtcccccc tctcccagcg ctttgagcgc 60

atcgcggtcc agccgctgac cggcgtcctg ggcgccgaga tcaccggcgt cgacctgcgc 120

gagccgctcg acgacagcac ctggaacgaa atcctcgacg cgttccacac ttaccaggtc 180

atctattttc ccggccaggc gatcaccaac gaacagcaca tcgccttcag ccggcgcttc 240

ggccccgtcg atcccgtgcc cctgctcaag agcatcgaag ggtatccaga ggtgcagatg 300

atccgccgcg aagccaacga aagcgggcgt gtgatcggtg aygactggca caccgacagc 360

accttcctgg acgcaccgcc ggccgccgtg gtgatgcgcg cgatcgacgt gcccgagcat 420

ggcggcgaca ccggttttct gagcatgtac accgcgtggg agacgctgtc gcccaccatg 480

caggccacca tcgaagggtt gaacgtagtg cacagcgcca cgcgtgtgtt cggctcgctc 540

taccaggccc agaaccggcg cttcagcaac accagcgtca aggtgatgga cgtcgacgcg 600

ggcgaccgtg aaaccgtgca ccccctggtg gtgacccatc cgggcagcgg ccgcaagggc 660

ctgtacgtga accaggtcta ttgccagcgc atcgagggca tgaccgatgc cgaaagcaaa 720

ccgctgctgc agttcctgta cgagcatgcg acacggttcg atttcacctg ccgcgtgcgc 780

tggaagaagg accaggtcct ggtctgggac aacctgtgca cgatgcaccg ggccgtaccc 840

gactacgcgg gcaagttccg ctacctgacg cgcaccacgg tcggtggcgt gcgcccggcg 900

cgctagtaac tcgag 915

<210> 4
<211> 897
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AAD-1 (v2) primary sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> primer linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (891)..(897)
<223> primer linker

<400> 4
ccatggctgc tgcactgtcc cccctctccc agcgctttga gcgcatcgcg gtccagccgc 60

tgaccggcgt cctgggcgcc gagatcaccg gcgtcgacct gcgcgagccg ctcgacgaca 120

gcacctggaa cgaaatcctc gacgcgttcc acacttacca ggtcatctat tttcccggcc 180

aggcgatcac caacgaacag cacatcgcct tcagccggcg cttcggcccc gtcgatcccg 240

tgcccctgct caagagcatc gaagggtatc cagaggtgca gatgatccgc cgcgaagcca 300

acgaaagcgg gcgtgtgatc ggtgatgact ggcacaccga cagcaccttc ctggacgcac 360

cgccggccgc cgtggtgatg cgcgcgatcg acgtgcccga gcatggcggc gacaccggtt 420

ttctgagcat gtacaccgcg tgggagacgc tgtcgcccac catgcaggcc acgatcgang 400

ggttgaacgt agtgcacagc gccacgcgtg tgttcggctc gctctaccag gcccagaacc 540

ggcgcttcag caacaccagc gtcaaggtga tggacgtcga cgcgggcgac cgtgaaaccg 600

tgcacccccc ggtggtgacc catccgggca gcggctgcaa gggcctgtac gtgaaccagg 660

tctattgcca gcgcatcgag ggcatgaccg atgccgaaag caaaccgctg ctgcagttcc 720

tgtacgagca tgcgacacgg ttcgatttca cctgccgcgt gcgctggaag aaggaccagg 780

tcctggtctg ggacaacctg tgcacgatgc accgggccgt acccgactac gcgggcaagt 840

tccgctacct gacgcgcacc acggtcggtg gcgtgcgccc ggcgcgctag tgagctc 897

<210> 5
<211> 919
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AAD-1 (v3) primary sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> primer linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(8)
<223> additional alanine codon (GCT)

<220>
<221> misc_feature
<222> (894)..(919)
<223> primer linker

<400> 5
ccatggctca tgctgccctc agccctctct cccaacgctt tgagagaata gctgtccagc 60

cactcactgg tgtccttggt gctgagatca ctggagtgga cttgagggaa ccacttgatg 120

acagcacctg gaatgagata ttggatgcct tccacactta ccaagtcatc tactttcctg 180

gccaagcaat caccaatgag cagcacattg cattctcaag aaggtttgga ccagttgatc 240

cagtgcctct tctcaagagc attgaaggct atccagaggt tcagatgatc cgcagagaag 300

ccaatgagtc tggaagggtg attggtgatg actggcacac agactccact ttccttgatg 360

cacctccagc tgctgttgtg atgagggcca tagatgttcc tgagcatggc ggagacactg 420

ggttcctttc aatgtacaca gcttgggaga ccttgtctcc aaccatgcaa gccaccatcg 480

aagggctcaa cgttgtgcac tctgccacac gtgtgttcgg ttcccctctac caagcacaga 540

accgtcgctt cagcaacacc tcagtcaagg tgatggatgt tgatgctggt gacagagaga 600

cagtccatcc cttggttgtg actcatcctg gctctggaag gaaaggcctt tatgtgaatc 660

aagtctactg tcagagaatt gagggcatga cagatgcaga atcaaagcca ttgcttcagt 720

tcctctatga gcatgccacc agatttgact tcacttgccg tgtgaggtgg aagaaagacc 780

aagtccttgt ctgggacaac ttgtgcacca tgcaccgtgc tgttcctgac tatgctggca 840

agttcagata cttgactcgc accacagttg gtggagttag gcctgcccgc tgagtagtta 900

gcttaatcac ctagagctc 919

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> rdpA(ncoI) 5' primer

<400> 6
cccatggctg ctgcactgtc ccccctctcc 30

<210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'sacI primer

<400> 7
gagctcacta gcgcgccggg cgcacgccac cga 33

<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BstEII/ Del NotI 5' primer

<400> 8
tggtggtgac ccatccgggc agcggctgca agggcc 36

<210> 9
<211> 295
<212> PRT
<213> Sphingobium herbicidovorans

<400> 9

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

Val Gln Pro Leu Thr Gly Val Leu Gly Ala Glu Ile Thr Gly Val Asp
20 25 30

Leu Arg Glu Pro Leu Asp Asp Ser Thr Trp Asn Glu Ile Leu Asp Ala
35 40 45

Phe His Thr Tyr Gln Val Ile Tyr Phe Pro Gly Gln Ala Ile Thr Asn
50 55 60

Glu Gln His Ile Ala Phe Ser Arg Arg Phe Gly Pro Val Asp Pro Val
65 70 75 80

Pro Leu Leu Lys Ser Ile Glu Gly Tyr Pro Glu Val Gln Met Ile Arg
85 90 95

Arg Glu Ala Asn Glu Ser Gly Arg Val Ile Gly Asp Asp Trp His Thr
100 105 110

Asp Ser Thr Phe Leu Asp Ala Pro Pro Ala Ala Val Val Met Arg Ala
115 120 125

Ile Asp Val Pro Glu His Gly Gly Asp Thr Gly Phe Leu Ser Met Tyr
130 135 140

Thr Ala Trp Glu Thr Leu Ser Pro Thr Met Gln Ala Thr Ile Glu Gly
145 150 155 160

Leu Asn Val Val His Ser Ala Thr Arg Val Phe Gly Ser Leu Tyr Gln
165 170 175

Ala Gln Asn Arg Arg Phe Ser Asn Thr Ser Val Lys Val Met Asp Val
180 185 190

Asp Ala Gly Asp Arg Glu Thr Val His Pro Leu Val Val Thr His Pro
195 200 205

Gly Ser Gly Arg Lys Gly Leu Tyr Val Asn Gln Val Tyr Cys Gln Arg
210 215 220

Ile Glu Gly Met Thr Asp Ala Glu Ser Lys Pro Leu Leu Gln Phe Leu
225 230 235 240

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

202

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

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

Gly Gly Val Arg Pro Ala Arg
290 295

<210> 10
<211> 295
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AAD-1 v2 Translation

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Different from v1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (212)..(212)
<223> Different from v1

<400> 10

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

Val Gln Pro Leu Thr Gly Val Leu Gly Ala Glu Ile Thr Gly Val Asp
20 25 30

Leu Arg Glu Pro Leu Asp Asp Ser Thr Trp Asn Glu Ile Leu Asp Ala
35 40 45

Phe His Thr Tyr Gln Val Ile Tyr Phe Pro Gly Gln Ala Ile Thr Asn
50 55 60

Glu Gln His Ile Ala Phe Ser Arg Arg Phe Gly Pro Val Asp Pro Val
65 70 75 80

Pro Leu Leu Lys Ser Ile Glu Gly Tyr Pro Glu Val Gln Met Ile Arg
85 90 95

Arg Glu Ala Asn Glu Ser Gly Arg Val Ile Gly Asp Asp Trp His Thr
100 105 110

Asp Ser Thr Phe Leu Asp Ala Pro Pro Ala Ala Val Val Met Arg Ala
115 120 125

Ile Asp Val Pro Glu His Gly Gly Asp Thr Gly Phe Leu Ser Met Tyr
130 135 140

Thr Ala Trp Glu Thr Leu Ser Pro Thr Met Gln Ala Thr Ile Glu Gly
145 150 155 160

Leu Asn Val Val His Ser Ala Thr Arg Val Phe Gly Ser Leu Tyr Gln
165 170 175

Ala Gln Asn Arg Arg Phe Ser Asn Thr Ser Val Lys Val Met Asp Val
180 185 190

Asp Ala Gly Asp Arg Glu Thr Val His Pro Leu Val Val Thr His Pro
195 200 205

Gly Ser Gly Cys Lys Gly Leu Tyr Val Asn Gln Val Tyr Cys Gln Arg
210 215 220

Ile Glu Gly Met Thr Asp Ala Glu Ser Lys Pro Leu Leu Gln Phe Leu
225 230 235 240

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

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

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

Gly Gly Val Arg Pro Ala Arg
290 295

<210> 11
<211> 296
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AAD-1 v3 Translation

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Different from V1

<400> 11

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

Ala Val Gln Pro Leu Thr Gly Val Leu Gly Ala Glu Ile Thr Gly Val
20 25 30

Asp Leu Arg Glu Pro Leu Asp Asp Ser Thr Trp Asn Glu Ile Leu Asp
35 40 45

Ala Phe His Thr Tyr Gln Val Ile Tyr Phe Pro Gly Gln Ala Ile Thr
50 55 60

Asn Glu Gln His Ile Ala Phe Ser Arg Arg Phe Gly Pro Val Asp Pro
65 70 75 80

Val Pro Leu Leu Lys Ser Ile Glu Gly Tyr Pro Glu Val Gln Met Ile
85 90 95

Arg Arg Glu Ala Asn Glu Ser Gly Arg Val Ile Gly Asp Asp Trp His
100 105 110

Thr Asp Ser Thr Phe Leu Asp Ala Pro Pro Ala Ala Val Val Met Arg
115 120 125

Ala Ile Asp Val Pro Glu His Gly Gly Asp Thr Gly Phe Leu Ser Met
130 135 140

Tyr Thr Ala Trp Glu Thr Leu Ser Pro Thr Met Gln Ala Thr Ile Glu
145 150 155 160

Gly Leu Asn Val Val His Ser Ala Thr Arg Val Phe Gly Ser Leu Tyr
165 170 175

Gln Ala Gln Asn Arg Arg Phe Ser Asn Thr Ser Val Lys Val Met Asp
180 185 190

Val Asp Ala Gly Asp Arg Glu Thr Val His Pro Leu Val Val Thr His
195 200 205

Pro Gly Ser Gly Arg Lys Gly Leu Tyr Val Asn Gln Val Tyr Cys Gln
210 215 220

Arg Ile Glu Gly Met Thr Asp Ala Glu Ser Lys Pro Leu Leu Gln Phe
225 230 235 240

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

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

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

Val Gly Gly Val Arg Pro Ala Arg
290 295

<210> 12
<211> 888
<212> DNA
<213> Bradyrhizobium japonicum USDA 110

<400> 12
atgacgatcg ccatccggca gcttcagacg cattttgtcg gccaggtttc cggcctcgat 60

ttgcgaaagc cgctcacgcc gggcgaggcc cgcgaggtcg agtccgccat ggacaaatac 120

gcggtgctcg ttttccacga ccaggacatc accgacgagc agcagatggc tttcgcgctg 180

aacttcggcc agcgcgagga cgcgcgcggc ggcacggtca ccaaggagaa ggactaccgg 240

ctgcaatccg gcctgaacga cgtctccaat ctcggcaagg acggcaagcc gctggccaag 300

gacagccgca cgcacctgtt caatctcggc aactgcctct ggcactccga cagctcgttc 360

cgtcccattc ccgcaaaatt ctcgctgctg tcggcgcgcg tggtgaaccc gacgggcggc 420

aacaccgaat tcgcggacat gcgcgccgcc tatgacgcgc tcgacgacga gaccaaggcc 480

gaaatcgagg acctcgtctg cgagcactcg ctgatgtatt cgcgcggctc gctcggcttc 540

accgagtaca ccgacgaaga gaagcagatg ttcaagccgg tcctgcaacg cctcgtgcgc 600

acccatccgg tccaccgccg caagtcgctg tatctctcgt cgcatgccgg caagatcgcc 660

agcatgagcg tgccggaggg gcggctgctg ttgcgcgatc tcaacgagca cgcgacgcag 720

ccggaattcg tctacgtcca caaatggaag ctgcatgacc tcgtgatgtg ggacaaccgc 780

cagaccatgc accgcgtccg ccgctacgac cagtcccagc cccgcgacat gcgccgcgcg 840

acggtggcgg ggacggagcc gacggtgcag cagcaggcgg cggagtag 888

<210> 13
<211> 289
<212> PRT
<213> Bradyrhizobium japonicum USDA 110

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> brjap 5'(speI)

<400> 14
actagtaaca aagaaggaga tataccatga cgat 34

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> br jap 3' (xhoI)

<400> 15
ttctcgagct atcactccgc cgcctgctgc tgc 33

<210> 16
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> M13 forward primer

<400> 16
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 17
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> M13 reverse primer

<400> 17

caggaaacag ctatgac 17

<210> 18
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NcoI of Brady

<400> 18
tataccacat gtcgatcgcc atccggcagc tt 32

<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SacI of Brady

<400> 19
gagctcctat cactccgccg cctgctgctg cac 33

<210> 20
<211> 525
<212> PRT
<213> Glycine max

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21
<211> 525
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Doubly mutated Soybean EPSPS protein: threonine 183 converted to isoleucine; proline 187 converted to serine

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22
<211> 1604
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Soybean-biased DNA sequence encoding doubly-mutated EPSPS disclosed in SEQ ID NO:21, with added sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1575)
<223> Coding sequence of soybean-biased DNA sequence encoding the EPSPS protien of SEQ ID NO:21

<220>
<221> misc_feature
<222> (1576)..(1578)
<223> Translation terminator tga

<220>
<221> misc_feature
<222> (1579)..(1604)
<223> Sequence included to introduce translation stop codons in all six open reading frames, and to introduce a SacI restriction enzyme recognition site for cloning purposes

<400> 22
atggctcaag tctcccgtgt tcacaatctt gctcagtcaa cccaaatctt tggacattca 60

agcaactcaa acaaactgaa gtctgtgaat tctgtctcac ttcgcccacg cctttgggga 120

gcatccaaga gtcgcatacc aatgcacaag aatgggagtt tcatgggcaa cttcaatgtt 180

gggaaaggca attctggtgt cttcaaagtt tcagcttctg ttgcagccgc agagaaaccc 240

agcacttccc ctgagattgt tcttgaaccc attaaggact tcagtggaac aatcactctg 300

cctggatcaa agagtctttc aaacagaata cttctcttgg cagctctgag tgaaggaacc 360

actgtagttg acaacctttt gtactctgaa gatattcatt acatgttggg tgctctcaga 420

actcttgggt tgagagttga agatgacaag accacaaaac aagccatagt tgaaggatgt 480

ggtgggttgt ttccaacaag caaagaatcc aaagatgaga tcaacttgtt tcttggcaat 540

gctggaattg caatgagaag cctcactgct gcagtagttg cagctggtgg gaatgcaagt 600

tatgtccttg atggtgtccc cagaatgagg gaaaggccca tcggtgacct tgtggctggc 660

ctgaaacagc ttggagcaga tgttgattgc ttcttgggca caaactgccc tccagtgaga 720

gtgaatggga agggaggttt gcctggtgga aaggtcaaac tgagtggatc agtctcttcc 780

cagtatctga ctgccttgct catggctgcc cctctggctt tgggtgatgt ggagattgaa 840

atagtggaca agttgatttc tgttccatat gtggaaatga ccctcaaact catggagagg 900

tttggagttt ctgttgaaca ttctggcaac tgggatcgtt tccttgtaca tggaggtcag 960

aagtacaaaa gccctggcaa tgcctttgtt gaaggggatg caagctctgc ttcctatctc 1020

ttggctgggg ctgccatcac tggtgggacc atcactgtga atggctgtgg cacctcatcc 1080

cttcaaggtg atgtaaagtt tgcagaggtc ttggagaaaa tgggtgccaa ggtcacctgg 1140

tctgagaaca gtgtaactgt gtctggacct cccagagact tcagtggcag aaaggttctc 1200

cgtggaattg atgtgaacat gaacaagatg ccagatgtgg ccatgaccct cgctgttgta 1260

gccctgtttg caaatggacc aactgcaatc cgtgatgttg cttcatggag ggtgaaggag 1320

acagagagga tgattgccat ttgcacagaa ctccgcaaac ttggtgcaac agttgaagag 1380

ggaccagatt actgtgtgat aacccccacct gagaagctca atgtgacagc cattgacacc 1440

tatgatgacc acagaatggc aatggctttc tcccttgctg cctgtggtga tgtgcctgtg 1500

actatcaaag accctgggtg cacaaggaag acatttccag actactttga agttttggag 1560

aggttgacaa agcactgagt agttagctta atcacctaga gctc 1604

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer Pat 5-3

<400> 23
agataccctt ggttggttgc 20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer Pat 3-3

<400> 24
cagatggatc gtttggaagg 20

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> AAD-1 PTU forward primer

<400> 25
ataatgccag cctgttaaac gcc 23

<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> AAD-1 PTU reverse primer

<400> 26
ctcaagcata tgaatgacct cga 23

<210> 27
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Forward primer for Coding Region PCR AAD-1 (RdpAcodF)

<400> 27
atggctcatg ctgccctcag cc 22

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Reverse primer for Coding Region PCR AAD-1 (RdpAcodR)

<400> 28
cgggcaggcc taactccacc aa 22

<210> 29
<211> 932
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> AAD-2 v2 plant-optimized nucleotide

<400> 29
ccatggctac catagcaatc agacagctcc agacccactt tgtgggtcaa gtttctggat 60

tggacctcag aaagccactc actcctggag aagccagaga agttgaatca gctatggaca 120

agtacgcagt tcttgtcttc catgaccaag acatcacaga tgagcaacag atggcctttg 180

ccctcaactt tggtcagagg gaggatgcac gtggtggcac tgtcaccaaa gagaaggatt 240

accgtcttca gtctggcctc aatgatgttt ccaacttggg caaagatgga aagccacttg 300

ccaaggacag ccgcacccat ttgttcaacc ttggaaactg cttgtggcat tctgactcca 360

gcttcagacc aatcccagcc aagttcagcc tcctttctgc tcgtgttgtg aacccaactg 420

gtgggaacac tgagtttgct gacatgagag ctgcctatga tgctcttgac gatgaaacca 480

aagctgagat tgaggacctt gtgtgtgagc actctctcat gtactcaagg ggctcacttg 540

gcttcactga gtacacagat gaagagaagc aaatgttcaa gcccgtcttg cagcgcttgg 600

tccgcacaca ccctgtgcac cgtcgcaaat cactctacct ctccagccat gccggaaaga 660

ttgccagcat gtccgtccct gaagggaggc tccttttgag ggatttgaat gaacatgcta 720

ctcagcctga gttcgtctat gttcacaaat ggaagttgca tgatcttgtg atgtgggaca 780

ataggcaaac catgcacaga gtgaggagat atgaccagtc ccaacccaga gacatgcgcc 840

gtgcaacagt tgctgggacc gagcccacag tgcaacagca agcagcagag tgagtagtta 900

gcttaatcac ctagagctcg gtcaccagat ct 932

<210> 30
<211> 296
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Translated AAD-2 v2 protein

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Gln Gln Gln Ala Ala Glu
290 295

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Southern fragment PCR AAD-1 forward primer

<400> 31
atggctcatg ctgccctcag cc 22

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Southern fragment PCR AAD-1 reverse primer

<400> 32
gggcaggcct aactccacca a 21

219

NUEVOS GENES CON RESISTENCIA A LOS HERBICIDAS

Referencia Cruzada a Solicitud Relacionada

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Estadounidense Provisoria Acta No. 60/567.052, presentada el 30 de abril de 2004.

Antecedentes de la Invención

Las malezas pueden agotar rápidamente el suelo de nutrientes valiosos necesarios para cultivos y otras plantas deseables. Existen muchos tipos diferentes de herbicidas utilizados actualmente para el control de malezas. Un herbicida extremadamente popular es el glifosato.

Se han desarrollado cultivos, tales como maíz, soja, canola, algodón, remolacha, trigo, césped y arroz, que son resistentes al glifosato. De este modo, se pueden fumigar campos con maíz resistente al glifosato activamente creciente, por ejemplo, para controlar las malezas sin dañar significativamente las plantas de maíz.

Con la introducción a mediados de la década de 1990 de cultivos tolerantes al glifosato diseñados genéticamente (GTC), los agricultores dispusieron de una herramienta simple, conveniente, flexible y de bajo costo para controlar un amplio espectro de malezas de hoja ancha y gramíneas sin parangón en la agricultura. En consecuencia, los productores adoptaron rápidamente los GTC y en muchos casos abandonaron muchas de las prácticas agronómicas más aceptadas tales como la rotación de cultivos, acción por rotación con modalidad herbicida, mezclado en tanque, incorporación de mecánica con control químico y de cultivo de malezas. La soja, algodón, maíz y canola normalmente tolerantes al glifosato están disponibles en el comercio en los Estados Unidos y en otros sitios del Hemisferio Occidental. Más GTC (por ejemplo trigo, arroz, remolacha, césped, etc.) están suspendidos en su introducción a la espera de su aceptación por el mercado global. Muchas otras especies resistentes al glifosato están en etapas

220

que van de la experimentación al desarrollo (por ejemplo, alfalfa, caña de azúcar, girasol, remolacha, habas, zanahoria, pepino, lechuga, cebolla, frutilla, tomate y tabaco; especies forestales tales como chopo y copalillo; y especies hortícolas tales como caléndulas, petunias y begonias; ver sitio web "isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005"). Además, el costo del glifosato ha disminuido drásticamente en los años recientes hasta el punto que pocos programas de control de malezas convencionales pueden competir eficazmente en precio y rendimiento con los sistemas GTC de glifosato.

El glifosato ha sido utilizado con éxito en áreas consumidas totalmente por el fuego y otras áreas no cultivadas para el control de vegetación total durante más de 15 años. En muchos casos, como con los GTC, el glifosato ha sido utilizado de 1 a 3 veces por año durante 3, 5, 10, hasta 15 años en una fila. Estas circunstancias han conducido a un exceso de confianza en el glifosato y a la tecnología de GTC y han colocado una pesada presión de selección sobre las especies de malezas nativas para plantas que son naturalmente más tolerantes al glifosato o que han desarrollado un mecanismo para resistir la actividad herbicida del glifosato.

El uso extensivo de los programas de control de malezas sólo con glifosato está dando por resultado la selección de malezas resistentes al glifosato, y está seleccionando la propagación de especies de malezas que son inherentemente más tolerantes al glifosato que la mayoría de las especies atacadas (es decir, cambios de malezas). (Ng *et al.*, 2003; Simarmata *et al.*, 2003; Lorraine-Colwill *et al.*, 2003; Sfiligoj, 2004; Miller *et al.*, 2003; Heap, 2005; Murphi *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2002.) Si bien el glifosato ha sido utilizado ampliamente de manera global durante más de 15 años, sólo se ha informado de un puñado de malezas que han desarrollado resistencia al glifosato (Heap, 2005); sin embargo, la mayoría de estas han sido identificadas en los pasados 3 a 5 años. Las malezas

resistentes incluyen tanto especies gramíneas como de hoja ancha —*Lolium rigidum, Lolium multiflorum, Eleusine indica, Ambrosia artemisiifolia, Conyza canadensis, Conyza bonariensis,* y *Plantago lanceolata.* Además, las malezas que no han sido previamente un problema agronómico previo al amplio uso de los GTC ahora se están tornando más frecuentes y difíciles de controlar en el contexto de los GTC, que comprenden >80% del área cultivada de algodón y soja en Estados Unidos y >20% del área cultivada de maíz en Estados Unidos (Gianessi, 2005). Estos cambios de malezas se están produciendo en forma predominante (aunque no exclusiva) con las malezas de hoja ancha difíciles de controlar. Algunos ejemplos incluyen especies de *Ipomoea, Amaranthus, Chenopodium, Taraxacum* y *Commelina.*

En áreas donde los agricultores se encuentran con malezas resistentes al glifosato o un cambio a especies de malezas más difíciles de controlar, los agricultores pueden compensar las debilidades del glifosato con el mezclado en tanque o alternando con otros herbicidas que controlen las malezas perdidas. Un compañero de tanque de mezcla popular y eficaz para controlar especies de hoja ancha en muchos casos ha sido el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). El 2,4-D ha sido utilizado para uso agronómico y en situaciones de no cultivo para el control de malezas de hoja ancha de amplio espectro durante más de 60 años. Se han informado casos individuales de especies más tolerantes, pero el 2,4-D sigue siendo uno de los herbicidas más ampliamente utilizados en forma global. Una limitación al uso adicional del 2,4-D es que su selectividad en cultivos dicotiledóneos como la soja o el algodón es muy baja, y por lo tanto el 2,4-D no se utiliza típicamente en (y en general ni en las cercanías de) cultivos dicotiledóneos sensibles. Además, el uso del 2,4-D en cultivos de malezas está limitado de algún modo por la naturaleza del daño que le pueda ocurrir al cultivo. El 2,4-D en combinación con el glifosato ha sido utilizado para dar un tratamiento de

"quemado" más fuerte antes de la plantación directa de soja y algodón; sin embargo, debido a la sensibilidad de estas especies dicotiledóneas al 2,4-D, estos tratamientos de "quemado" deben ocurrir al menos 14-30 días antes de la plantación (Agriliance, 2003).

El 2,4-D está dentro de la clase de herbicidas de los fenoxiácidos, como lo son el MCPA, mecoprop, y diclorprop. El 2,4-D ha sido utilizado en muchos cultivos monocotiledóneos (tales como maíz, trigo, y arroz) para el control selectivo de malezas de hoja ancha sin dañar seriamente las plantas de cultivo deseadas. El 2,4-D es un derivado de auxina sintético que actúa para desregular la homeostasis hormonal celular normal e impedir el crecimiento equilibrado y controlado; sin embargo, el modo exacto de acción todavía no se conoce.

El 2,4-D tiene diferentes niveles de selectividad sobre ciertas plantas (por ejemplo las dicotiledóneas son más sensibles que los pastos). El metabolismo diferencial del 2,4-D por diferentes plantas es una explicación para los variados niveles de selectividad. En general, las plantas metabolizan lentamente el 2,4-D, de modo que la respuesta variada de la planta al 2,4-D puede explicarse mejor probablemente por la diferente actividad en el(los) sitio(s) blanco. (WSSA, 2002). El metabolismo vegetal del 2,4-D se produce típicamente mediante un mecanismo de dos fases, típicamente hidroxilación seguida de conjugación con aminoácidos o glucosa (WSSA, 2002).

A lo largo del tiempo, las poblaciones microbianas han desarrollado una vía eficiente y alternativa para la degradación de este xenobiótico particular, que da por resultado la completa mineralización del 2,4-D. Aplicaciones sucesivas del herbicida seleccionan microorganismos que pueden utilizar el herbicida como fuente de carbono para el crecimiento, dándoles una ventaja competitiva en el suelo. Por esta razón, el 2,4-D normalmente se formula con un tiempo de vida útil en el suelo relativamente corto, y no se encuentran efectos significativos

remanentes para los cultivos subsiguientes. Esto se agrega a la utilidad herbicida del 2,4-D.

Un organismo que ha sido investigado extensamente por su capacidad de degradar el 2,4-D es *Ralstonia eutropha* (Streber *et al.*, 1987). El gen que codifica para el primer paso enzimático en la vía de mineralización es el *tfdA*. Ver la Patente Estadounidense No. 6.153.401 y Acceso a GENBANK No. M16730. El *tfdA* cataliza la conversión del ácido 2,4-D a diclorofenol (DCP) mediante una reacción de dioxigenasa dependiente de α-cetoglutarato (Smejkal *et al.*, 2001). El DCP tiene poca actividad herbicida en comparación con el 2,4-D. El *tfdA* ha sido 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).

Una gran cantidad de genes del tipo *tfdA* que codifican proteínas capaces de degradar al 2,4-D han sido identificados del medio ambiente y depositados en la base de datos del Genbank. Muchos homólogos son similares al *tfdA* (>85% de identidad de aminoácidos) y tienen propiedades enzimáticas similares al *tfdA*. Sin embargo, existe una cantidad de homólogos que tienen una identidad significativamente más baja con el *tfdA* (25-50%), aunque tienen los residuos característicos asociados con las Fe^{+2} dioxigenasas del tipo α-cetoglutarato dioxigenasa. Por lo tanto no es obvio cuáles son las especificidades de sustrato de estas dioxigenasas divergentes.

Un único ejemplo con homología baja al *tfdA* (28% de identidad de aminoácidos) es el *rdpA* del *Sphingobium herbicidovorans* (Kohler *et al.*, 1999, Westendorf *et al.*, 2002). Se ha demostrado que esta enzima cataliza la primera etapa en la mineralización del (R)-diclorprop (y otros ácidos (R)-fenoxipropiónicos) como así también del 2,4-D (un ácido fenoxiacético) (Westendorf *et al.*, 2003). Si

bien los organismos que degradan el ácido fenoxipropiónico se describieron algún tiempo atrás, hasta hace poco tiempo se ha hecho poco progreso en la caracterización de esta vía (Horvath *et al.*, 1990). Otra complicación a la degradación del diclorprop es la estereoespecificidad (R *vs.* S) involucrada tanto en la recaptación (Kohler, 1999) como en la oxidación inicial del diclorprop (Westendorf *et al.*, 2003). La expresión heteróloga del *rdpA* en otros microorganismos, o la transformación de este gen en plantas, no ha sido informada hasta el momento. La literatura se ha dedicado esencialmente a los homólogos próximos al *tfdA* que degradan esencialmente los ácido fenoxiacéticos aquirales (*por ejemplo* el 2,4-D).

El desarrollo de nuevas tecnologías de cultivos tolerantes a herbicidas (HTC) ha sido de éxito limitado debido principalmente a la eficacia, bajo costo y conveniencia de los GTC. En consecuencia, se ha dado una proporción muy elevada de adopción de los GTC entre los productores. Esto resultó un incentivo muy bajo para desarrollar nuevas tecnologías de HTC.

Las subestructuras químicas de ariloxialcanoato son una entidad común de muchos herbicidas comercializados, incluyendo las fenoxi auxinas (tales como 2,4-D y diclorprop), piridiloxi auxinas (tales como fluroxipir y triclopir), ariloxifenoxipropionatos (AOPP) inhibidores de acetil-coenzima A carboxilasa (ACCasa) (tales como haloxifop, quizalofop, y diclofop), e inhibidores de fenoxiacetato protoporfirinógeno 5-sustituido oxidasa IX (tales como piraflufen y flumiclorac). Sin embargo, estas clases de herbicidas son todas bastante distintas, y no existe evidencia en la literatura actual de vías comunes de degradación entre estas clases químicas. El descubrimiento de una enzima multifuncional para la degradación de herbicidas que cubra múltiples modos sería tanto único como valioso como una característica de los HTC.

Síntesis de la Invención

La presente invención aporta nuevas plantas que no sólo son resistentes al 2,4-D, sino además a los herbicidas tipo AOPP. Hasta ahora, no había expectativa o sugerencia de que se pudiera producir una planta con ambas propiedades ventajosas mediante la introducción de un gen único. La presente invención además incluye plantas que producen una o más enzimas de la presente invención "apiladas" junto con uno o más genes con resistencia al herbicida, incluyendo, pero sin limitación, genes con resistencia al glifosato, imidazolinona y glufosinato, para aportar plantas tolerantes a los herbicidas compatibles con más amplias y más fuertes opciones de manejo de resistencia a los herbicidas y control de malezas. La presente invención además incluye métodos y composiciones que utilizan homólogos de los genes y proteínas ejemplificados en la presente.

En algunas realizaciones, la invención aporta plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas tolerantes al 2,4-D, AOPP, y uno o más herbicidas comerciales (por ejemplo glifosato, imidazolinonas, glufosinato, sulfonilureas, dicamba, bromoxinil y otros). Además se revelan vectores que comprenden secuencias de ácidos nucleicos responsables de tal tolerancia herbicida, como son los métodos para utilizar tales plantas tolerantes y combinaciones de herbicidas para el control y prevención de cambios de la población de malezas. La presente invención permite que las nuevas combinaciones de herbicidas se utilicen en formas nuevas. Además, la presente invención aporta nuevos métodos para prevenir el desarrollo de, y el control de, cepas de malezas que son resistentes a uno o más herbicidas tales como el glifosato. La presente invención permite nuevos usos de nuevas combinaciones de herbicidas y cultivos, incluyendo la aplicación de preplantas a un área a ser plantada inmediatamente antes de cultivarse con

semillas para plantas que de otro modo serían sensibles a ese herbicida (tal como 2,4-D).

La presente invención se refiere en parte a la identificación de una enzima que no sólo puede degradar el 2,4-D, sino además posee sorprendentemente nuevas propiedades, que distinguen a la enzima de la presente invención de las proteínas *tfdA* conocidas previamente, por ejemplo. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de una enzima que es capaz de degradar tanto los herbicidas 2,4-D como AOPP, de una manera enantioespecifica. No se ha informado previamente de ninguna enzima dioxigenasa dependiente de α-cetoglutarato que tenga la capacidad de degradar herbicidas de diferentes clases químicas y modos de acción. La enzima y el gen preferidos para su uso de acuerdo con la presente invención se denominan *AAD-1* (AriloxiAlcanoato Dioxigenasa). Este descubrimiento muy novedoso es la base de la característica significativa de los HTC y de las oportunidades de los marcadores seleccionables.

No había motivación anterior para producir plantas que contengan un gen *AAD-1* (preferentemente un polinucleótido de *AAD-1* que tiene una secuencia optimizada para la expresión en uno o más tipos de plantas, según se ejemplifica en la presente), y no había expectativas de que tales plantas pudiesen producir eficazmente una enzima AAD-1 para obtener las plantas resistentes a no sólo herbicidas tipo fenoxiácido (tales como 2,4-D) sino además a herbicidas tipo AAOP (tales como quizalofop, haloxifop, *etc.*). De este modo la presente invención aporta muchas ventajas que hasta ahora se creían imposibles en la técnica.

Esta invención además se refiere en parte a la identificación y al uso de genes que codifican las enzimas ariloxialcanoato dioxigenasa que son capaces de degradar los herbicidas del tipo fenoxi auxina y ariloxifenoxipropionato. Los métodos para seleccionar las proteínas que poseen estas actividades están

dentro del alcance de la presente invención. De este modo, la presente invención incluye la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros herbicidas tipo fenoxialcanoato auxina y herbicidas tipo ariloxifenoxipropionato mediante una enzima AAD-1 expresada en forma recombinante. La presente invención además incluye métodos para el control de malezas donde dichos métodos comprenden la aplicación de uno o más herbicidas tipo AOPP, fenoxi auxina u otros herbicidas tipo ariloxialcanoato a las plantas que contienen un gen *AAD-1*. La presente invención además aporta métodos para utilizar un gen *AAD-1* como marcador seleccionable para identificar células de plantas y plantas completas transformadas con *AAD-1*, que incluye opcionalmente uno, dos, o más genes exógenos insertados simultáneamente en células de plantas blanco. Los métodos de la presente invención incluyen seleccionar células transformadas que son resistentes a niveles apropiados de un herbicida. La presente invención además incluye métodos para preparar un polipéptido, que tiene la actividad biológica de la ariloxialcanoato dioxigenasa, cultivando plantas y/o células de la presente invención.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra un esquema general para la escisión por parte de la dioxigenasa de herbicidas tipo fenoxi auxina o AOPP.

La Figura 2 muestra la pérdida de actividad herbicida de una solución de 2,4-D tratada con AAD-1.

La Figura 3 muestra la pérdida de actividad herbicida de una solución de haloxifop tratada con AAD-1.

La Figura 4 muestra fenoles anticipados producidos a partir de herbicidas representativos catalizados por AAD-1.

La Figura 5 muestra la producción de 2,4-diclorofenol por *AAD-1* recombinante.

Las Figuras 6A y 6B muestran la producción de fenol por *AAD-1* recombinante a partir de varios sustratos herbicidas.

La Figura 7 muestra la velocidad de reacción con AAD-1 respecto de la concentración de sustrato para cuatro sustratos herbicidas.

Las Figuras 8A y 8B muestran que *AAD-1 (v3)* se expresó igualmente en hojas de *Arabidopsis* de diferentes edades pero continuó acumulándose a lo largo de los 25 días del experimento. Las plantas que no se fumigaron con el herbicida 2,4-D (panel A) expresaron un poco más de AAD-1 (v3) que las que habían sido fumigadas (panel B). Las barras representan la media ± SEM de cinco hojas de cinco plantas diferentes, con la expresión porcentual de AAD-1 (v3) normalizada a la proteína soluble total. Las barras claras representan las terceras hojas jóvenes (N-3) recolectadas de la parte superior, las barras oscuras representan las quintas hojas más viejas de la parte inferior.

Las Figuras 9A, 9B y 9C muestran el daño de las plantas de *Arabidopsis* después del tratamiento con 2,4-D. Cuatro líneas diferentes se trataron, cada una, con cuatro dosis diferentes de 2,4-D y el daño se midió 4 (panel A) y 14 (panel B) días después del tratamiento. Además se determinó su expresión de AAD-1 (v3) en hojas utilizando ELISA (panel C). Los resultados fueron la media ± SEM de cinco hojas de cinco plantas diferentes que recibieron el mismo tratamiento.

La Figura 10 ilustra que la *Arabidopsis* (*AAD-1* + *EPSPS*) transformada con pDAB3230 muestra un nivel de tolerancia al glifosato 14 veces mayor, 7 días después del tratamiento (DAT, siglas en inglés), que las líneas de *Arabidopsis* de control de tipo salvaje y transformadas.

La Figura 11 muestra la respuesta a la dosis de suspensiones de maíz callosas al R-haloxifop.

La Figura 12 muestra que a una concentración 1 µM de cihalofop fenol, el crecimiento es aún el 76% del control sin cihalofop fenol.

La Figura 13 ilustra los datos de respuesta a la dosis en un evento transgénico, 3404-006, al haloxifop.

La Figura 14 muestra las respuestas de varios clones de evento no transformado y transformado con *AAD-1 (v3)* a dosis letales de dos herbicidas de tipo AOPP (haloxifop y quizalofop) aplicados como un rocío de post-emergencia una semana antes.

La Figura 15 muestra tres linajes T2 diferentes a partir de transformaciones 3404 que se pre-seleccionaron con Liberty® para eliminar los nulos, que se eligieron para comparar su tolerancia al quizalofop con respecto a su expresión de AAD-1. La expresión se midió a los 14 DAT (no se muestran datos) y a los 30 DAT.

La Figura 16 muestra el maíz transformado con *AAD-1 (v3)* tolerante a 8 veces las dosis de campo de quizalofop (Assure II) en condiciones de campo.

La Figura 17 ilustra los datos de embriones de maíz inmaduros desarrollados en medios que contienen cihalofop.

La Figura 18 muestra el análisis de transferencia Western sobre callos de soja transformados con el gen *AAD-1 (V3)*, indicando que las células de callos están expresando la proteína AAD-1 (v3).

La Figura 19 muestra curvas ajustadas para las velocidades de degradación del 2,4-D por AAD-2 (v1) vs. AAD-1 (v1).

La Figura 20 muestra la respuesta de *Arabidopsis* T_1 transformada con *AAD-1 v3* (planta optimizada), o *AAD-1 (v2)* (nativa), *AAD-2 (v1)* (nativa), o *AAD-2 (v2)* (planta optimizada) frente a un rango de dosis de 2,4-D aplicadas en post-emergencia. Cada maceta representa un evento de transformación individual dentro de cada familia del gen T_1.

La Figura 21 muestra el análisis de transferencia western de plantas *Arabidopsis* T_1 transformadas con *AAD-2 (v1)*. Esto muestra que las plantas que

expresan la proteína AAD-2 (v1) están sufriendo un severo daño por tratamientos de 2,4-D de 200 g de ea (equivalente de ácido)/ha, que normalmente causa un leve daño a *Arabidopsis* nativa *AAD-1 (v2)* o transformada con *AAD-1 (v3)* de planta optimizada. La proteína AAD-2 se identifica sobre el gel. Varias bandas de fondo se detectaron en muestras transformadas con *AAD-2* y *Pat/Cry1F*.

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

Breve Descripción de las Secuencias

SEC ID NO:1 es la secuencia de un cebador delantero utilizado para amplificar el gen *rdpA/AAD-1 (v1)*.

SEC ID NO:2 es la secuencia de un cebador inverso utilizado para amplificar el gen *rdpA/AAD-1 (v1)*.

SEC ID NO:3 es la secuencia nucleotídica de *AAD-1 (v1)* del *Sphingobium herbicidovorans*.

SEC ID NO:4 es la secuencia de ácido nucleico del gen *AAD-1* nativo con el sitio de restricción NotI interno eliminado. Este gen se denomina *AAD-1 (v2)*. El secuenciamiento de ADN confirmó que se generó el producto de PCR correcto, pero se produjo un cambio inadvertido en el aminoácido #212 de arginina a cisteína.

SEC ID NO:5 es una secuencia de ADN de "planta-optimizada" *AAD-1 (v3)*. Este "gen" codifica la SEC ID NO:11, la cual es la misma que la SEC ID NO:9 salvo por el agregado de un residuo de alanina en la segunda posición. El codón de alanina adicional (GCT) se incluyó para codificar un sitio NcoI (CCATGG) extendiéndose sobre el codón de inicio ATG, para permitir las operaciones de clonación subsiguientes.

SEC ID NO:6 ("rdpA(ncoI)") y **SEC ID NO:7** ("3'saci") se utilizaron para amplificar un fragmento de ADN utilizando el Sistema Fail Safe PCR (Epicenter).

SEC ID N :8 es otro cebador de PCR ("BstEII/Del NotI") que se utilizó con el cebador "3' SacI".

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

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

SEC ID NO:11 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN *AAD-1 (v3)* de planta optimizada de la SEC ID NO:5.

SEC ID NO:12 es la secuencia de ADN del gen *AAD-2 (v1)* nativo.

SEC ID NO:13 es la secuencia de aminoácidos de la proteína AAD-2 (v1).

SEC ID NO:14 es un cebador delantero utilizado para amplificar el ADN de *AAD-2 (v1)* para clonación.

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

SEC ID NO:16 es el cebador delantero M13.

SEC ID NO:17 es el cebador inverso M13.

SEC ID NO:18 es un cebador delantero utilizado para amplificar ADN de *AAD-2 (v1)* para clonación.

SEC ID NO:19 es un cebador inverso utilizado para amplificar ADN de *AAD-2 (v1)* para clonación.

SEC ID NO:20 es la proteína EPSPS de soja nativa.

SEC ID NO:21 es una secuencia de la proteína EPSPS de soja doblemente mutada, que contiene una mutación en el residuo 183 (treonina de la proteína nativa, reemplazada con isoleucina), y en el residuo 187 (prolina en la proteína nativa reemplazada con serina).

SEC ID NO:22 es la secuencia de ADN orientada a la soja que codifica la proteína EPSPS de la SEC ID NO:21.

SEC ID NO:23 es el cebador Pat 5-3.

SEC ID NO:24 es el cebador Pat 3-3.

SEC ID NO:25 es el cebador delantero AAD-1 PTU.

SEC ID NO:26 es el cebador inverso AAD-1 PTU.

SEC ID NO:27 es el cebador delantero para la Región Codificadora PCR AAD-1.

SEC ID NO:28 es el cebador inverso para la Región Codificadora PCR AAD-1.

SEC ID NO:29 es el nucleótido *AAD-2 (v2)* (optimizado de planta).

SEC ID NO:30 es la secuencia proteica AAD-2 (v2) traducida.

SEC ID NO:31 es el cebador delantero PCR AAD-1 del fragmento Southern.

SEC ID NO:32 es el cebador inverso PCR AAD-1 del fragmento Southern.

Descripción detallada de la invención

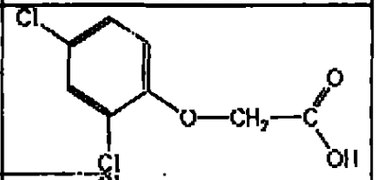
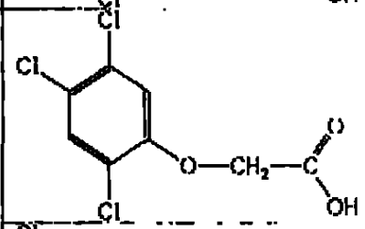
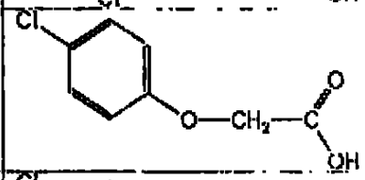
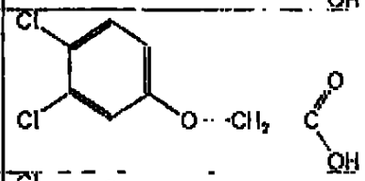
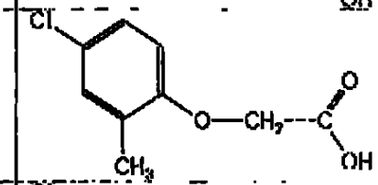
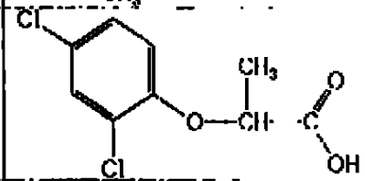
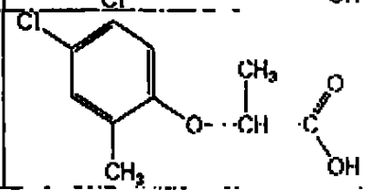
El presente desarrollo de un gen con resistencia al 2,4-D y cultivos resistentes subsiguientes aporta excelentes opciones para controlar especies de malezas resistentes al glifosato, de hoja ancha (o muy tolerantes y cambiantes) para aplicaciones en cultivos. El 2,4-D es un herbicida para malezas de hoja ancha, de amplio espectro, relativamente barato y fuerte, que aportaría una excelente utilidad para los agricultores si pudiera aportarse una mayor tolerancia del cultivo en cultivos dicotiledóneos y monocotiledóneos por igual. Los cultivos dicotiledóneos transgénicos tolerantes al 2,4-D también contarían con mayor flexibilidad en el tiempo y dosis de aplicación. Otra utilidad de una característica de tolerancia al herbicida para el 2,4-D sería su utilidad para prevenir el daño a cultivos normalmente sensibles a la acumulación del 2,4-D, volatilización, inversión (u otro fenómeno de movimiento fuera de su emplazamiento habitual), mala aplicación, vandalismo y similares. Otro beneficio adicional del gen AAD-1

es que a diferencia de todos los homólogos de *tfdA* caracterizados hasta la fecha, el AAD-1 es capaz de degradar los enantiómeros R (isómeros activos como herbicidas) de las fenoxi auxinas quirales (por ejemplo diclorprop y mecoprop) además de las fenoxi auxinas aquirales (*por ejemplo*, 2,4-D, MCPA, ácido 4-clorofenoxiacético). *Ver* **Tabla 1**. Las mezclas múltiples de diferentes combinaciones de fenoxi auxinas han sido utilizadas de manera global para apuntar a espectros de malezas específicos y condiciones ambientales en diversas regiones. El uso del gen AAD-1 en plantas aportaría protección contra un espectro más amplio de herbicidas tipo fenoxi auxina, incrementando de este modo la flexibilidad y los espectros de malezas que pueden controlarse, protegiéndolos de la acumulación u otro daño del herbicida tipo fenoxi fuera del emplazamiento habitual para la gama total de fenoxi auxinas disponibles en el comercio.

Tabla 1. Fenoxi auxinas disponibles en el comercio. En general se denomina herbicidas tipo fenoxi auxinas a los ácidos activos pero algunos se formulan comercialmente como cualquiera de una variedad de formulaciones de ésteres correspondientes y éstos se consideran de igual modo sustratos para la enzima AAD-1 *in planta* ya que las esterasas generales de las plantas convierten a estos ésteres en los ácidos activos *in planta*. De igual modo también se puede hacer referencia a la sal orgánica o inorgánica correspondiente del ácido correspondiente. Cuando se indican herbicidas derivados del ácido propiónico, sal o éster quirales, los racematos (R,S) o los enantiómeros (R o S) ópticamente purificados se consideran los mismos herbicidas a los fines de nombrar estos herbicidas, aún cuando diferentes números CAS puedan corresponder a compuestos ópticamente puros. Los rangos de proporción de uso posibles pueden ser como tratamientos aislados o en combinación con otros herbicidas en usos de cultivo y no cultivo.

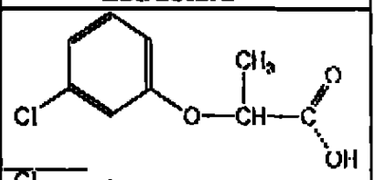
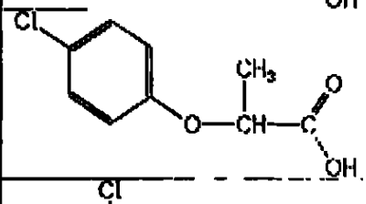
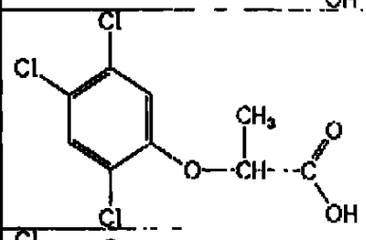
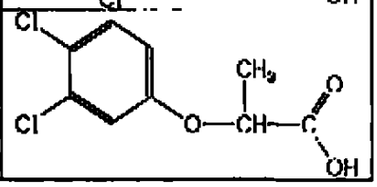
234

Tabla 1. Fenoxi auxinas disponibles en el comercio

Nombre químico	CAS no.	Rangos de proporción de uso posibles (g ea/ha)	Rangos de proporción de uso preferidos (g ea/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	
MCPA	94-74-6	25 – 4000	125 - 1550	
Diclorprop	120-36-5	25 – 12000	100 - 2240	
Mecoprop	7085-19-0	25 – 4000	250 - 3360	

235

Tabla 1. Fenoxi auxinas disponibles en el comercio

Nombre químico	CAS no.	Rangos de proporción de uso posibles (g ea/ha)	Rangos de proporción de uso preferidos (g ea/ha)	Estructura
Cloprop	101-10-0	25 – 4000	25 – 4000	
4-CPP	3307-39-9	25 – 4000	25 – 4000	
Fenoprop	93-72-1	25 – 4000	25 – 4000	
3,4-DP	3307-41-3	25 – 4000	25 – 4000	

Un beneficio adicional del gen AAD-1 es su capacidad sin precedentes de degradar concomitantemente un huésped de los compuestos graminicidas comerciales y no-comerciales de la clase general de los ariloxifenoxipropionatos (AOPP). *Ver* **Tabla 2.** Este atributo puede permitir el uso de uno cualquiera entre una cantidad de compuestos tipo AOPP en cultivos transgénicos que contienen AAD-1, donde la tolerancia de esos cultivos no había tenido previamente un uso garantido en esos cultivos. De manera común estos incluirán cultivos de malezas tales como maiz, arroz, trigo, cebada, centeno, avena, sorgo, especies de céspedes de estación fresca y cálida, especies de pastos para pastoreo, y muchas otras, pero además podría incluir cultivos dicotiledóneos donde la

tolerancia a los AOPP (naturalmente presente en la mayoría de las dicotiledóneas) no está en niveles aceptables para uso comercial para permitir el uso de AOPP en dicho cultivo dicotiledóneo.

Tabla 2. Compuestos graminicidas tipo AOPP enumerados por los nombres comunes aceptados. En general, la referencia a los herbicidas tipo AOPP se hace al ácido activo pero la mayoría se formula para el comercio como cualquiera de una variedad de formulaciones de éster correspondientes y éstas son de igual modo consideradas como sustratos para la enzima de AAD-1 *in planta* ya que las esterasas generales de las planta convierten estos ésteres en los ácidos activos *in planta*. De igual modo también se puede hacer referencia a la sal orgánica o inorgánica correspondiente del ácido correspondiente. Cuando se indican herbicidas derivados del ácido propiónico, sal o éster quirales, los racematos (R,S) o los enantiómeros (R o S) ópticamente purificados se consideran los mismos herbicidas a los fines de nombrar estos herbicidas, aún cuando diferentes números CAS puedan corresponder a compuestos ópticamente puros. Los rangos de proporción de uso posibles pueden ser como tratamientos aislados o en combinación con otros herbicidas en usos de cultivo y no cultivo.

Tabla 2. Compuestos graminicidas tipo AOPP enumerados con los nombres comunes aceptados

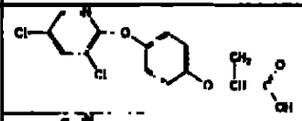
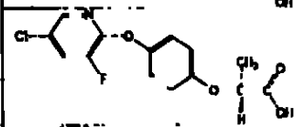
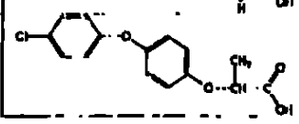
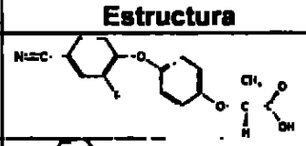
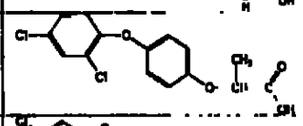
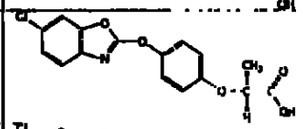
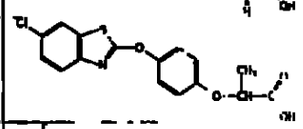
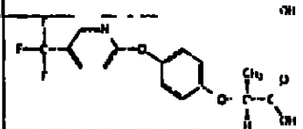
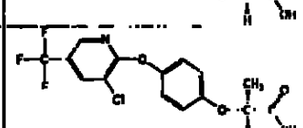
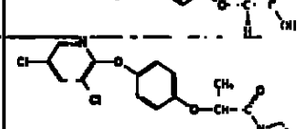
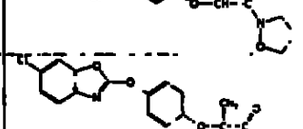
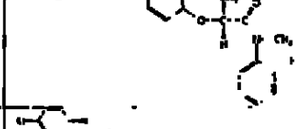
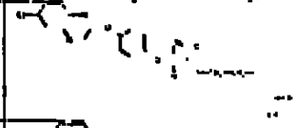
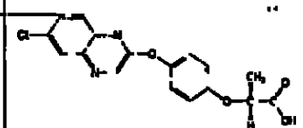
Nombre químico	CAS no	Rangos de proporción de uso posibles (g ea/ha)	Rangos de proporción de uso preferidos (g ea/ha)	Estructura
Clorazifop	72492-94-7	10-2000	10-2000	
Clodinafop	105512-06-9	10-2000	20-200	
Clofop	59621-49-7	10-2000	10-2000	

Tabla 2. Compuestos graminicidas tipo AOPP enumerados con los nombres comunes aceptados

Nombre químico	CAS no	Rangos de proporción de uso posibles (g ea/ha)	Rangos de proporción de uso preferidos (g ea/ha)	Estructura
Cihalofop	122008-85-9	10-2000	105-560	
Diclofop	71283-65-3	10-2000	280-2000	
Fenoxaprop	66441-23-4	10-2000	20-200	
Fenthiaprop	95721-12-3	10-2000	10-2000	
Fluazifop	69335-91-7	10-2000	25-420	
Haloxifop	69806-40-2	10-2000	20-600	
Isoxapirifop	87757-18-4	10-2000	30-240	
Metamifop	256412-89-2	10-2000	35-280	
Propaquizafop	111479-05-1	10-2000	30-240	
Quizalofop	76578-14-8	10-2000	20-240	
Trifop	58597-74-4	10-2000	10-2000	

Un único gen (*AAD-1*) ha sido actualmente identificado que, cuando se manipula genéticamente para su expresión en plantas, tiene las propiedades de permitir el uso de herbicidas tipo fenoxi auxina en plantas donde la tolerancia inherente nunca existió o no era lo suficientemente elevada como para permitir el uso de estos herbicidas. Más aún, el AAD-1 puede aportar protección *in planta* a herbicidas tipo AOPP donde la tolerancia natural no era suficiente para permitir la selectividad. Las plantas que contienen AAD-1 solo ahora pueden tratarse secuencialmente o en mezcla de tanque con uno, dos o una combinación de varios herbicidas tipo fenoxi auxina. La proporción para cada herbicida tipo fenoxi auxina puede variar de 25 a 4000 g ea/ha, y más típicamente de 100 a 2000 g ea/ha para el control de un amplio espectro de malezas dicotiledóneas. De igual modo, se pueden aplicar uno, dos o una mezcla de varios compuestos de AOPP graminicidas a plantas que expresan el AAD-1 con riesgo reducido de lesión de dichos herbicidas. La proporción para cada AOPP puede variar de 10 a 2000 g ea/ha, y más típicamente de 20-500 g ea/ha APRA el control de un amplio espectro de malezas monocotiledóneas. Las combinaciones de estas diferentes clases de química y herbicidas con diferentes modos de acción y espectros en el mismo campo (ya sea en forma secuencial o en combinación con mezcla de tanque) aportarán control de la mayoría de las malezas potenciales para las cuales se desea el control herbicida.

El glifosato se utiliza extensamente porque controla un espectro muy amplio de especies de hoja ancha y malezas herbáceas. Sin embargo, el uso repetido de glifosato en los GTC y en aplicaciones de no cultivo ha seleccionado y continuará seleccionando cambios de malezas a especies naturalmente más tolerantes o biotipos resistentes al glifosato. Otros herbicidas de mezcla de tanque utilizados en proporciones eficaces que ofrecen control de la misma especie pero con diferentes modos de acción están prescriptos en la mayoría de las estrategias

de manejo de resistencia a herbicidas como método para demorar la aparición de malezas resistentes. El AAD-1 acumulado con una característica de tolerancia al glifosato (y/o con otras características de tolerancia a herbicidas) podría aportar un mecanismo para permitir el control de especies de malezas resistentes al glifosato (ya sea especies de malezas herbáceas con uno o más herbicidas tipo AOPP, o especies de malezas de hoja ancha con una o más fenoxi auxinas) en los GTC permitiendo el uso de herbicidas de glifosato, fenoxi auxinas (por ejemplo, 2,4-D) y de AOPP (por ejemplo, quizalofop) selectivamente en el mismo cultivo. Las aplicaciones de estos herbicidas podrían ser simultáneamente en un tanque de mezcla que contiene dos o más herbicidas de modos diferentes de acción; aplicaciones individuales de la composición de herbicida único en aplicaciones secuenciales como pre-planta, preemergencia o pos-emergencia y división de tiempo en las aplicaciones que varía de 2 horas a 3 meses; o, alternativamente, cualquier combinación de cualquier cantidad de herbicidas que representan cada clase química puede ser aplicada en cualquier momento dentro de los 7 meses de plantación del cultivo hasta la cosecha del cultivo (o el intervalo de pre-cosecha para el herbicida individual, el que sea más corto).

Es importante tener flexibilidad en el control de un amplio espectro de malezas herbáceas y de hoja ancha en términos de tiempo de aplicación, proporción de herbicidas individuales y la capacidad de controlar malezas resistentes o difíciles. Las aplicaciones de glifosato en un cultivo con un gen de resistencia al glifosato / pila de *AAD-1* varía de 250-2500 g ea/ha; herbicidas tipo fenoxi auxina (uno o más) se podrían aplicar de 25-4000 g ea/ha; y herbicidas tipo AOPP (uno o más) se podrían aplicar de 10-2000 g ea/ha. Las combinaciones y la cronología óptima de estas aplicaciones dependerán de la situación en particular, especies y medio ambiente, y estará mejor determinado por un experto en la técnica del control de malezas y con el beneficio de la presente revelación.

Las formulaciones de herbicidas (por ejemplo, formulación de éster, ácido o sal; o concentrado soluble, concentrado emulsionable, o líquido soluble) y aditivos de mezcla de tanque (por ejemplo, adyuvantes o agentes de compatibilidad) pueden afectar significativamente el control de malezas de un herbicida dado o una combinación de uno o más herbicidas. Cualquier combinación de estos con cualquiera de los químicos herbicidas antes mencionados está dentro del alcance de la invención.

Un experto en la técnica verá, además, el beneficio de combinar dos o más modos de acción para incrementar el espectro de malezas controladas y/o para el control de especies naturales más tolerantes o especies de malezas resistentes también podría extenderse a químicos por los cuales se permitiera tolerancia herbicida en cultivos con la participación humana (ya sea en forma transgénica o no transgénica) más allá de los GTC. En verdad, características que codifican la tolerancia al glifosato (por ejemplo, *EPSPS, GOX, GAT* de plantas resistentes o bacterianas), resistencia al glufosinato (*Pat, bar*), resistencia al herbicida que inhibe la acetolactato sintasa (ALS) (*por ejemplo*, imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina sulfonanilida, pirmidiniltiobenzoatos, y otros productos químicos = *AHAS, Csr1, SurA et al.*), resistencia al bromoxinil (*por ejemplo*, *Bxn*), resistencia a los inhibidores de la enzima HPPD (4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa), resistencia a los inhibidores de fitoeno desaturasa (PDS), resistencia a los herbicidas que inhiben el fotosistema II (*por ejemplo*, *psbA*), resistencia a los herbicidas que inhiben el fotosistema I, resistencia a los herbicidas que inhiben la protoporfirinógeno oxidasa IX (PPO) (*por ejemplo, PPO-1*), resistencia a los herbicidas de fenilurea (*por ejemplo*, *CYP76B1*), enzimas que degradan al dicamba (ver, por ejemplo US 20030135879), y otros, podrían ser acumulados solos o en múltiples combinaciones para dar la capacidad de

controlar o prevenir eficazmente los cambios de malezas y/o la resistencia a cualquier herbicida de las clases antes mencionadas.

Con respecto a los herbicidas adicionales, algunos inhibidores de ALS preferidos adicionales incluyen las triazolopirimidin-sulfonalidas (tales como cloransulam-metilo, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam y penoxsulam), pirimidiniltiobenzoatos (tales como bispiribac y piritiobac) y flucarbazona. Algunos inhibidores de HPPD preferidos incluyen mesotriona, isoxaflutol y sulcotriona. Algunos inhibidores de PPO preferidos incluyen flumiclorac, flumioxazin, flufenpir, piraflufen, flutiacet, butafenacil, carfentrazona, sulfentrazona y los difeniléteres (tales como acifluorfen, fomesafen, lactofen y oxifluorfen).

Más aún, el *AAD-1* solo o sumado con una o más características de HTC adicionales podría acumularse con una o más características interiores adicionales (por ejemplo, resistencia a insectos, resistencia fúngica, o tolerancia al estrés, et al) o exteriores (por ejemplo, rendimiento aumentado, perfil de aceite mejorado, calidad de fibra mejorada, et al). De este modo, la presente invención puede utilizarse para aportar un paquete agronómico completo de calidad de cultivo mejorada con la capacidad de controlar los costos en forma eficaz y flexible cualquier número de plagas agronómicas.

La presente invención se refiere en parte a la identificación de una enzima que no sólo puede degradar el 2,4-D, sino que además posee sorprendentemente nuevas propiedades, que distinguen la enzima de la presente invención de las proteínas de *tfdA* previamente conocidas, por ejemplo. Aun cuando esta enzima tiene homología muy baja con *tfdA*, los genes de la presente invención se pueden clasificar en general dentro de la misma familia global de dioxigenasas dependientes de α-cetoglutarato. Esta familia de proteínas se caracteriza por tres residuos de histidina conservados en un motivo "$HX(D/E)X_{23-28}(T/S)X_{114-183}HX_{10-}$

$_{13}$R" que comprende el sitio activo. Las histidinas coordinan al ion Fe^{+2} en el sitio activo que es esencial para la actividad catalítica (Hogan *et al.*, 2000). Los experimentos de expresión *in vitro* preliminares mencionados en la presente se diseñaron para ayudar a seleccionar los nuevos atributos.

Más específicamente, la presente invención se refiere en parte al uso de una enzima que no sólo es capaz de degradar el 2,4-D, sino además herbicidas tipo AOPP. No se ha informado previamente de ninguna enzima dioxigenasa dependiente de α-cetoglutarato que tenga la capacidad de degradar herbicidas de diferentes clases químicas y modos de acción. Las enzimas y los genes preferidos para uso de acuerdo con la presente invención se denominan genes y proteínas de *AAD-1* (AriloxiAlcanoato Dioxigenasa).

Esta invención además se refiere en parte a la identificación y uso de genes que codifican las enzimas de ariloxialcanoato dioxigenasa que son capaces de degradar herbicidas tipo fenoxi auxina y ariloxifenoxipropionato. De este modo, la presente invención se refiere en parte a la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros herbicidas tipo fenoxialcanoico auxina y herbicidas de ariloxifenoxialcanoato mediante una enzima AAD-1 expresada en forma recombinante.

Las proteínas de la invención dieron ensayos positivos para la conversión de 2,4-D en 2,4-diclorofenol ("DCP"; inactivo para uso herbicida) en ensayos analíticos y biológicos. Las proteínas parcialmente purificadas de la presente invención pueden convertir rápidamente el 2,4-D en DCP (conversión que varía de 50 a 100%) *in vitro*. Una ventaja adicional que aportan las plantas transformadas con AAD-1 es que los herbicidas precursores se metabolizan a formas inactivas, reduciendo de este modo el potencial para cosechar residuos herbicidas en grano o ensilado.

La presente invención además incluye métodos para controlar malezas donde dichos métodos comprenden la aplicación de un herbicida tipo AOPP y/o un herbicida tipo fenoxi auxina a plantas que contienen un gen de *AAD-1*.

A la luz de estas revelaciones, se proveen nuevas plantas que contienen un polinucleótido que codifica este tipo de enzima. Hasta ahora, no hubo motivación para producir tales plantas, no hubo expectativa de que tales plantas pudiesen producir eficazmente esta enzima para lograr que las plantas sean resistentes a herbicidas no sólo del tipo fenoxiácido (tal como 2,4-D) sino además a los herbicidas tipo AOPP. De este modo, la presente invención aporta muchas ventajas que no se consideraron posibles en la técnica hasta ahora.

Las cepas disponibles al público (depositadas en colecciones de cultivos como ATCC o DSMZ) se pueden adquirir y clasificar, utilizando técnicas reveladas en la presente, para nuevos genes. Las secuencias reveladas en la presente se pueden utilizar para amplificar y clonar los genes homólogos en un sistema de expresión recombinante para posterior clasificación y ensayo de acuerdo con la presente invención.

Tal como se mencionó en la sección Antecedentes, un organismo que ha sido investigado extensivamente por su capacidad de degradar el 2,4-D es *Ralstonia eutropha* (Streber *et al.*, 1987). El gen que codifica para la primera enzima en la vía de degradación es el *tfdA*. *Ver* la Patente Estadounidense No. 6.153.401 y No. de Acceso al GENBANK M16730. El *TfdA* cataliza la conversión del ácido 2,4-D a DCP inactivo para uso herbicida mediante una reacción de dioxigenasa dependiente de α-cetoglutarato (Smejkal *et al.*, 2001). El *TfdA* ha sido 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). Una gran cantidad de genes del tipo *tfdA* que codifican proteínas capaces de degradar el 2,4-D han sido

identificadas del ambiente y depositadas en la base de datos del Genbank. Muchos homólogos son bastante similares al *tfdA* (>85% de identidad de aminoácidos) y tienen propiedades enzimáticas similares al *tfdA*. Sin embargo, en la actualidad se ha identificado una pequeña colección de homólogos de dioxigenasa dependiente de α-cetoglutarato que tienen un bajo nivel de homología con *tfdA*.

El *RdpA*, de *Sphingobium herbicidovorans* (Westendorf *et al.*, 2002), es un ejemplo único con baja homología (28% de identidad de aminoácidos). Esta enzima ha demostrado catalizar la primera etapa en la mineralización del (R)-diclorprop (y otros ácidos (R)-fenoxipropiónico) como así también del 2,4-D (un ácido fenoxiacético) (Westendorf *et al.*, 2003). Si bien el organismo responsable de la degradación del ácido fenoxipropiónico ha sido conocido durante algún tiempo, hasta el presente se han hechos pocos avances en la caracterización de esta vía (Horvath *et al.*, 1990). Una complicación adicional a la degradación del diclorprop es la estereoespecificidad (R *vs.* S) involucrada tanto en la recaptación (Kohler, 1999) como en la oxidación inicial del diclorprop (Westendorf *et al.*, 2003). No se ha informado hasta ahora la expresión heteróloga del *rdpA* en otros microorganismos o transformación de este gen en plantas. La literatura se ha abocado esencialmente a los homólogos próximos del *tfdA* que degradan esencialmente los ácidos fenoxiacéticos aquirales. No había expectativa respecto a que los genes *rdpA* o *AAD-1* pudiesen expresarse con éxito en plantas para dar plantas resistentes al 2,4-D (sin mencionar la resistencia al AOPP completamente sorprendente).

Tal como se describe en mayor detalle en los Ejemplos a continuación, el *rdpA* se clonó del *Sphingobium herbicidovorans* y se ensayó para promiscuidad de sustrato entre varias clases químicas de herbicidas. Esta enzima dioxigenasa dependiente de α-cetoglutarato purificada en su forma nativa había demostrado

previamente que podía degradar el 2,4-D y el diclorprop (Westendorf *et al.*, 2002 y 2003). Sin embargo, no se ha informado previamente que alguna enzima dioxigenasa dependiente de α-cetoglutarato tenga la capacidad de degradar herbicidas de diferentes clases químicas y modos de acción. El *RdpA* nunca se ha expresado en plantas, ni hubo motivación alguna para hacerlo dado que el desarrollo de nuevas tecnologías de HTC ha estado limitado debido principalmente a la eficacia, bajo costo y conveniencia de los GTC (Devine, 2005).

A la luz de la nueva actividad, las proteínas y genes de la presente invención se denominan en la presente como proteínas y genes de AAD-1. Recientemente se confirmó que el AAD-1 degrada una variedad de herbicidas tipo auxina fenoxiacético y fenoxiproiónico *in vitro*. Sin embargo, sorprendentemente se halló que esta enzima, según se informó la primera vez, era además capaz de degradar sustratos adicionales de la clase de moléculas de ariloxialcanoato. Los sustratos de importancia agronómica significativa son los herbicidas de ariloxfenoxipropionato (AOPP) para pastos. Este descubrimiento muy nuevo es la base del significativo Cultivo Tolerante a los Herbicidas (HTC) y de oportunidades de características de marcadores seleccionables.

Se ha informado, en la presente, que los herbicidas de pastos de AOPP de amplio espectro son excelentes sustratos para el AAD-1 como así también el 2,4-D, diclorprop y otras fenoxi auxinas. Esta enzima es única en su capacidad de suministrar actividad degradativa herbicida a una gama de herbicidas de hoja ancha de amplio espectro (fenoxi auxinas) y una gama de herbicidas de pastos muy activos de amplio espectro (AOPP).

De este modo, la presente invención se refiere en parte a la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros herbicidas de fenoxialcanoico auxina, y herbicidas de ariloxifenoxialcanoato mediante una enzima de dioxigenasa ariloxialcanoato (AAD-1) expresada de manera recombinante. Esta invención

además se refiere en parte a la identificación y usos de genes que codifican una enzima que degrada la ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-1) capaz de degradar los herbicidas tipo fenoxi auxina y ariloxifenoxipropionato.

La enzima de la invención permite la expresión transgénica que da por resultado la tolerancia a combinaciones de herbicidas que controlarían casi todas las malezas herbáceas y de hoja ancha. El *AAD-1* puede servir como una característica excelente de cultivo tolerante a herbicidas (HTC) para sumarse a otras características de HTC (*por ejemplo*, resistencia al glifosato, resistencia al glufosinato, resistencia a la imidazolinona, resistencia al bromoxinil, et al.), y características de resistencia a los insectos, (*Cry1F, Cry1Ab, Cry 34/45, et al.*) por ejemplo. Además, el *AAD-1* puede servir como un marcador seleccionable para ayudar a la selección de transformantes primarios de plantas diseñados genéticamente con un segundo gen o grupo de genes.

Además, el gen microbiano de la invención ha sido rediseñado de modo que la proteína es codificada por codones con una propensión hacia el uso de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (hemicot). *Arabidopsis*, maíz, tabaco, algodón, soja, canola y arroz han sido transformados con construcciones que contienen *AAD-1* y han demostrado altos niveles de resistencia tanto a los herbicidas tipo fenoxi auxina como AOPP. De este modo, la presente invención además se refiere a los genes "optimizados de planta" que codifican proteínas de la presente invención. Como se muestra a continuación en el Ejemplo 6, el gen reconstruido ejemplificado fue más eficaz al transportar resistencia herbicida a la planta, en comparación con el gen bacteriano.

Los grupos oxialcanoato son útiles para introducir una funcionalidad ácida estable en los herbicidas. El grupo ácido puede impartir movilidad floemática mediante "entrampamiento del ácido", un atributo deseable para la acción herbicida y por lo tanto podría ser incorporado en los nuevos herbicidas con fines

de movilidad. Los aspectos de la presente invención además aportan un mecanismo para crear los HTCs. Existen muchos herbicidas experimentales y comerciales potenciales que pueden servir como sustratos para el AAD-1. De este modo, el uso de los genes de la invención también puede dar por resultado tolerancia herbicida a esos otros herbicidas.

Las características del HTC de la presente invención se pueden utilizar en combinaciones novedosas con otras características del HTC (incluyendo, pero sin limitación, la tolerancia al glifosato). Estas combinaciones de características dan lugar a nuevos métodos para controlar especies de malezas (y similares), debido a la reciente resistencia adquirida o tolerancia inherente a los herbicidas (por ejemplo, glifosato). De este modo, sumado a las características del HTC, los nuevos métodos para controlar malezas utilizando herbicidas, para lo cual se creó la tolerancia al herbicida mediante dicha enzima en cultivos transgénicos, están dentro del alcance de la invención.

Más aún, los cultivos tolerantes al glifosato desarrollados a nivel mundial son frecuentes. Muchas veces en rotación con otros cultivos tolerantes al glifosato, el control de voluntarios resistentes al glifosato puede ser difícil en cultivos rotacionales. De este modo, el uso de las características de la invención, sumado o transformado individualmente en cultivos, aporta una herramienta para controlar otros cultivos voluntarios de HTC.

Esta invención puede aplicarse en el contexto de la comercialización de una característica de resistencia al 2,4-D sumada a las actuales características de resistencia al glifosato en sojas, por ejemplo. De este modo, esta invención aporta una herramienta para combatir cambios de especies de malezas de hoja ancha y/o selección de malezas de hoja ancha resistentes a herbicidas, lo que culmina con la confianza extremadamente alta por parte de los cultivadores en el glifosato para el control de malezas con varios cultivos.

La expresión transgénica de los genes de *AAD-1* de la invención se ejemplifica en, por ejemplo, *Arabidopsis*, maíz, tabaco, algodón, arroz, soja y canola. Sin embargo, la presente invención puede aplicarse a cualquier otro tipo deseado de planta. Las sojas son un tipo preferido para la transformación de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, esta invención puede aplicarse a otros múltiples cultivos de hierbas y otros cultivos de hoja ancha. De igual modo, el 2,4-D puede utilizarse en forma más positiva en cultivos de hierbas donde la tolerancia al 2,4-D es moderada, y la tolerancia aumentada mediante esta vía daría a los cultivadores la oportunidad de usar el 2,4-D en proporciones más eficaces y durante un tiempo de aplicación más amplio sin el riesgo de dañar el cultivo.

Más aún, la presente invención aporta un único gen que puede aportar resistencia a los herbicidas que controlan malezas de hoja ancha (auxinas) y malezas herbáceas (AOPP). Este gen puede utilizarse en múltiples cultivos para permitir el uso de una combinación herbicida de amplio espectro. La presente invención además puede controlar malezas resistentes a químicos corrientes, y ayuda en el control de cambios de espectros de malezas que resultan de prácticas agronómicas corrientes. El AAD-1 de la invención además puede utilizarse en esfuerzos para detoxificar eficazmente los sustratos herbicidas a formas no-herbicidas. De este modo, la presente invención provee el desarrollo de características de HTC adicionales y/o tecnología de marcador seleccionable.

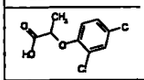
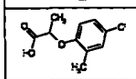
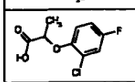
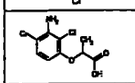
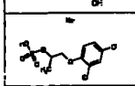
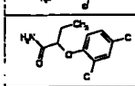
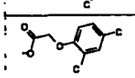
Aparte de, o además de, utilizar los genes de la invención para producir los HTCs, estos genes además se pueden utilizar como marcadores seleccionables para seleccionar con éxito los transformantes en cultivos celulares, invernaderos, y en el campo. Existe un valor inherente alto para los genes de la invención simplemente como un marcador seleccionable para proyectos biotecnológicos. La promiscuidad del AAD-1 para otros herbicidas fenoxialcanoico auxínicos aporta

muchas oportunidades para utilizar este gen para HTC y/o a los fines de marcador seleccionable.

Un gen de la presente invención, denominado en la presente como *AAD-1* (ariloxialcanoato dioxigenasa), se clonó de *Sphingobium herbicidovorans* (ATCC 700291) por PCR en pET 280-S/S (denominado pDAB 3203) y se expresó en BL-21 Star *E. coli.* Cuando este gen se sobreexpresa (por inducción de IPTG 1mM y lisado de cultivo combinado con la siguiente mezcla de reacción: 112,5 µg/ml de 2,4-D, ácido ascórbico 1 mM, α-cetoglutarato 1 mM, de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 50 µM, la enzima producida en forma recombinante degrada el 2,4-D a DCP inactivo para uso herbicida (según se determinó por HPLC, espectrometría de masa, ensayo colorimétrico, y ensayo de placa de *Arabidopsis*). Además, el AAD-1 ha demostrado que puede convertir los siguientes herbicidas en su correspondiente fenol inactivo: diclorprop, mecoprop, haloxifop, diclofop y otros (Ver **Tablas 3 y 4**).

Tabla 3: Efecto de AAD-1 (v1) purificada sobre varias auxinas y análogos de auxina herbicidas. Los sustratos se ensayaron a 1 mM en MOPS 25 mM pH 6,8, Fe^{2+} 200 µM, ascorbato de Na 200 µM, α-cetoglutarato 1 mM utilizando ya sea 1 µg o 10 µg (10X) de AAD-1 (v1) purificada por ensayo de 0,16 ml.

Tabla 3: Efecto de AAD-1 (v1) purificada sobre varias auxinas y análogos de auxina herbicidas

Estructura	Registro ID	Compuesto	AAD1	AAD1 (10x)
	117813	(R,S)-diclorprop	0.586	2.594
	188874	(R,S)-mecoprop	0.341	2.085
	83293	(R,S)-2-cloro, 4-fluoro-fenoxi-propionato	0.304	2.358
	11113875	(R,S)-3-amino-diclorprop	0.228	2.676
	188476		0.077	0.687
	192132		0.064	0.204
	195517	2,4-D	0.034	0.383

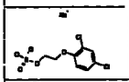
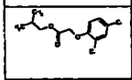
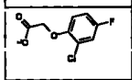
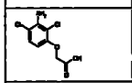
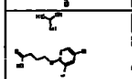
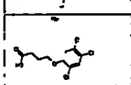
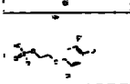
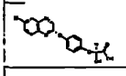
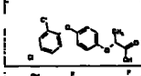
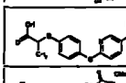
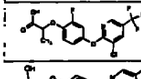
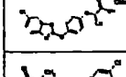
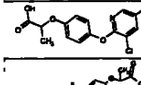
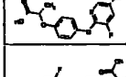
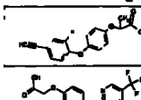
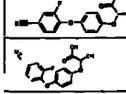
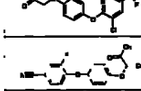
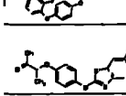
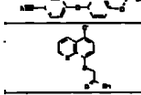
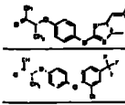
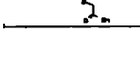
Estructura	Registro ID	Compuesto	AAD1	AAD1 (10x)
	398166	sesone	0.02	0.177
	190252		0.008	0.211
	124988		0.007	0.058
	11263528		0.004	0.069
	178577		0.003	0.021
	178587		0.003	0.02
	188527		0.003	0.036

Tabla 4: Efecto de AAD-1 (v1) purificada sobre varios graminicidas tipo AOPP y análogos, y sobre cloquintocet. Se ensayaron los sustratos a 1 mM en MOPS 25 mM, pH 6,8, Fe^{2+} 200 µM, ascorbato de Na 200 µM, α-cetoglutarato 1 mM, utilizando ya sea 1 µg o 10 µg (10X) de AAD-1 (v1) purificada por ensayo de 0,16 ml.

Tabla 4. Efecto de AAD-1 (v1) purificada sobre varios graminicidas de AOPP y análogos, y sobre cloquintocet

Estructura	Registro ID	Compuesto	AAD1	AAD1 (10x)	Estructura	Registro ID	Compuesto	AAD1	AAD1 (10x)
	18706	(R)-quizalofop	0.43	2.1		460511	(R,S)-diclofop	0.155	1.663
	87131	(R,S)-fluazifop	0.427	2.17		25646		0.144	1.69
	11044492	(R)-fenoxaprop	0.406	0.597		70222	(R,S)-chlorazifop	0.126	1.584
	34697	(R,S)-clodinofop	0.295	1.98		199608	cyhalofop	0.114	1.26
	14603	(R)-cyhalofop	0.222	1.989		43865	haloxyfop-oxyacetate	0.004	0.053
	14623	(R,S)-cyhalofop	0.215	1.815		7466	(S)-cyhalofop	0.003	0.017
	62942	(R,S)-fenthiaprop	0.199	1.055		204558	Cloquintocet	0	0.001
	66905	haloxyfop	0.172	1.63					

28

Proteínas (y aislados fuentes) de la presente invención. La presente invención aporta proteínas funcionales. Por "actividad funcional" (o "activa") se entiende aquí que las proteínas/enzimas para su uso de acuerdo con la presente invención tienen la capacidad de degradar o disminuir la actividad de un herbicida (solas o en combinación con otras proteínas). Las plantas que producen proteínas de la presente invención preferentemente producirán "una cantidad eficaz" de la proteína de modo que cuando la planta es tratada con un herbicida, el nivel de expresión de proteína es suficiente para hacer que la planta sea parcial o completamente resistente o tolerante al herbicida (en una proporción típica, a menos que se especifique lo contrario; las proporciones de aplicación típicas se pueden hallar en el *Herbicide Handbook* bien conocido (Weed Science Society of America, 8° edición, 2002), por ejemplo). El herbicida puede aplicarse en proporciones que normalmente matarían la planta blanco, en proporciones y concentraciones de uso de campo normales. (Debido a la presente invención, el nivel y/o concentración puede ser opcionalmente más alto que los que se utilizaron previamente). Con preferencia, las células de planta y las plantas de la presente invención están protegidas contra la inhibición del crecimiento o daño causado por el tratamiento con herbicida. Las plantas y las células de plantas transformadas de la presente invención se tornan preferentemente resistentes o tolerantes a un herbicida, según se mencionó en la presente, significando que la planta y las células de planta transformadas pueden desarrollarse en presencia de cantidades eficaces de uno o más herbicidas según se mencionó en la presente. Las proteínas preferidas de la presente invención tienen actividad catalítica para metabolizar uno o más compuestos de ariloxialcanoato.

La transferencia de la actividad funcional a la planta o sistemas bacterianos puede involucrar una secuencia de ácido nucleico, que codifica la secuencia de aminoácidos para una proteína de la presente invención, integrada en un vector

de expresión de proteína apropiado al huésped en el cual el vector residirá. Una forma de obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína con actividad funcional es aislar el material genético nativo de las especies bacterianas que producen la proteína de interés, utilizando la información deducida de la secuencia de aminoácidos de la proteína, según se revela en la presente. Las secuencias nativas se pueden optimizar para expresión en plantas, por ejemplo, según se menciona en detalle a continuación. El polinucleótido optimizado además puede diseñarse en base a la secuencia proteica.

La presente invención aporta clases de proteínas que tienen actividades nuevas según se identifican en la presente. Una forma de caracterizar estas clases de proteínas y los polinucleótidos que las codifican es definiendo un polinucleótido por su capacidad de hibridar, bajo un rango de condiciones específicas, con una secuencia nucleotídica ejemplificada (su complemento y/o una sonda o sondas derivadas de cualquier hebra) y/o por su capacidad de amplificarse por PCR utilizando cebadores derivados de las secuencias ejemplificadas.

Existe una cantidad de métodos para obtener proteínas para su uso de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos contra las proteínas revelados en la presente se pueden utilizar para identificar y aislar otras proteínas de una mezcla de proteínas. Específicamente, se pueden desarrollar anticuerpos contra las porciones de las proteínas que están más conservadas o son más distintas, en comparación con otras proteínas relacionadas. Estos anticuerpos se pueden utilizar entonces para identificar específicamente proteínas equivalentes con la actividad característica por inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA), o inmuno-transferencia (immuno-blotting). Los anticuerpos contra las proteínas descriptas en la presente, o contra proteínas equivalentes, o contra fragmentos de estas proteínas, se pueden

preparar fácilmente utilizando procedimientos estándar. Tales anticuerpos son un aspecto de la presente invención. Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, preferentemente producidos en respuesta a una proteína sugerida o ejemplificada.

Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que las proteínas (y genes) de la presente invención se pueden obtener de una variedad de fuentes. Dado que se sabe que los operones de degradación herbicida completa están codificados sobre elementos transportables tales como plásmidos, así como también genómicamente integrados, las proteínas de la presente invención se pueden obtener de una amplia variedad de microorganismos, por ejemplo, que incluyen bacterias recombinantes y/o del tipo salvaje. Otros miembros de los órdenes Firmicutes y Proteobacteria, y géneros específicos con *rdpA*'s conocidos, tales como *Sphingobium*, *Delftia*, *Rodoferax*, y *Comamonas* por ejemplo, se pueden utilizar como aislados fuentes.

Los mutantes de aislados bacterianos se pueden obtener por procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los mutantes asporógenos se pueden obtener a través de la mutagénesis con etilmetan sulfonato (EMS) de un aislado. Los mutantes se pueden obtener utilizando luz ultravioleta y nitrosoguanidina mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Una "proteína de" u "obtenible de" cualquiera de los aislados de la invención a la que se hace referencia o se sugiere en la presente 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 esta connotación e incluye proteínas obtenibles de un tipo dado de bacteria que se modifican para la expresión en una planta, por ejemplo. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que, dado la revelación de un gen y proteína

bacteriana, se puede diseñar una planta 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 polinucleotídicas y/o de aminoácidos reveladas en la presente y utilizadas para clasificar y recuperar otros genes relacionados de otras fuentes (naturales).

Las técnicas de biología molecular estándar se pueden utilizar para clonar y secuenciar las proteínas y genes descriptos en la presente. Se puede hallar información adicional en Sambrook et al., 1989, la cual se incorpora a la presente como referencia.

Polinucleótidos y Sondas.

La presente invención además provee secuencias nucleotídicas que codifican proteínas para su uso de acuerdo con la presente invención. Esta invención además aporta métodos para identificar y caracterizar genes que codifican proteínas que tienen la actividad herbicida deseada. En una realización, la presente invención aporta secuencias nucleotídicas únicas que son útiles como sondas y/o cebadores de hibridación para técnicas de PCR. Los cebadores producen fragmentos génicos característicos que se pueden utilizar en la identificación, caracterización y/o aislamiento de genes específicos de interés. La secuencias nucleotídicas de la presente invención codifican proteínas que son diferentes de las proteínas descriptas previamente.

Los polinucleótidos de la presente invención se pueden utilizar para formar "genes" completos para codificar proteínas o péptidos en un célula huésped deseada. Por ejemplo, como el experto reconocería fácilmente, los polinucleótidos de la invención se pueden colocar apropiadamente bajo el control de un promotor en un huésped de interés, como se conoce en la técnica. El nivel de expresión génica y expresión especifica temporal/tisular puede impactar enormemente la utilidad de la invención. En general, mayores niveles de expresión proteica de un

gen degradante darán por resultado la degradación de un sustrato más rápida y más completa (en este caso un herbicida blanco). Los promotores expresarán el gen blanco a niveles altos a menos que la elevada expresión tenga un impacto negativo consiguiente sobre la salud de la planta. Típicamente, se desea tener el gen AAD-1 expresado constitutivamente en todos los tejidos para protección completa de la planta en todos los estadíos del crecimiento. Sin embargo, se podría utilizar alternativamente un gen de resistencia expresado en forma vegetativa; esto permitiría el uso del herbicida blanco en cultivos para control de malezas y controlaría subsiguientemente la reproducción sexual del cultivo blanco mediante la aplicación durante la etapa de floración.

Como conocen los expertos, el ADN típicamente existe en una forma de doble hebra. En esta disposición, una hebra es complementaria de la otra hebra y viceversa. A medida que el ADN se replica en una planta (por ejemplo), se producen hebras de ADN complementarias adicionales. La "hebra codificadora" a menudo se utiliza en la técnica para referirse a la hebra que se une con la hebra anti-sentido. El ARNm se transcribe de la hebra "antisentido" del ADN. La hebra "homo-sentido" o "codificadora" tiene una serie de codones (un codón es tres nucleótidos que pueden leerse como una unidad de tres residuos para especificar un aminoácido particular) que pueden leerse como un marco de lectura abierto (ORF) para formar una proteína o péptido de interés. Para producir una proteína *in vivo*, una hebra de ADN se transcribe típicamente en una hebra complementaria de ARNm la cual se utiliza como molde para la proteína. De este modo, la presente invención incluye el uso de los polinucleótidos ejemplificados que se muestran en el listado de secuencias adjunto y/o equivalentes que incluyen las hebras complementarias. El ARN y ANP (ácidos nucleicos peptídicos) que son equivalentes funcionalmente a las moléculas de ADN ejemplificadas se incluyen en la presente invención.

En una realización de la presente invención, los aislados bacterianos se pueden cultivar en condiciones que dan por resultado la elevada multiplicación del microorganismo. Después de tratar al microorganismo para proveer ácido nucleico genómico mono-hebra, el ADN puede ponerse en contacto con los cebadores de la invención y someterse a la amplificación por PCR. Los fragmentos característicos de los genes de interés se amplificarán mediante el procedimiento, identificando de este modo la presencia del(de los) gen(es) de interés.

Otros aspectos de la presente invención incluyen genes y aislados identificados utilizando los métodos y secuencias nucleotídicas revelados en la presente. Los genes identificados de este modo pueden codificar las proteinas de resistencia herbicida de la presente invención.

Las proteinas y genes para uso de acuerdo con la presente invención se pueden identificar y obtener utilizando sondas oligonucleotídicas, por ejemplo. Estas sondas son secuencias nucleotídicas detectables que se pueden detectar en virtud de una marca apropiada o se pueden hacer inherentemente fluorescentes según se describe en la Solicitud Internacional No. WO 93/16094. Las sondas (y los polinucleótidos de la presente invención) pueden ser ADN, ARN, o ANP. Además de la adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), y uracilo (U; para moléculas de ARN), las sondas sintéticas (y polinucleótidos) de la presente invención además pueden tener inosina (una base neutra capaz de aparearse con las cuatro bases; algunas veces utilizada en lugar de una mezcla de las cuatro bases en sondas sintéticas) y/u otras bases sintéticas (no naturales). De este modo, cuando se hace referencia en la presente a un oligonucleótido sintético, degenerado, y se utiliza "N" o "n" genéricamente, "N" o "n" pueden ser G, A, T, C, o inosina. Los códigos de ambigüedad tal como se utilizan en la presente están de acuerdo con las convenciones de denominación IUPAC estándar

respecto de la presentación de la presente solicitud (por ejemplo, R significa A o G, Y significa C o T, etc.).

Como bien se conoce en la técnica, si una molécula sonda hibrida con una muestra de ácido nucleico, se puede presumir razonablemente que la sonda y muestra tienen homología/similitud/identidad sustancial. Con preferencia, primero se realiza la hibridación del polinucleótido seguida de lavados en condiciones de rigurosidad baja, moderada o alta mediante técnicas bien conocidas en la técnica, según se describe en, por ejemplo, Keller, G.H., M.M. Manak (1987) *ADN Probes*, Stockton Press, New York, NY, págs. 169-170. Por ejemplo, según se establece en la presente, condiciones de baja rigurosidad se pueden lograr lavando primero con 2x SSC (citrato salino estándar)/0,1% de SDS (dodecil sulfato de sodio) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Típicamente, se realizan dos lavados. Mayor rigurosidad se puede lograr disminuyendo la concentración de sal y/o elevando la temperatura. Por ejemplo, el lavado descripto anteriormente puede estar seguido de dos lavados con 0,1x SSC/0,1% de SDS durante 15 minutos cada uno a temperatura ambiente seguido de subsiguientes lavados con 0,1x SSC/0,1% de SDS durante 30 minutos cada uno a 55°C. Estas temperaturas se puede utilizar con otros protocolos de hibridación y lavado establecidos en la presente y como serán conocidos por el técnico (se puede utilizar SSPE como sal en lugar de SSC, por ejemplo). El 2x SSC/0,1% de SDS se puede preparar agregando 50 ml de 20x SSC y 5 ml de SDS 10% a 445 ml de agua. Se puede preparar 20x SSC combinando NaCl (175,3 g/0,150 M), citrato de sodio (88,2 g/0,015 M), ajustando el pH a 7,0 con NaOH 10 N, luego ajustando el volumen a 1 litro. Se puede preparar SDS 10% disolviendo 10 g de SDS en 50 ml de agua en autoclave, luego diluyendo a 100 ml.

La detección de la sonda aporta un medio para determinar de manera conocida si se ha mantenido la hibridación. Tal análisis de sonda aporta un

método rápido para identificar genes de la presente invención. Los segmentos nucleotídicos utilizados como sondas de acuerdo con la invención se pueden sintetizar utilizando un sintetizador de ADN y procedimientos estándar. Estas secuencias nucleotídicas además se pueden utilizar como cebadores de PCR para amplificar genes de la presente invención.

Las características de hibridación de una molécula se pueden utilizar para definir polinucleótidos de la presente invención. De este modo, la presente invención incluye polinucleótidos (y/o sus complementos, preferentemente sus complementos completos) que hibridan con un polinucleótido ejemplificado en la presente. Esto es, una forma de definir un gen (y la proteína que él codifica), por ejemplo, es mediante su capacidad de hibridar (bajo cualquiera de las condiciones reveladas específicamente en la presente) con un gen conocido o específicamente ejemplificado.

Tal como se utiliza en la presente, el término condiciones "rigurosas" para hibridación se refiere a condiciones que logran el mismo, o casi el mismo, grado de especificidad de hibridación que las condiciones empleadas por los actuales solicitantes. Específicamente, la hibridación de ADN inmovilizado sobre transferencias Southern con sondas específicas génicas marcadas con ^{32}P se puede llevar a cabo mediante métodos estándar (ver, por ejemplo, Maniatis *et al.* 1982). En general, la hibridación y subsiguientes lavados se pueden llevar a cabo en condiciones que permiten la detección de secuencias blanco. Para sondas génicas de ADN de doble hebra, la hibridación se puede llevar a cabo durante toda la noche a 20-25°C por debajo de la temperatura de fusión (Tm) del ADN híbrido en 6x SSPE, 5x solución de Denhardt, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturalizado. La temperatura de fusión está descripta por la siguiente fórmula (Beltz *et al.* 1983):

Tm = 81,5°Ç+ 16,6 Log[Na+] + 0,41(%G+C) – 0,61(% formamida) - 600/longitud del dúplex en pares de bases.

Típicamente los lavados se pueden llevar a cabo de la siguiente forma:

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

(2) Una vez a Tm-20°C durante 15 minutos en 0,2x SSPE, 0,1% de SDS (lavado de rigurosidad moderada).

Para sondas oligonucleotídicas, la hibridación se puede llevar a cabo durante toda la noche a 10-20°C por debajo de la temperatura de fusión (Tm) del hibrido en 6x SSPE, 5x solución de Denhardt, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturalizado. La Tm para sondas oligonucleotídicas se puede determinar mediante la siguiente fórmula:

Tm (°C) = 2(número de pares de bases T/A) + 4(número de pares de bases G/C)

(Suggs *et al.*, 1981).

Típicamente los lavados se pueden llevar a cabo de la siguiente forma:

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

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

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

Baja: 1 o 2x SSPE, temperatura ambiente

Baja: 1 o 2x SSPE, 42°C

Moderada: 0,.2x o 1x SSPE, 65°C

Alta: 0,1x SSPE, 65°C.

La formación y estabilidad del dúplex depende de la complementariedad sustancial entre las dos hebras de un híbrido, y, según se mencionó anteriormente, se puede tolerar un cierto grado de falta de apareamiento. Por lo tanto, las secuencias de sondas de la presente invención incluyen mutaciones (tanto simples como múltiples), supresiones, inserciones de las secuencias descriptas, y sus combinaciones, donde dichas mutaciones, inserciones y supresiones permiten la formación de híbridos estables con el polinucleótido blanco de interés. Las mutaciones, inserciones y supresiones se pueden producir en una secuencia polinucleotídica dada en muchas formas, y estos métodos son conocidos para el experto en la técnica. En el futuro pueden surgir otros métodos.

Tecnología de PCR. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una síntesis repetitiva, enzimática, cebada de una secuencia de ácido nucleico. Este procedimiento es bien conocido y normalmente lo utilizan los expertos en la técnica (*ver* Mullis, Patentes Estadounidenses Nos. 4.683.195, 4.683.202, y 4.800.159; Saiki *et al.*, 1985). La PCR se basa en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN de interés que es flanquedo por dos cebadores oligonucleotídicos que hibridan a hebras opuestas de la secuencia blanco. Los cebadores están preferentemente orientados con los extremos 3' apuntando uno hacia otro. Los ciclos repetidos de desnaturalización por calor del molde, apareamiento de los cebadores con sus secuencias complementarias, y la extensión de los cebadores apareados con una ADN polimerasa dan por resultado la amplificación del segmento definido por los extremos 5' de los cebadores de PCR. El producto de cada cebador puede servir como molde para el otro cebador, de modo que cada ciclo duplica esencialmente la cantidad de fragmento de ADN producido en el ciclo anterior. Esto da por resultado la acumulación exponencial del fragmento blanco específico, hasta varios millones de veces en una pocas horas. Al utilizar una ADN polimerasa termoestable tal

como *Taq* polimerasa, aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, el proceso de amplificación puede automatizarse completamente. Otras enzimas que se pueden utilizar son conocidas por los expertos en la técnica.

Las secuencias de ADN ejemplificadas, o sus segmentos, se pueden utilizar para amplificación por PCR. Al realizar la amplificación por PCR, se puede tolerar cierto grado de falta de apareamiento entre el cebador y el molde. Por lo tanto, las mutaciones, supresiones e inserciones (especialmente adiciones de nucleótidos al extremo 5') de los cebadores ejemplificados están dentro del alcance de la presente invención. Las mutaciones, inserciones y supresiones se pueden producir en un cebador dado mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Modificación de genes y proteínas. Los genes y proteínas de la presente invención se pueden fusionar a otros genes y proteínas para producir proteínas quiméricas y de fusión. Los genes y proteínas útiles de acuerdo con la presente invención incluyen no sólo las secuencias de longitud completa especificamente ejemplificadas, sino además proteínas, segmentos y/o fragmentos (incluyendo fragmentos contiguos y supresiones internas y/o terminales en comparación con las moléculas de longitud completa) de estas secuencias, sus variantes, mutantes, quiméricas, y fusiones. Las proteínas de la presente invención pueden tener aminoácidos sustituidos en la medida que retengan la actividad funcional deseada. Los genes "variantes" tienen secuencias nucleotídicas que codifican las mismas proteínas o proteínas equivalentes que tienen actividad equivalente o similar a una proteína ejemplificada. Los términos "proteínas variantes" y "proteínas equivalentes" se refieren a proteínas que tienen la misma o esencialmente la misma actividad biológica/funcional contra las plagas blanco y secuencias equivalentes que las proteínas ejemplificadas. Tal como se utiliza en la presente, la referencia a una secuencia "equivalente" se refiere a secuencias

con sustituciones, supresiones, adiciones, o inserciones de aminoácidos que mejoran o no afectan adversamente la actividad en un grado significativo. Los fragmentos que retienen la actividad también se incluyen en esta definición. Los fragmentos y otros equivalentes que retienen la misma o similar función o actividad como un fragmento correspondiente de una proteína ejemplificada están dentro del alcance de la presente invención. Se pueden realizar cambios, tales como sustituciones o adiciones de aminoácidos, para una variedad de fines, tales como incrementar (o disminuir) la estabilidad frente a proteasas de la proteína (sin disminuir material/sustancialmente la actividad funcional de la proteína), eliminar o agregar un sitio de restricción, y similares. Las variaciones de genes se pueden construir fácilmente utilizando técnicas estándar para realizar mutaciones de punto, por ejemplo.

Además, la Patente Estadounidense No. 5.605.793, por ejemplo, describe métodos para generar diversidad molecular adicional utilizando el re-ensamblado de ADN después de la fragmentación aleatoria o enfocada. Esto puede denominarse "transposición" de genes, lo que típicamente involucra mezclar fragmentos (de un tamaño deseado) de dos o más moléculas de ADN diferentes, seguido de rondas repetidas de renaturalización. Esto puede mejorar la actividad de una proteína codificada por un gen de inicio. El resultado es una proteína quimérica que tiene actividad mejorada, especificidad de sustrato alterada, estabilidad enzimática incrementada, estereoespecificidad alterada u otras características.

La "transposición" puede ser diseñada y dirigida después de obtener y examinar coordenadas tridimensionales atómicas y la estructura cristalina de una proteína de interés. De este modo, la "transposición enfocada" puede estar dirigida a ciertos segmentos de una proteína que son ideales para modificación, tales como segmentos expuestos de superficie, y preferentemente segmentos no

internos que están involucrados con el plegamiento de la proteína y la integridad estructural 3D esencial.

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

en cualquiera de las secuencias sugeridas o ejemplificadas (o sus complementos (complementos completos)). Los segmentos de tamaño similar, especialmente aquellos para regiones conservadas, se pueden utilizar además como sondas y/o cebadores.

Los fragmentos de genes de longitud completa se pueden obtener utilizando exonucleasas o endonucleasas disponibles en el comercio de acuerdo con procedimientos estándar. Por ejemplo, enzimas tales como *Bal*31 o mutagénesis dirigida al sitio se pueden utilizar para cortar sistemáticamente nucleótidos de los extremos de estos genes. Además, los genes que codifican fragmentos activos se pueden obtener utilizando una variedad de enzimas de restricción. Se pueden utilizar proteasas para obtener directamente fragmentos activos de estas proteínas.

Está dentro del alcance de la invención según se reveló en la presente que las proteínas pueden truncarse y aún retener la actividad funcional. Por "proteína truncada" se entiende que una porción de una proteína puede escindirse mientras que la proteína truncada remanente retiene y exhibe la actividad deseada después de la escisión. La escisión puede lograrse mediante varias proteasas. Más aún, se pueden producir proteínas efectivamente escindidas utilizando técnicas de biología molecular donde las bases de ADN que codifican dicha proteína se eliminan ya sea a través de la digestión con endonucleasas de restricción u otras técnicas disponibles al experto en la técnica. Después del truncamiento, dichas proteínas pueden expresarse en sistemas heterólogos tales como *E. coli*, baculovirus, sistemas virales basados en plantas, levadura, y similares y luego colocarse en ensayos de insectos según se revela en la presente para determinar la actividad. Es bien conocido en la técnica que las proteínas truncadas se pueden producir con éxito de modo que retienen la actividad funcional a la vez que tienen menos que la secuencia completa, de

longitud total. Por ejemplo, las proteínas de *B.t.* se pueden utilizar en una forma truncada (proteína de núcleo) (*ver, por ejemplo*, Höfte *et al.* (1989), y Adang *et al.* (1985)). Tal como se utiliza en la presente el término "proteína" puede incluir truncamientos funcionalmente activos.

En algunos casos, especialmente para la expresión en plantas, puede ser ventajoso utilizar genes truncados que expresan las 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% de la proteína de longitud completa.

Ciertas proteínas de la presente invención han sido ejemplificadas específicamente en la presente. Como estas proteínas son meramente ejemplos de las proteínas de la presente invención, debería ser fácilmente evidente que la presente invención comprede proteínas variantes o equivalentes (y secuencias nucleotídicas que codifican para equivalentes de las mismas) que poseen la misma o similar actividad de las proteínas ejemplificadas. Las proteínas equivalentes tendrán similitud (y/u homología) de aminoácidos con una proteína ejemplificada. La identidad de aminoácidos será típicamente de al menos 60%, con preferencia al menos 75%, con mayor preferencia al menos 80%, con mayor preferencia aún al menos 90% y puede ser de al menos 95%. Las proteínas preferidas de la presente invención pueden definirse también en términos de rangos de identidad y/o similitud más particulares. Por ejemplo, la identidad y/o 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% en comparación con una secuencia ejemplificada o sugerida en la presente. Cualquier número mencionado anteriormente se puede utilizar para definir los límites superiores o inferiores.

A menos que se especifique lo contrario, tal como se utiliza en la presente, el porcentaje de identidad y/o similitud de la secuencia de dos ácidos nucleicos se determina utilizando el algoritmo de Karlin & Altschul, 1990, modificado como en Karlin & Altschul 1993. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se llevan a cabo con el programa NBLAST, puntaje = 100, longitud de la palabra = 12. Gapped BLAST se puede utilizar según se describió en Altschul *et al.*, 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros predeterminados de los respectivos programas (NBLAST y XBLAST). *Ver* sitio web de NCBI/NIH. Para obtener alineaciones discontinuas a los fines de comparación, se utilizó la función de AlignX del Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., North Bethesda, MD, U.S.A.), empleando los parámetros predeterminados. Estos fueron: 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.

Varias propiedades y características tridimensionales de la proteína además se pueden cambiar sin afectar adversamente la actividad/funcionalidad de la proteína. Las sustituciones conservativas de aminoácidos pueden tolerarse o producirse de modo de no afectar adversamente la actividad y/o la configuración tridimensional de la molécula. Los aminoácidos pueden agruparse en las siguientes clases: no-polar, polar sin carga, básico y ácido. Las sustituciones conservativas por las que un aminoácido de una clase se reemplaza con otro aminoácido del mismo tipo están dentro del alcance de la presente invención en la medida que la sustitución no sea adversa para la actividad biológica del compuesto. La **Tabla 5** aporta un listado de ejemplos de aminoácidos que pertenecen a cada clase.

Tabla 5

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

En algunos casos, también pueden hacerse sustituciones no conservativas. Sin embargo, las sustituciones preferidas no se apartan significativamente de la actividad funcional/biológica de la proteína.

Tal como se utiliza en la presente, la referencia a polinucleótidos "aislados" y/o proteínas "purificadas" se refiere a estas moléculas cuando no están asociadas con las otras moléculas con las cuales ellas se encontrarían en la naturaleza. De este modo, la referencia a "aislada" y/o "purificada" significa la implicancia de la "mano del hombre" según se describe en la presente. Por ejemplo un "gen" bacteriano de la presente invención puesto en una planta para expresión es un "polinucleótido aislado". De igual modo, una proteína derivada de una proteína bacteriana y producida por una planta es una "proteína aislada".

Debido a la degeneración/redundancia del código genético, una variedad de diferentes secuencias de ADN pueden codificar las secuencias de aminoácidos reveladas en la presente. Está bien dentro de la capacidad de una persona capacitada en la técnica el crear secuencias de ADN alternativas que codifican las mismas o esencialmente las mismas proteínas. Estas secuencias de ADN variantes están dentro del alcance de la presente invención. Esto además se menciona en detalle a continuación en la sección titulada "Optimización de secuencia para expresión en plantas".

Optimización de secuencia para expresión en plantas. A fin de obtener una elevada expresión de los genes heterólogos en plantas, en general se prefiere rediseñar los genes de modo que se expresen de forma más eficiente en (el citoplasma de) células de plantas. El maíz es una de esas plantas donde se prefiere rediseñar el gen heterólogo antes de la transformación para incrementar su nivel de expresión en dicha planta. Por lo tanto, un paso adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana es el rediseño de un gen heterólogo para expresión óptima, utilizando el sesgo del codón más íntimamente alineado con la secuencia de planta blanco, sea una especie monocotiledónea o dicotiledónea. Además, las secuencias se pueden optimizar para expresión en cualquiera de los tipos más particulares de plantas mencionados en otra parte de la presente.

Huéspedes transgénicos. Los genes que codifican proteínas de la presente invención se pueden introducir en una amplia variedad de huéspedes microbianos o vegetales. La presente invención incluye células de plantas transgénicas y plantas transgénicas. Las plantas preferidas (y células de plantas) son maíz, *Arabidopsis*, tabaco, soja, algodón, canola, arroz, trigo, revestimiento de césped y de pastoreo, y similares. Más generalmente, se pueden utilizar dicotiledóneas y monocotiledóneas en varios aspectos de la presente invención.

En realizaciones preferidas, la expresión del gen da por resultado, directa o indirectamente, la producción intracelular (y mantenimiento) de las proteínas de interés. Las plantas pueden tornarse resistentes a herbicidas de esta manera. Se puede hacer referencia a tales huéspedes como huéspedes 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 microbianas (preferentemente bacterianas) se pueden

producir y utilizar de acuerdo con técnicas estándar, con el beneficio de la presente revelación.

Las células de planta transfectadas con un polinucleótido de la presente invención se pueden regenerar en plantas completas. La presente invención incluye cultivos celulares que incluyen cultivos celulares tisulares, cultivos líquidos, y cultivos plaqueados. Las semillas producidas por y/o utilizadas para generar plantas de la presente invención además se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Otros tejidos y partes de plantas también se incluyen en la presente invención. La presente invención incluye, de igual modo, métodos para producir plantas o células que contienen un polinucleótido de la presente invención. Un método preferido para producir tales plantas es mediante la plantación de una semilla de la presente invención.

Inserción de genes para formar huéspedes transgénicos. Un aspecto de la presente invención es la transformación/transfección de plantas, células de plantas, y otras células huésped con polinucleótidos de la presente invención que expresan proteínas de la presente invención. Las plantas transformadas de esta manera se pueden tornar resistentes a una variedad de herbicidas con diferentes modos de acción.

Se dispone de una variedad de métodos para introducir un gen que codifica una proteína deseada en el huésped blanco en condiciones que permiten un mantenimiento y expresión estable del gen. Estos métodos son bien conocidos para los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5.135.867.

Los vectores que comprenden un polinucleótido de *AAD-1* están incluidos en el alcance de la presente invención. Por ejemplo, una gran cantidad de vectores de clonación que comprenden un sistema de replicación en *E. coli* y un marcador que permite la selección de las células transformadas están disponibles

para la preparación de la inserción de genes foráneos en plantas superiores. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, serie pUC, serie M13mp, pACYC184, *etc.* En consecuencia, la secuencia que codifica la proteína puede insertarse en el vector en un sitio de restricción adecuado. El plásmido resultante se utiliza para transformación en *E. coli.* Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutriente adecuado, luego se cosechan y se lisan. El plásmido se recupera por purificación del ADN genómico. El análisis de secuencias, análisis de restricción, electroforesis, y otros métodos biológicos bioquímicos-moleculares se llevan a cabo en general como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN utilizada puede ser digerida por restricción y unida a la próxima secuencia de ADN. Cada secuencia de plásmido puede clonarse en el mismo u otros plásmidos. Dependiendo del método de inserción de los genes deseados en la planta, pueden ser necesarias otras secuencias de ADN. Si, por ejemplo, el plásmido Ti o Ri se utiliza para la transformación de la célula de planta, entonces al menos el borde derecho, pero a menudo el borde derecho y el izquierdo del ADN-T plásmido Ti o Ri, debe unirse como región flanqueante de los genes a ser insertados. El uso del ADN-T para la transformación de las células de planta ha sido investigado intensamente y descripto en EP 120 516; Hoekema (1985); Fraley *et al.* (1986); y An *et al.* (1985).

Se dispone de una gran cantidad de técnicas para insertar ADN a una célula huésped de planta. Esas técnicas incluyen transformación de ADN-T utilizando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformación, fusión, inyección, biolística (bombardero de microparticulas), filamentos de carburo de silicio, emisión dirigida de aerosol, PEG, o electroporación como así también otros posibles métodos. Si se utilizan *Agrobacteria* para la transformación, el ADN debe insertarse para ser clonado en

plásmidos especiales, es decir ya sea en un vector intermedio o en un vector binario. Los vectores intermedios se pueden integrar en el plásmido Ti o Ri por recombinación homóloga debido a secuencias que son homólogas a secuencias en el ADN-T. El plásmido Ti o Ri además comprende la región vir necesaria para la transferencia del ADN-T. Los vectores intermedios no pueden replicarse a sí mismos en *Agrobacteria*. El vector intermedio puede transferirse al *Agrobacterium tumefaciens* por medio de un plásmido auxiliar (conjugación). Los vectores binarios pueden repicarse a sí mismos tanto en el *E. coli* como en *Agrobacteria*. Comprenden un gen marcador de selección y un enlace o polienlace que está enmarcado por las regiones límites de ADN-T derecha e izquierda. Se pueden transformar directamente en *Agrobacteria* (Holsters, 1978). El *Agrobacterium* utilizado como célula huésped debe comprender un plásmido que transporta una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia del ADN-T en la célula de planta. El ADN-T adicional puede estar contenido. La bacateria transformada de este modo se utiliza para la transformación de células de planta. Los explantos de planta se pueden cultivar ventajosamente con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para la transferencia del ADN en la célula de planta. Las plantas completas luego se pueden regenerar del material de planta infectado (por ejemplo, partes de hoja, segmentos de tallo, raíces, y además protoplastos o células cultivadas en suspensión) en un medio adecuado, que puede contener antibióticos o biocidas para selección. Las plantas obtenidas de este modo pueden ensayarse para determinar la presencia del ADN inserto. No se hacen demandas especiales de los plásmidos en el caso de inyección y electroporación. Es posible utilizar plásmidos comunes, tales como, por ejemplo, derivados de pUC.

Las células transformadas se desarrollan dentro de las plantas en la manera usual. Pueden formar células germinales y transmitir las características

transformadas a plantas progenie. Tales plantas pueden desarrollarse de manera normal y cruzarse con plantas que tienen los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las propiedades fenotípicas correspondientes.

En algunas de las realizaciones preferidas de la invención, los genes que codifican la proteína bacteriana se expresan a partir de unidades transcripcionales dentro del genoma de la planta. Con preferencia, dichas unidades transcripcionales son vectores recombinantes capaces de integración estable dentro del genoma de la planta y permiten la selección de líneas de planta transformadas que expresan el ARNm que codifica las proteínas.

Una vez que el ADN inserto ha sido integrado en el genoma, está relativamente estable allí (y no sale nuevamente). Normalmente contiene un marcador de selección que confiere, sobre las células de planta transformadas, resistencia a un biocida o un antibiótico, tal como kanamicina, G418, bleomicina, higromicina, o cloranfenicol, *inter alia*. Los marcadores seleccionables de planta además, típicamente, pueden aportar resistencia a varios herbicidas tales como glufosinato, (*PAT*), glifosato (*EPSPS*), imazethiapir (*AHAS*), y muchos otros. En consecuencia, el marcador empleado individualmente debe permitir la selección de células transformadas más que células que no contengan el ADN inserto. El(los) genes de interés se expresan preferentemente mediante promotores constitutivos o inducibles en la célula de planta. Una vez expresado, el ARNm se traduce en proteínas, incorporando de este modo aminoácidos de interés en la proteína. Los genes que codifican una proteína expresada en las células de 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 foráneos en las células de planta, y para obtener plantas que mantiene de manera estable y

expresan el gen introducido. Tales técnicas incluyen la introducción de material genético recubierto sobre micropartículas directamente en las células (Patentes Estadounidenses Nos. 4.945.050 de Cornell y 5.141.131 de DowElanco, actualmente Dow AgroSciences, LLC). Además, las plantas se pueden transformar utilizando la tecnología del *Agrobacterium*, *ver* Patentes Estadounidenses Nos. 5.177.010 de Universidad de Toledo; 5.104.310 de Texas A&M; Solicitud de Patente Europea 0131624B1; Solicitudes de Patentes Europeas 120516, 159418B1 y 176,112 de Schilperoot; Patentes Estadounidenses Nos. 5.149.645, 5.469.976, 5.464.763 y 4.940.838 y 4.693.976 de Schilperoot; Solicitudes de Patentes Europeas 116718, 290799, 320500, todas de Max Planck; Solicitudes de Patentes Europeas 604662 y 627752, y Patente Estadounidense No. 5.591.616, de Japan Tobacco; Solicitudes de Patentes Europeas 0267159 y 0292435, y Patente Estadounidense No. 5.231.019, todas de Ciba Geigy, actualmente Syngenta; Patentes Estadounidenses Nos. 5.463.174 y 4.762.785, ambas de Calgene; y Patentes Estadounidenses Nos. 5,004,863 y 5,159,135, ambas de Agracetus. Otra tecnología de transformación incluye tecnología de filamentos. *Ver* Patentes Estadounidenses Nos. 5.302.523 y 5.464.765, ambas de Zeneca, actualmente Syngenta. La tecnología de electroporación también ha sido utilizada para transformar plantas. *Ver* WO 87/06614 de Boyce Thompson Institute; Patentes Estadounidenses Nos. 5.472.869 y 5.384.253, ambas de Dekalb; y WO 92/09696 y WO 93/21335, ambas de Plant Genetic Systems. Más aún, los vectores virales también se pueden utilizar para producir plantas transgénicas que expresan la proteína de interés. Por ejemplo, las plantas monocotiledóneas se pueden transformar con un vector viral que utiliza los métodos descriptos en la Patente Estadounidense No. 5.569.597 de Micogen Plant Science y Ciba-Geigy (actualmente Syngenta), como

275

así también las Patentes Estadounidenses Nos. 5.589.367 y 5.316.931, ambas de Biosource, actualmente Large Scale Biology.

Como se mencionó previamente, la forma en que se introduce la construcción de ADN al huésped de planta no es crítica para esta invención. Se puede emplear cualquier método que aporte transformación eficiente. Por ejemplo, varios métodos para transformación de células de planta se describen en la presente e incluyen el uso de plásmidos Ti o Ri y similares para llevar a cabo la transformación mediada por el *Agrobacterium*. En muchos casos, será deseable contar con la construcción utilizada para la transformación bordeada sobre uno o ambos lados por bordes de ADN-T, más específicamente el borde derecho. Esto es particularmente útil cuando la construcción utiliza *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como modo para la transformación, si bien los bordes de ADN-T pueden encontrar su uso con otros modos de transformación. Cuando se utiliza *Agrobacterium* para la transformacion de células de planta, se puede utilizar un vector que se puede introducir en el huésped para recombinación homóloga con ADN-T o el plásmido Ti o Ri presente en el huésped. La introducción del vector se puede realizar mediante electroporación, apareamiento triparental y otras técnicas para transformar bacterias gram-negativas que es bien conocida de los expertos en la técnica. La forma de transformación del vector en el huésped de *Agrobacterium* no es crítica para la invención. El plásmido Ti o Ri que contiene el ADN-T para recombinación puede ser capaz o incapaz de causar formación de agalla, y no es crítico a dicha invención en la medida que los genes vir estén presentes en dicho huésped.

En algunos casos cuando se utiliza *Agrobacterium* para la transformación, la construcción de expresión que está dentro de los bordes del ADN-T será inserta dentro de un vector de amplio espectro tal como el pRK2 o sus derivados según se describe en Ditta *et al.* (1980) y EPO 0 120 515. Incluidos dentro de la

construcción de expresión y el ADN-T habrá uno o más marcadores según se describe en la presenten, que permitirán la selección de *Agrobacterium* transformado y las células de planta transformadas. El marcador particular empleado no es esencial para esta invención, dependiendo el marcador preferido del huésped y la construcción utilizada.

Para la transformación de las células de planta utilizando el *Agrobacterium*, los explantos se pueden combinar e incubarse con el *Agrobacterium* transformado durante un tiempo suficiente como para permitir su transformación. Después de la transformación, los *Agrobacteria* se eliminan por selección del antibiótico apropiado y las células de planta se cultivan con el medio selectivo apropiado. Una vez que se forman los callos, la formación de brotes se puede fortalecer empleando las hormonas de planta apropiadas de acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica del cultivo de tejidos de plantas y regeneración de plantas. Sin embargo, no siempre es necesaria una etapa intermedia de callo. Después de la formación del brote, dichas células de planta se pueden transferir al medio que fomenta la formación de la raíz completando de este modo la regeneración de la planta. Las plantas luego se pueden desarrollar a semilla y dicha semilla se puede utilizar para establecer generaciones futuras. Sin tomar en cuenta la técnica de transformación, el gen que codifica una proteína bacteriana se incorpora con preferencia a un vector de transferencia de genes adaptado para expresar dicho gen en una célula de planta incluyendo en el vector un elemento regulador del promotor de planta, como así también regiones de terminación transcripcional no traducidas 3' tales como Nos y similares.

Además de numerosas tecnologías para la transformación de plantas, el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes foráneos puede variar. Tal tejido incluiría, pero no estaría limitado, a tejido embriogénico, tipos de tejido de callo I, II y III, hipocótilos, meristema, tejido de raíz, tejidos para la expresión en el

floema, y similares. Casi todos los tejidos de planta pueden transformarse durante la diferenciación utilizando técnicas apropiadas descriptas en la presente.

Tal como se mencionó anteriormente, se puede utilizar una variedad de marcadores seleccionables, si se desea. La preferencia de un marcador particular queda a criterio del experto, pero se puede utilizar cualquiera de los siguientes marcadores seleccionables junto con cualquier otro gen no mencionado en la presente que podría funcionar como marcador seleccionable. Tales marcadores seleccionables incluyen, pero sin limitación, gen de aminoglicósido fosfotransferasa de transposon Tn5 (Aph II) que codifica la resistencia a los antibióticos kanamicina, neomicina y G418, como así también a los genes que codifican para la resistencia o tolerancia al glifosato; higromicina; metotrexato; fosfinotricina (bialafos o glufosinato); herbicidas del tipo imidazolinonas, sulfonilureas y triazolopirimidina, tales como clorsulfuron; bromoxinil, dalapon y similares.

Además de un marcador seleccionable, puede ser conveniente utilizar un gen indicador. En algunos casos un gen indicador puede utilizarse con o sin un marcador seleccionable. Los genes indicadores son genes que típicamente no están presentes en el organismo receptor y típicamente codifican proteínas que resultan de algún cambio fenotípico o propiedad enzimática. Ejemplos de tales genes se aportan en Weising *et al.*, 1988. Los genes indicadores preferidos incluyen la beta-glucuronidasa (GUS) del locus *uidA* de *E. coli*, el gen de cloranfenicol acetil transferasa del Tn9 de *E. coli*, la proteína fluorescente verde de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*, y los genes de luciferasa de la luciérnaga *Photinus piralis*. Luego se puede llevar a cabo un ensayo para detectar la expresión del gen indicador en un momento adecuado después de que dicho gen haya sido introducido a las células receptoras. Un ensayo de este tipo preferido supone el uso del gen que codifica la beta-glucuronidasa (GUS) del

locus *uidA* locus de *E. coli* según lo describe Jefferson *et al.*, (1987) para identificar las células transformadas.

Además de los elementos reguladores del promotor de planta, se pueden utilizar, de manera eficiente, los elementos reguladores del promotor de una variedad de fuentes en células de plantas para expresar los genes foráneos. Por ejemplo, se pueden utilizar los elementos reguladores de promotores de origen bacteriano, tales como el promotor de octopin sintasa, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de manopina sintasa; promotores de origen viral, tales como el virus del mosaico de la coliflor (35S y 19S), 35T (el cual es un promotor 35S re-diseñado, *ver* Patente Estadounidense No. 6.166.302, especialmente el Ejemplo 7E) y similares. Los elementos reguladores de promotores de planta incluyen, pero sin limitación, ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP) carboxilasa subunidad pequeña (ssu), promotor de beta-conglicinina, promotor de beta-faseolina, promotor de ADH, promotores de choque térmico, y promotores específicos de tejidos. Otros elementos tales como regiones de unión de matriz, regiones de unión de andamiaje, intrones, mejoradores, secuencias de poliadenilación y similares pueden estar presentes y de este modo mejorar la eficiencia de transcripción o integración del ADN. Tales elementos pueden o no ser necesarios para la función del ADN, si bien pueden aportar una mejor expresión o funcionamiento del ADN afectando la transcripción, la estabilidad del ARNm, y similares. Tales elementos pueden estar incluidos en el ADN según se desea para obtener un rendimiento óptimo del ADN transformado en la planta. Los elementos típicos incluyen, pero sin limitación, Adh-intron 1, Adh-intron 6, la secuencia líder de proteína de la cubierta del virus del mosaico de la alfalfa, las secuencias de osmotin UTR, la secuencia líder de proteína de la cubierta del virus de la vena del maíz, como así también otras disponibles para un experto en la técnica. Los elementos reguladores de los promotores constitutivos también se pueden utilizar, dirigiendo

de este modo una continua expresión génica en todos los tipos de células y en todo momento (*por ejemplo*, actina, ubiquitina, CaMV 35S, y similares). Los elementos reguladores de promotores específicos de tejido son responsables por la expresión génica en tipos de tejido o células específicos, tales como las hojas o semillas (*por ejemplo*, zeína, oleosina, napina, ACP, globulina y similares) y también se pueden utilizar.

Los elementos reguladores del promotor además pueden ser activos (o inactivos) durante una cierta etapa del desarrollo de la planta como así también activos en tejidos y órganos de planta. Ejemplos de éstos incluyen, pero sin limitación, elementos reguladores del promotor específico del polen, específico del embrión, específico de la seda del maíz, específico de la fibra del algodón, específico de la raíz, específico del endosperma de la semilla, o específico de la fase vegetativa y similares. Bajo ciertas circunstancias puede ser deseable utilizar un elemento regulador del promotor inducible, el cual es responsable por la expresión de genes en respuesta a una señal específica, tal como: estímulo físico (genes de choque térmico), luz (RUBP carboxilasa), hormonas (Em), metabolitos, químicos (respuesta a la tetraciclina), y estrés. Se pueden utilizar otros elementos de transcripción y traducción deseables que funcionan en plantas. En la técnica se conocen numerosos vectores de transferencia génica específicos de planta.

También se pueden utilizar sistemas basados en el ARN de virus de plantas para expresar la proteína bacteriana. Al hacer esto, el gen que codifica una proteína puede insertarse en la región promotora de la cubierta de un virus de planta adecuado el cual infectará a la planta huésped de interés. La proteína luego puede expresarse de este modo aportando protección de la planta frente al daño herbicida. Los sistemas basados en ARN de virus de plantas se describen en la Patente Estadounidense No. 5.500.360 de Micogen Plant Sciences, Inc. y

280

las Patentes Estadounidenses Nos. 5.316.931 y 5.589.367 de Biosource, actualmente Large Scale Biology.

Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes provisorias y publicaciones a las que se hace referencia o se mencionan en la presente se incorporan como referencia en su totalidad en la medida que no sean inconsistentes con las enseñanzas explícitas de esta memoria descriptiva.

A continuación se presentan ejemplos que ilustran los procedimientos para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no deben considerarse limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla de solventes son en volumen a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1 – Método para identificar genes que imparten resistencia al 2,4-D *in planta*

Como una forma para identificar genes que posean actividades degradantes de herbicida *in planta*, es posible consultar bases de datos públicas actuales tales como la del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para comenzar el proceso, es necesario tener una secuencia génica funcional ya identificada que codifica una proteína con las características deseadas (es decir, una actividad de la α-cetoglutarato dioxigenasa). Esta secuencia proteica luego se utiliza como la entrada para el algoritmo de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) para comparar contra las secuencias proteicas de NCBI depositadas disponibles. Utilizando parámetros predeterminados, esta investigación retorna por encima de 100 secuencias proteicas homólogas en variados niveles. Estos varían desde una identidad muy idéntica (85-98%) a muy baja (23-32%) en el nivel de aminoácidos. Tradicionalmente sólo las secuencias con alta homología podrían retener propiedades similares a la secuencia de entrada. En este caso, se elige sólo las secuencias con ≤ 50% de homología. Se continúa con la ejemplificación de que la clonación y los homólogos que se

expresan en forma recombinante con tan poco como el 27% de conservación de aminoácidos, se pueden utilizar para impartir niveles comerciales de resistencia no sólo al herbicida destinado, sino además a los sustratos que nunca han sido ensayados previamente con estas enzimas.

PCR y clonación del gen en pET. Se identificó un único gen (*rdpA*) de la base de datos de NCBI (*ver* el sitio web ncbi.nlm.nih.gov; acceso #AF516752) como homólogo con sólo 28% de identidad de aminoácidos al *tfdA* de *Ralstonia eutropha*. El porcentaje de identidad se determinó primero traduciendo ambas secuencias de ADN del *rdpA* y el *tfdA* depositadas en la base de datos a proteínas, luego utilizando el ClustalW en el paquete de software VectorNTI para llevar a cabo la alineación de secuencias múltiple.

La cepa del *Sphingobium herbicidovorans* que contiene el gen *rdpA* se obtuvo de ATCC (American Type Culture Collection cepa #700291). La cepa liofilizada se reanimó de acuerdo con el protocolo de ATCC y se almacenó a -80°C en glicerol 20% para uso interno como cepa Dow Bacterial DB 536. De esta reserva congelada, luego una placa de Triptic Soy Agar se completó con un anillado de células para aislamiento, y se incubó a 28°C durante 3 días.

Se utilizó una única colonia para inocular 100 ml de caldo de Tryptic Soy in un matraz de tres pantallas de 500 ml, el cual se incubó durante toda la noche a 28°C en un agitador de piso a 150 rpm. A partir de esto, el ADN total se aisló con el protocolo gram negativo del kit Qiagen's DNeasy (Qiagen cat. #69504). Los siguientes cebadores se diseñaron para amplificar el gen blanco del ADN genómico, delantero: 5' TCT AGA AGG AGA TAT ACC ATG CAT GCT GCA CTG TCC CCC CTC TCC CAG CG 3' [(SEC ID NO:1) (sitio de restricción Xba I agregado y sito de unión al ribosoma (RBS))] e Inverso: 5' CTC GAG TTA CTA GCG CGC CGG GCG CAC GCC ACC GAC CG 3' [(SEC ID NO:2)(codón de detención extra adicionado y sitio Xho I)].

282

Se establecieron reacciones de veinte microlitros de la siguiente manera: cebador MasterMix 8 µl, ea. 1 µl (50 pmoles/µl), ADNg 2,5 µl, H_2O 7,5 µl. Luego se llevó a cabo la PCR n las siguientes condiciones: 94°C 45 seg, 52°C 1,5 minuto, 72°C 1,5 minutos, durante 30 ciclos, seguido de un ciclo final de 72°C 5 minutos, utilizando el kit Eppendorf's Master Taq (Eppendorf cat. #0032 002.250). El producto PCR de ~1kb resultante se clonó en pCR 2.1 (Invitrogen cat. # K4550-40) siguiendo el protocolo incluido TOP10F' *E. coli* químicamente competente como la cepa huésped, para verificación de la secuencia nucleotidica.

Diez de las colonias blancas resultantes se levantaron en 4 ml de caldo Luria + 50 µg/ml de Kanamicin (LB K), y se desarrollaron durante la noche a 37°C con agitación. Los plásmidos se purificaron a partir de cada cultivo utilizando kit de Promega Wizard Plus SV (Promega cat. #A1460) y siguiendo el protocolo incluido. El secuenciamiento se llevó a cabo con el kit Beckman CEQ Quick Start (Beckman Coulter cat. #608120) utilizando cebadores delantero M13 (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') (SEC ID NO:16) e Inverso (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') (SEC ID NO:17) según instrucciones del fabricante. Esta secuencia génica (SEC ID NO:3), y su correspondiente proteína (SEC ID NO:9) recibió una nueva designación general para uniformidad interna *AAD-1 (v1)* (AriloxiAlcanoato Dioxigenasa).

Utilizando las enzimas de restricción correspondientes a los sitios agregados con los conectores del cebador (Xba 1, Xho 1) el *AAD-1 (v1)* se cortó del vector pCR2.1 vector y se ligó a un vector pET 280 resistente a estreptomicina/espectinomicina. Los productos ligados luego se transformaron en TOP10F' *E. coli*, y se plaquearon sobre el Caldo Luria + 50 µg/ml en placas de estreptomicina & espectinomicina (LB S/S) agar. Para diferenciar entre las ligaciones de *AAD-1 (v1)*:pET 280 y pCR2.1:pET 280, aproximadamente se

levantaron 20 colonias aisladas en 6 ml de LB S/S, y se desarrollaron a 37°C durante 4 horas con agitación.

Cada cultivo luego se manchó sobre placas LB K, las cuales se incubaron a 37° C durante toda la noche. Las colonias que se desarrollaron sobre el LB K se presume que tienen el vector pCR2.1 ligado en ellas, y se descartaron. Los plásmidos se aislaron de los cultivos remanentes como se hizo anteriormente. Esta construcción de expresión se denominó pDAB 3203.

Ejemplo 2 – Expresión y Ensayo

2.1 – Análisis de HPLC

El plásmido pDAB 3203 se mantuvo congelado a -80°C en células TOP10F' (Invitrogen) como cepa DR 1878 recombinante Dow. Para la expresión, el plásmido de ADN purificado del cultivo de TOP10F' utilizando el kit Promega's Wizard (Fisher cat. #PR-A1460) se transformó en células de BL-21 Star (DE3) (Invitrogen cat. #C6010-03) siguiendo el protocolo del fabricante. Después de la transformación, se plaquearon 50 µl de las células sobre placas de LB S/S agar y se incubaron durante la noche a 37°C.

A la mañana siguiente, todas las colonias de la planta completa se transfirieron por raspado a 100 mls de LB en un matraz de tres rompeolas de 500 ml y se incubaron a 37°C/200 rpm durante 1 hora. La expresión génica luego se indujo con IPTG 1 mM, y se incubó durante 4 hrs a 30°C/200 rpm. Los 100 ml de cultivo se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min. Luego se descartaron los sobrenadantes, y los pellets se suspendieron nuevamente en 10 ml de MOPS 50 mM. Estos luego se sometieron a tres rondas de 45 seg. De sonicación para lisar las células. A continuación, los lisados se centrifugaron a 15.000 rpm para eliminar las masas celulares. El sobrenadante se pipeteó y se almacenó a 4°C. Para controlar la expresión recombinante, se corrió una alícuota de 20 µl sobre un gel de Tris Glicina 4-20% (Invitrogen cat. #EC60255).

Después que se confirmó la expresión, se ensayó la actividad enzimática de la siguiente forma. Primero, se desaló una alícuota del extracto celular con un cartucho de PD-10 (Amersham cat. #17-0435-01). Luego, esto se utilizó para reacciones enzimáticas con herbicidas subsiguientes.

Para cada reacción, se combinó lo siguiente: 2,4-D (125 µg/ml), [Ascorbato (1 mM), ion ferroso (50 µM), α-cetoglutarato (1 mM), en MOPS 100 mM], extracto celular (100 µl). Esta reacción luego se incubó a temperatura ambiente durante 30 min., después de lo cual la reacción se detuvo con la adición de HCl 0,1 N hasta que el pH estuvo entre 2 y 3. La mitad del volumen de la reacción (~500 µl) se dejó para bioensayo, el volumen restante se extrajo orgánicamente utilizando tubos de Extracción de Fase Sólida (Fisher cat. #11-131-6), eluyendo con 400 µl de acetonitrilo + 0,05% de TFA.

Luego los extractos se ensayaron en HPLC para determinar la pérdida del pico de 2,4-D o presencia de cualquier pico adicional resultante de la degradación o modificación del 2,4-D. Las condiciones para la HPLC fueron: Luna 10µ C18(2) 250 x 4,6mm (Phenomenex cat. #00G-4253-E0), corrido a 50% de ACN + 0,05% TFA: 50% de H_2O + 0,05% de TFA a 100% de ACN + 0,05% de TFA durante 5 min.

2.2 – Bioensayos de ensayo en placa para degradación de herbicidas.

Los bioensayos se utilizaron para determinar si la transformación enzimática de herbicidas *in vitro* daba por resultado una pérdida concomitante en la actividad herbicida. Debido a la naturaleza selectiva de los herbicidas que se ensayan (es decir plantas monocotiledóneas controladas por herbicidas tipo AOPP y plantas dicotiledóneas controladas por herbicidas auxínicos), se utilizaron *Agrostis palustris* de tipo salvaje var. Pencross y *Arabidopsis thaliana* var. Columbia como especies de ensayo monocotiledóneas y dicotiledóneas

respectivamente. Cada especie es apta para germinación y desarrollo en pequeñas cápsulas de Petri.

Las semillas de *Arabidopsis* se esterilizaron en superficie durante 10 min. en solución blanqueadora comercial/agua desionizada 50% (v/v) con 1 µl de Tween-20 agregado como agente humectante con agitación vigorosa (agitador de mesa @ 250 rpm). La solución blanqueadora se decantó dentro de un capuchón estéril y se enjuagó tres veces con agua estéril. Las semillas de agróstide se esterilizaron en superficie durante 20 minutos de igual manera. .

Se agregaron veinte a treinta semillas esterilizadas para cada especie de ensayo sobre un Medio de Ensayo de Plaga de agar solidificada, estéril (PTM) [KNO_3 2,5 mM, KH_2PO_4 2,5 mM, $FeSO_4$ 50 mM, NaEDTA 10 mM (pH 8,0), $MgSO_4$ 2 mM, $Ca(NO_3)_2$ 2 mM, H_3BO_3 70 µM, $MnCl_2$ 14 µM, $CuSO_4$ 0,5 µM, $ZnSO_4$ 1 µM, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,2 µM, NaCl 10 µM, $CoCl_2 \cdot H_2O$ 10 nM, 0,8% (p/v) de sacarosa, 0,4% de agarosa (p/v)] para bioensayo en cápsulas de Petri de 60x15 mm (Falcon 1007). Además el PTM se modificó adicionalmente agregando hasta seis proporciones de estándares de herbicida de ensayo o diluciones de solución de ensayo herbicida-enzimáticas de modo que los incrementos de cuatro veces la concentración cubrieron un rango de proporciones de tres órdenes de magnitud con la proporción de GR_{50} (50% de reducción del desarrollo) aproximadamente en el centro del rango.

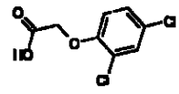
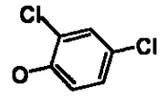
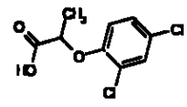
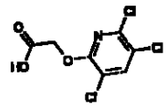
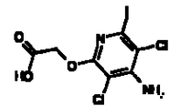
Para soluciones de ensayo herbicida-enzima, la máxima concentración se determinó en base a la concentración nominal antes de que cualquier degradación enzimática subsiguiente pudiera ocurrir. Las semillas se dispersaron uniformemente agregando 3 ml de PTM fundido de la misma composición, rotando, y permitiendo la solidificación. Las placas se sellaron y se mantuvieron en condiciones estériles en una cámara de desarrollo a baja luz (24 h $día^{-1}$, 100 $\mu E/m^2s^1$, 23°C) durante 7 días. La longitud de la raíz o la longitud de raíz + brote

se midieron para cinco plantas de *Arabidopsis* y agróstide, respectivamente; se determinó la longitud media promedio (porcentaje de control no tratado) vs. la concentración herbicida nominal y el GR_{50}.

Este bioensayo se utilizó para confirmar la pérdida de actividad herbicida como resultado de la degradación del AAD-1 (v1) de la cadena lateral de oxialcanoato de varios herbicidas relevantes para uso agronómico. En varios casos, el producto fenol anticipado co-eluido con el ácido progenitor sobre HPLC y el bioensayo sirvió como selección primaria para degradación herbicida. Las **Tablas 6 y 7** representan sustratos herbicidas ensayados.

287

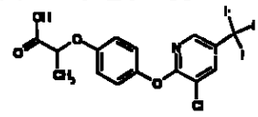
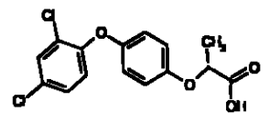
Tabla 6. Bioensayo de prueba en placa de *Arabidopsis* para fenoxi y piridiniloxialcanoato auxinas comerciales como sustratos.

	GR_{50} (nM)				
Sustancia química ensayada	Sustancia química sola	Sust. Qca. + vector blanco *	Sust. Qca. + AAD-1 v1	Relación GR_{50}**	Estructura
2,4-D	22	17	267	16	
DCP	>1000	nd	nd	nd	
Diclorprop	nd	30	1000	33	
Triclopir	255	1000	1000	1	
Fluroxipir	2200	2250	1825	<1	

* El vector blanco representa el tratamiento del lisado celular donde el vector de E. coli pET no tenía inserto de gen.

** La relación GR50 es una medida de la pérdida de actividad herbicida del tratamiento de lisado que expresa la enzima vs. tratamientos de vector blanco. Un número ≥2 se considera el umbral para detectar la pérdida de actividad herbicida con este ensayo.

Tabla 7. Bioensayo de prueba de placa de agróstide para sustratos comerciales que inhiben la ariloxifenoxialcanoato ACCasa.

	GR_{50} (nM)				
Sustancia química ensayado	Sust. Qca. sola	Sust. Qca. + vector blanco *	Sust. Qca. + AAD-1 v1	Relación GR_{50}**	Estructura
Haloxifop-RS	28	21	520	25	
Diclofop-RS	nd	20	130	7	

* El vector blanco representa el tratamiento del lisado celular donde el vector de E. coli pET no tenía inserto de gen.

** La relación GR50 es una medida de la pérdida de actividad herbicida del tratamiento de lisado que expresa la enzima vs. tratamientos de vector blanco. Un número ≥2 se considera el umbral para detectar la pérdida de actividad herbicida con este ensayo.

2.3 – Resultados de HPLC.

De la literatura, se sabía que las enzimas de dioxigenasa en esta clase requieren α-cetoglutarato como co-sustrato (para un esquema general, ver **Figura 1**) y ion ferroso para unirse en el sitio activo. Otros experimentos en la literatura han demostrado que la adición de ascorbato incrementó la actividad enzimática manteniendo el hierro en estado reducido, previniendo de este modo que la enzima sea degradada. En base a este trabajo previo, se realizaron ensayos iniciales con la presunción de que la enzima de la invención trabajaría de la misma forma que otros miembros de esta clase general de enzima.

Sorprendentemente, los resultados de la HPLC inicial mostraron la presencia de un nuevo pico a 6,1 minutos, además de un pico reducido de 2,4-D a

5,5 minutos. Este nuevo pico no estuvo presente en el ensayo de control. Para una identificación inicial del pico a 6,1 minutos, se corrió un control de DCP en nuestras condiciones de ensayo y predeciblemente esto además eluyó a 6,1 minutos. La formación de este producto se confirmó utilizando un ensayo colorimétrico para detectar fenoles (ver ejemplo 3.1) como así también espectrometría de masa. Según se esperaba, el AAD-1 (v1) lleva a cabo una reacción similar a la de los otros miembros de esta clase de enzima. En el bioensayo, estas mismas muestras además mostraron tener una pérdida casi completa de la actividad herbicida del 2,4-D en el ensayo de placa de *Arabidopsis* (**Figura 2**). Sin considerar las condiciones específicas del ensayo (es decir, incubaciones más prolongadas, más enzima), sólo el 50-75% del 2,4-D se podría degradar a DCP según se midió por HPLC. En realidad, la inducción más larga de las células de BL-21 *E. coli* con IPTG sólo dio por resultado menos enzima activa, aunque se expresó más proteína recombinante total.

Después de mostrar la degradación del 2,4-D, se ensayaron sustratos adicionales con sustituciones de anillo similares (es decir, oxiacetatos y oxipropionatos). Los primeros compuestos ensayados fueron los análogos de piridina fluroxipir y triclopir, los cuales son piridiniloxiacetatos. No se detectó actividad enzimática sobre ninguno de estos como sustratos. Ensayos adicionales sobre varios análogos de estos dos piridiniloxiacetatos con los grupos flúor o amino eliminados tampoco se degradaron. De manera interesante, sin embargo, un flúor en la posición 5 del 2,4-D dio por resultado una pérdida casi total de la degradación enzimática (ver la próxima sección para resultados adicionales).

Los inhibidores de ACCasa, haloxifop y diclofop, luego se ensayaron utilizando las mismas condiciones que con el 2,4-D. (Los metabolitos de fenol correspondientes co-eluyeron con el compuesto progenitor en las condiciones de HPLC utilizadas). Los resultados del bioensayo de estas muestras mostraron

pérdida de actividad herbicida contra el haloxifop (**Figura 3**) y diclofop. Estos resultados además se confirmaron mediante el ensayo colorimétrico, que además se utilizó para ensayar un muestreo más amplia de estos compuestos.

2.4 – Bioensayos de ensayo de placa para degradación de herbicidas.

Los resultados de ensayos de bioensayo corroboraron los resultados de HPLC iniciales que indicaron pérdida de 2,4-D progenitor luego de la incubación de soluciones de 2,4-D con extractos de AAD-1 (v1) recombinante no purificado (**Figura 2**). Además, la actividad herbicida del ácido fenoxipropiónico, diclorprop, también se degradó de manera eficaz. La relación del GR_{50} nominal para la solución de herbicida+enzima versus la solución de herbicida sola sirvió como medición de pérdida de la actividad herbicida progenitora resultante de la actividad enzimática. Una relación de 2-3 típicamente se correlacionó con 50-75% de pérdida de actividad herbicida progenitora (**Tabla 6**). A menudo no se pudo determinar el GR_{50} siguiendo el tratamiento enzimático; *de facto*, no quedó actividad herbicida detectable.

La clase de AOPP de herbicidas, también sirvió como sustratos excelentes para AAD-1 (v1) según se muestra mediante la degradación casi completa de actividad graminicida utilizando el bioensayo de placa de agróstide (**Figura 3** y **Tabla 7**). Estos datos son significativos en que esta es la primera observación informada acerca de que cualquier miembro de esta clase de enzima es activo sobre herbicidas fuera de las fenoxi auxinas. Las implicancias son que esta enzima es lo suficientemente promiscua como para utilizar químicos con subestructuras similares de fenoxialcanoato aun cuando tengan modos completamente diferentes de acción como herbicidas.

Ejemplo 3 – Ensayo *In vitro* de actividad de AAD-1 (v1) mediante detección colorimétrica de fenol

3.1 – Ensayo de AAD-1 (v1).

291

La actividad enzimática de AAD-1 (v1) se midió por detección colorimétrica del producto fenol utilizando un protocolo modificado a partir del Fukumori & Hausinger (1993) (*J. Biol. Chem.* 268: 24311-24317) para permitir el despliegue en un formato de microplaca de 96 pocillos. El ensayo colorimétrico ha sido descripto para su uso en la medición de la actividad de dioxigenasas que escinden el 2,4-D y diclorprop para liberar el producto 2,4-diclorofenol. Sin embargo, otros fenoles podrían liberarse potencialmente a partir de herbicidas de ariloxialcanoato diferentes tales como haloxifop y cihalofop (ver **Figura 4**). El rendimiento de color de varios fenoles se comparó con el del 2,4-diclorofenol utilizando el método de detección previamente descripto para evaluar cuales productos de fenol podrían detectarse fácilmente. Los fenoles y análogos de fenoles se ensayaron a una concentración final de 100 µM en 0,15 ml de MOPS 20 mM pH 6,75 conteniendo $NH_4(FeSO_4)_2$ 200 µM, ascorbato de sodio 200 µM. Los fenoles derivados de haloxifop y cihalofop tenían rendimientos de colores equivalentes al del 2,4-diclorofenol y por lo tanto se detectaron fácilmente. Los piridinoles derivados fluroxipir y triclopir no produjeron color significativo. El rendimiento del color de 2,4-diclorofenol y del haloxifop fenol fue lineal y proporcional a la concentración del fenol en el ensayo hasta ~500 µM. Una curva de calibración realizada en condiciones de ensayo estándar (160 µl de volumen de ensayo final) indicó que se obtuvo una absorbancia a 510 nm de 1,0 a partir de fenol 172 µM.

Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en un volumen total de 0,15 ml de MOPS 20 mM pH 6,75 conteniendo NH_4FeSO_4 200 µM, ascorbato de sodio 200 µM, α-cetoglutarato 1 mM, el sustrato apropiado (agregado de una solución madre 100 mM realizada en DMSO), y la enzima. Los ensayos se iniciaron por la adición del sustrato de ariloxialcanoato, la enzima o α-cetoglutarato en tiempo cero. Después de 15 minutos de incubación a 25° C, la reacción se detuvo por la

292

adición de 10 µl de EDTA sódico 100 mM. El color se desarrolló por la adición de 15 µl de buffer pH 10 (3,09 g de ácido bórico + 3,73 g de KCl + 44 ml KOH 1 N), 1,5 µl de 4-aminoantipirina 2% y 1,5 µl de ferrocianuro de potasio 8%. Después de 10 a 20 minutos, la absorbancia a 510 nm se registró en una lectora de microplacaa espectrofotométrica. Los blancos contenían todos los reactivos salvo la enzima para dar cuenta de la contaminación leve ocasional de algunos de los sustratos por pequeñas cantidades de fenoles. Se realizaron ensayos posteriores consolidando las adiciones de la siguiente manera: la reacción se templó por la adición de 30 µl de una mezcla 1:1:1 de Na EDTA 50 mM; buffer pH 10 y 4-aminoantipirina 0,2%, luego agregando 10 µl de ferrocianuro de potasio 0,8%.

3.2 – Extracción

Actividad del AAD-1 (v1) recombinante expresado en *Escherichia coli*. Los pellets de células de *E. coli* se suspendieron nuevamente en Tris 0,1 M, pH 7,4 + 1mg/ml de lisozima (5 ml/células de cultivo de 250 ml; 20 ml/células de 1 litro) a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 15 minutos con agitación ocasional, la suspensión se congeló en nitrógeno líquido y luego se descongeló. La DNasa se agregó a 0,02 mg/ml de concentración final y $MgCl_2$ a 1 mM. Una vez que el extracto dejó de ser viscoso, el extracto se centrífugo durante 15 min. El sobrenadante se pasó sobre una columna a BioRad 10DG pre-equilibrada con MOPS 20 mM pH 6,75 y el eluyente se almacenó en alícuotas a –70°C. Los ensayos se llevaron a cabo ya sea con estos extractos desalados no purificados o con enzimas purificadas.

Un pellet celular de un cultivo de 250 ml de células *E. coli* inducidas que expresan el pDAB3203 que contiene el gen que codifica el *AAD-1 (v1)* se extrajo y se ensayó utilizando los protocolos descriptos previamente. La actividad de escisión del 2,4-D en el extracto de AAD-1 (v1) se comparó con la de las células de *E. coli* que expresan un vector sin *AAD-1 (v1)* utilizando 2,4-D 1 mM y se

muestra en la **Figura 5**. La cantidad de 2,4-diclorofenol formado es claramente proporcional a la cantidad de extracto agregado al ensayo por lo que el extracto de control no contiene actividad de escisión del 2,4-D.

La actividad de este extracto se ensayó en otros cuatro herbicidas, (R,S)-diclorprop, (R,S)-mecoprop, (R,S)-haloxifop y (R,S)-diclofop en comparación con el 2,4-D (todos a una concentración final de 0,5 mM) utilizando 4 µl del extracto de *E. coli* por ensayo con un período de ensayo de 15. La **Figura 6A** muestra que el AAD-1 (v1) escindió los cinco herbicidas para dar un fenol con actividad relativa sobre los sustratos que son diclorprop = mecoprop > diclofop > haloxifop > 2,4-D. De este modo el AAD-1 (v1) tiene actividad sobre herbicidas de ariloxifenoxipropionato graminicidas como así también de fenoxi auxinas.

El extracto de AAD-1 (v1) luego se ensayó utilizando (R,S)-haloxifop racémico, el enantiómero R de haloxifop y el enantiómero S de cihalofop (todos a 0,5 mM) como sustratos potenciales para evaluar la especificidad probablemente enantiomérica del AAD-1 (v1). Los resultados se muestran en la **Figura 6B**. La actividad de la enzima sobre el (R)-haloxifop fue equivalente a la del (R,S)-haloxifop por lo que no se registró actividad sobre el enantiómero S de cihalofop indicando que el AAD-1 (v1) tiene especificidad R sobre los AOPP.

Ejemplo 4 – Especificidad de sustrato de AAD-1 (v1)

4.1 – Sustratos adicionales de AAD-1 (v1).

Se ensayó la especificidad de sustrato de AAD-1 (v1) hacia una variedad de herbicidas comerciales y experimentales. La AAD-1 (v1) purificada se utilizó a ya sea 1 o 10 µg por 160 µl de ensayo y cada sustrato se ensayó a 1 mM con un tiempo de ensayo de 15 minutos. **La Tabla 3** muestra la A_{510} detectada después de la acción del AAD-1 (v1) sobre una variedad de herbicidas de ariloxialcanoato auxínico y análogos de auxina. El mejor sustrato ensayado fue diclorprop, siendo el mecoprop también escindido eficazmente. Otros dos fenoxipropionatos, los

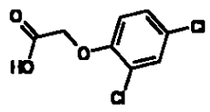
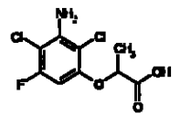
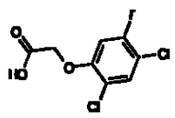
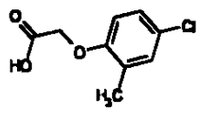
análogos 4-fluoro y 3-amino de diclorprop, también fueron escindidos eficazmente por el AAD-1 (v1). AAD-1 (v1) produjo pequeñas cantidades de fenol de una variedad de fenoxiacetatos incluyendo el 2,4-D. Las velocidades relativas de estos sustratos se midieron mejor a partir de los ensayos utilizando las cantidades más elevadas (10 µg) de AAD-1 (v1). A partir de estos datos, el 2,4-D es escindido por AAD-1 (v1), como lo son dos fenoxialquilsulfonatos, X188476 y X398166 (sesona).

La Tabla 4 muestra los datos para una variedad de herbicidas graminicidas de AOPP como sustratos de AAD1 y además del antídoto cloquintocet. Todos los herbicidas tipo AOPP comerciales ensayados fueron escindidos eficazmente por AAD-1 (v1). Este es un hallazgo inesperado y aumenta enormemente la utilidad potencial de esta enzima confiriendo resistencia a una amplia variedad de herbicidas graminicidas en usos transgénicos, además de las auxinas. AAD-1 (v1) tiene la actividad más elevada sobre quizalofop (76% de la velocidad de diclorprop) y la actividad más baja sobre cihalofop (27% de la velocidad de quizalofop, 21% de la proporción de diclorprop). El análogo de ariloxiacetato de haloxifop (X043865) se escindió muy lentamente con sólo un pequeño aumento en A_{510} utilizando la cantidad más elevada de enzima (10 µg). Esto es uniforme con la actividad más elevada de AAD-1 (v1) vista sobre los fenoxipropionatos con relación a los fenoxiacetatos de auxina. La actividad mínima se detectó sobre (S)-cihalofop indicando que el AAD-1 (v1) tiene una preferencia significativa por los enantiómeros R de los sustratos de ariloxipropionato. De manera similar, no se observó actividad contra el antídoto de quinolinoxiacetato, cloquintocet, lo cual es consistente con la observación de que AAD-1 (v1) prefiere los sustratos de ariloxipropionato sobre las fenoxi auxinas.

Los sustratos X11115427, X124987 y MCPA se ensayaron a 1 mM utilizando 27 µg de AAD-1 (v1) bruta recombinante por ensayo. Los tres compuestos fueron sustratos para ADD-1 (v1) pero con diferente efectividad relativa (**Tabla 8**). El X11115427 fue levemente mejor como sustrato que el 2,4-D (125% de la proporción de 2,4-D) en contraste con el análogo cercano 3-amino-diclorprop, el cual es aproximadamente 7 veces mejor que el 2,4-D como sustrato (**Tabla 3**). La sustitución de 5-F parece disminuir la efectividad del X11115427 como sustrato para AAD-1 (v1). Las velocidades de formación de producto a partir de 5-F-fenoxiacetato y MCPA fueron 32% y 55% del 2,4-D respectivamente.

Tabla 8: Efecto de la AAD-1 (v1) sobre los tres sustratos con relación al 2,4-D. Los sustratos se ensayaron como en la Tabla 6 a 1 mM utilizando un extracto de AAD-1 (v1) bruto recombinante de *E. coli*.

Tabla 8. Efecto de la AAD-1 (v1) sobre los tres sustratos con relación al 2,4-D.

Registro de ID	Estructura molecular	Compuesto	A510	% de 2,4-D
195517		2,4-D	0177	100
11115427		(R,S)-3-amino, 5-F-diclorprop	0,221	125
124987		5-F, 2,4-D	0,056	32
192711		MCPA	0,097	55

4.2— Caracterización cinética.

Los valores de K_m y k_{cat} de AAD-1 (v1) purificada (ver Ejemplo 10) se determinaron para cuatro sustratos herbicidas, (R)-diclorprop, (R)-haloxifop, (R)-quizalofop y 2,4-D en condiciones de ensayo estándar (MOPS 25 mM, pH 6,8; ascorbato de Na 200 µM; Fe^{2+} 200 µM; α-cetoglutarato 1 mM; 25° C). Las curvas de respuesta a la dosis se fijaron usando Grafit (Erithacus Software, Reino Unido), y los gráficos y constantes derivadas se muestran en la **Figura 7** y la **Tabla 9** respectivamente. Los valores de K_m para los cuatro sustratos fueron bastante similares (75–125 µM), pero los valores de k_{cat} variaron significativamente. El (R)-diclorprop tuvo el valor de k_{cat} más elevado y el 2,4-D el más bajo (10% del de (R)-diclorprop). Estos valores de k_{cat} fueron consistentes con el rango de valores observados en los ensayos de especificidad de sustrato que se muestra en la **Tabla 3** y la **Tabla 4** ya que estos se llevaron a cabo a concentraciones de sustrato elevadas (de saturación) (1 mM).

Tabla 9: Constantes cinéticas para sustratos de AAD-1 (v1). Las constantes cinéticas derivaron de los datos de la Figura 7 utilizando ajuste de Grafit para la ecuación de Michaelis-Menten.

Tabla 9. Constantes cinéticas para sustratos de AAD-1 (v1).

Sustrato	K_m (µM) ± SE	V_{max} (µmol min^{-1} mg^{-1} AAD1) ± SE	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1} mM^{-1})
R-diclorprop	75 ± 10	0,79 ± 0,03	26,1	348
R-quizalofop	125 ± 20	0,57 ± 0,03	18,9	151
R-haloxifop	120 ± 54	0,34 ± 0,04	11,2	94
2,4-D	96 ± 8	0,57 ± 0,00	2,7	28

Los valores de K_m y k_{cat} para diclorprop y 2,4-D difieren significativamente de los publicados para la dioxigenasa R específica del *Delftia acidovorans* de

Westendorf *et al.* (2003) (*Acta Biotechnol.* 23: 3-17). El valor de k_{cat}/K_m publicado para 2,4-D es 0,6% del de diclorprop, mientras que en nuestros estudios, el valor de k_{cat}/K_m para 2,4-D es 8% del de diclorprop. De este modo, en este estudio, AAD-1 (v1) es inesperadamente eficaz para catalizar la escisión del 2,4-D. Esto incrementa su utilidad potencial para conferir características de tolerancia herbicida diversa en aplicaciones transgénicas.

4.3 – Sustratos adicionales para AAD-1 (v1).

Se ensayaron tres sustratos adicionales a 1 mM utilizando 27 µg de AAD-1 (v1) bruto recombinante por ensayo: X11115427, X124987 y MCPA. Los resultados se muestran en la **Tabla 8**. Los tres compuestos fueron sustratos para AAD-1 (v1) pero con diferente efectividad relativa. El X11115427 sólo fue levemente mejor (125%) como sustrato que el 2,4-D. Esto es en contraste con el 3-aminodiclorprop el cual es siete veces mejor que el 2,4-D como sustrato (**Tabla 3**). De este modo, la sustitución 5-F ha disminuido significativamente la efectividad de X11115427 como sustrato para AAD-1 (v1). Un patrón similar se observa con el 5-F-2,4-D el cual es solamente 32% tan efectivo como sustrato con relación al 2,4-D. En este ensayo, el MCPA además fue menos efectivo como sustrato de AAD-1 (v1) (55% con relación al 2,4-D).

Ejemplo 5 – Optimización de la secuencia para la expresión en plantas

5.1 – Antecedentes

Para obtener una expresión alta de los genes heterólogos en plantas, se puede preferir rediseñar dichos genes de modo que se expresen en forma más eficiente en (el citoplasma de) células de planta. El maíz es un tipo de planta tal en la cual es preferible re-diseñar el gen o genes heterólogos antes de la transformación para aumentar su nivel de expresión en dicha planta. Por lo tanto, un paso adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana consiste en re-diseñar un gen heterólogo para una expresión óptima.

Una razón para re-diseñar una proteína bacteriana para expresión en maíz es el contenido de G+C no óptimo del gen natural. Por ejemplo, el contenido de G+C muy bajo de muchos genes bacterianos naturales (y el consiguiente sesgado hacia el contenido de A+T alto) da por resultado la generación de secuencias que imitan o duplican las secuencias de control génico de planta que son conocidas como muy ricas en A+T. La presencia de algunas secuencias de A+T ricas dentro del ADN de los genes introducidos en plantas (por ejemplo las regiones de caja TATA normalmente halladas en promotores génicos) pueden dar por resultado una transcripción aberrante de los genes. Por otro lado, la presencia de otras secuencias reguladoras en el ARNm (por ejemplo, secuencias de señal de poliadenilación (AAUAAA), o secuencias complementarias a pequeños ARNs nucleares involucrados en el pre-corte y empalme del ARNm) pueden conducir a la inestabilidad del ARN. Por lo tanto, un objetivo en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana para expresión de maíz, con mayor preferencia denominada gen optimizado de planta, consiste en generar una secuencia de ADN que tiene un contenido de G+C más alto, y con preferencia uno próximo al de los genes de maíz que codifican las enzimas metabólicas. Otro objetivo en el diseño de los genes optimizados de planta que codifican una proteína bacteriana consiste en generar una secuencia de ADN en la cual las modificaciones de la secuencia no impidan la traducción.

La **Tabla 10** ilustra cuán alto es el contenido de G+C en el maíz. Para los datos de la **Tabla 10**, regiones codificadoras de los genes se extrajeron de las entradas del GenBank (Publicación 71), y las composiciones de bases se calcularon utilizando el programa MacVectorTM (Accelerys, San Diego, California). Las secuencias de intrón se ignoraron en los cálculos.

Tabla 10: Compilación del contenido de G + C de las regiones codificadoras de proteína de los genes del maiz

Clase de Proteína.sup.a	Rango % G + C	% Medio G + C.sup.b
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)

.sup.a Cantidad de genes de la clase dada entre paréntesis.

.sup.b Desviaciones estándar dadas entre paréntesis.

.sup.c Grupos combinados medios ignorados en el cálculo medio

Debido a la plasticidad otorgada por la redundancia/degeneración del código genético (es decir, algunos aminoácidos son especificados por más de un codón), la evolución de los genomas en diferentes organismos o clases de organismos ha dado por resultado un uso diferencial de codones redundantes. Este "sesgo de codones" se refleja en la composición de bases media de regiones codificadoras de proteínas. Por ejemplo, los organismos con contenido de G+C relativamente bajo utilizan codones que tienen A o T en la tercera posición de los codones redundantes, por lo que aquellos que tienen contenido de G+C más elevados utilizan codones que tienen G o C en la tercera posición. Se piensa que la presencia de codones "menores" dentro de un ARNm puede reducir la proporción de traducción absoluta de ese ARNm, especialmente cuando la abundancia relativa del ARNt cargado correspondiente al codón menor es baja. Una extensión de esto es que la disminución de la proporción de traducción por codones menores individuales sería al menos aditiva para codones menores múltiples. Por lo tanto, los ARNm que tienen un contenido relativo alto de codones

menores tienen las proporciones de traducción correspondientemente bajas. Esta proporción estaría reflejada por posteriores niveles bajos de la proteína codificada.

En el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana para expresión de maíz (u otra planta, tal como algodón o soja), se ha determinado el sesgo de codones de la planta. El sesgo de codones para el maíz es la distribución estadística de codones que la planta utiliza para codificar sus proteínas y el uso preferido de codones se muestra en la **Tabla 11**. Después de determinar el sesgo, se determina el porcentaje de frecuencia de los codones en los genes de interés. Los codones primarios preferidos por la planta deben ser determinados, como así también la segunda, tercera y cuarta selección de codones preferidos cuando existen múltiples selecciones. Se puede diseñar entonces una nueva secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína bacteriana, pero la nueva secuencia de ADN difiere de la secuencia de ADN bacteriana nativa (que codifica la proteína) por la sustitución de los codones de la planta (primera preferida, segunda preferida, tercera preferida o cuarta preferida) para especificar el aminoácido en cada posición dentro de la secuencia de aminoácidos. La nueva secuencia luego se analiza para sitios enzimáticos de restricción que han sido creados por la modificación. Los sitios identificados luego se modifican reemplazando los codones con codones de primera, segunda, tercera o cuarta selección preferida. Otros sitios en la secuencia que podrían afectar la transcripción o traducción del gen de interés son las uniones exón:intrón (5' o 3'), señales de adición de poliA, o señales de terminación de ARN polimerasa. La secuencia luego se analiza y se modifica para reducir la frecuencia de dobletes TA o GC. Además de los dobletes los bloques de secuencia G o C que tienen más de aproximadamente cuatro residuos que son iguales pueden afectar la trascripción de la secuencia. Por lo tanto, estos bloques

también se modifican reemplazando los codones de la primera o segunda selección, etc. con el próximo codón preferido de selección.

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

Aminoácido	Codón*
Alanina	GCC/GCG
Cisteína	TGC/TGT
Ácido aspártico	GAC/GAT
Ácido glutámico	GAG/GAA
fenilalanina	TTC/TTT
Glicina	GGC/GGG
Histidina	CAC/CAT
Isoleucina	ATC/ATT
Lisina	AAG/AAA
Leucina	CTG/CTC
Metionina	ATG
Asparagina	AAC/AAT
Prolina	CCG/CCA
Glutamina	CAG/CAA
Arginina	AGG/CGC
Serina	AGC/TCC
Treonina	ACC/ACG
Valina	GTG/GTC
Triptofano	TGG
Tirosina	TAC/TAT
de detención	TGA/TAG

Se prefiere que el gen o genes optimizados de planta que codifican una proteína bacteriana contenga aproximadamente 63% de codones de primera

selección, entre aproximadamente 22% y aproximadamente 37% de codones de segunda selección, y entre aproximadamente 15% y aproximadamente 0% de codones de tercera o cuarta selección, donde el porcentaje total es 100%. Se prefiere por sobre todo que el gen o genes optimizados de planta contengan aproximadamente 63% de codones de primera selección, al menos aproximadamente 22% de codones de segunda selección, aproximadamente 7,5% de codones de tercera selección, y aproximadamente 7,5% de codones de cuarta selección, donde el porcentaje total es 100%. El método descripto anteriormente permite a un experto en la técnica modificar los genes que son extraños a una planta particular de modo que los genes se expresen óptimamente en plantas. El método se ilustra además en la Solicitud PCT WO 97/13402.

De este modo, para diseñar los genes optimizados de planta que codifican una proteína bacteriana, se diseña una secuencia de ADN para codificar la secuencia de aminoácidos de dicha proteína utilizando un código genético redundante a partir de una tabla de sesgo compilada para las secuencias génicas para la planta en particular. La secuencia de ADN resultante tiene un mayor grado de diversidad de codones, una composición de bases deseable, puede contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción colocados estratégicamente, y carece de secuencias que podrían interferir con la transcripción del gen, o la traducción del ARNm producto. De este modo, los genes sintéticos que son funcionalmente equivalentes a las proteínas/genes de la presente invención pueden ser utilizados para transformar huéspedes, incluyendo plantas. Una guía adicional referida a la producción de genes sintéticos se puede hallar en, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5.380.831.

5.2 – Análisis de Reconstrucción.

El análisis extensivo de los 888 pares de bases (pb) de la secuencia de ADN de la región codificadora de *AAD-1 (v1)* nativa (SEC ID NO:3) reveló la

presencia de varios motivos de secuencia que se cree son dañinos para la expresión de planta óptima, como así también una composición de codones no óptima. Para mejorar la producción de la proteína recombinante en monocotiledóneas como así también en dicotiledóneas, se desarrolló una secuencia de ADN de "planta optimizada" que codifica la SEC ID NO: 11, la cual es la misma que la SEC ID NO:9 nativa salvo por la adición de un residuo de alanina en la segunda posición. El codón de alanina adicional (CGT; subrayado en la SEC ID NO:5) se incluyó para codificar un sitio Nco I (CCATGG) extendiéndose sobre el codón de inicio de ATG, para permitir subsiguientes operaciones de clonación. Las proteínas codificadas por las regiones codificadoras nativas (v1) y optimizadas de planta (v3) son 99,3% idénticas, difiriendo sólo en el número de aminoácido 2. En contraste, las secuencias de ADN nativa (v1) y de planta optimizada (v3) de las regiones codificadoras son sólo 77,7% idénticas. Se realizó una alineación de secuencia de los ADNs nativos y de planta optimizada, y la **Tabla 12** muestra las diferencias en las composiciones de codones de las secuencias nativas y de planta optimizada.

Tabla 12. Comparación de la composición de codones de la región codificadora de AAD-1 (v1) y la versión de la planta optimizada.

Amino ácido	Codón	Gen nativo #	% de Gen nativo	Gen de planta opt. #	% de Gen de planta opt.	Amino-ácido	Codón	Gen nativo #		Gen de Planta opt #	Gen de Planta opt %
ALA (A)	GCA	2	9.1	5	22	LEU (L)	CTA	0	0.0	0	0
	GCC	10	45.5	8	35		CTC	5	22.7	7	32
22	GCG	9	40.9	0	0		CTG	16	72.7	0	0
	GCT	1	4.5	10	43	22	CTT	0	0.0	8	36
ARG (R)	AGA	0	0.0	7	30		TTA	0	0.0	0	0
	AGG	0	0.0	7	30		TTG	1	4.5	7	32
	CGA	0	0.0	0	0	LYS (K)	AAA	1	14.3	2	29
23	CGC	16	69.6	5	22	7	AAG	6	85.7	5	71
	CGG	4	17.4	0	0	MET (M)	ATG	8	100	8	100
	CGT	3	13.0	4	17	PHE (F)	TTC	10	76.9	9	69
ASN (N)	AAC	8	100.0	4	50	13	TTT	3	23.1	4	31
8	AAT	0	0.0	4	50	PRO (P)	CCA	1	5.9	8	47
ASP	GAC	15	78.9	10	53		CCC	9	52.9	1	6

304

Tabla 12. Comparación de la composición de codones de la región codificadora de AAD-1 (v1) y la versión de la planta optimizada.

Amino ácido	Codón	Gen nativo #	% de Gen nativo	Gen de planta opt. #	% de Gen de planta opt.	Amino-ácido	Codón	Gen nativo #		Gen de Planta opt #	Gen de Planta opt %
(D) 19	GAT	4	21.1	9	47	17	CCG	7	41.2	0	0
CYS (C) 3	TGC	3	100.0	2	67		CCT	0	0.0	8	47
	TGT	0	0.0	1	33	SER (S)	AGC	11	73.3	4	27
END 1	TAA	0	0.0	0	0	15	AGT	0	0.0	0	0
	TAG	1	100.0	0	0		TCA	0	0.0	4	27
	TGA	0	0.0	1	100		TCC	2	13.3	3	20
GLN (Q) 13	CAA	0	0.0	7	54		TCG	2	13.3	0	0
	CAG	13	100.0	6	46		TCT	0	0.0	4	27
GLU (E) 16	GAA	8	50.0	5	31	THR (T)	ACA	1	4.3	8	26
	GAG	8	50.0	11	69		ACC	16	69.6	9	39
GLY (G)	GGA	0	0.0	6	29	23	ACG	5	21.7	0	0
	GGC	15	71.4	7	33		ACT	1	4.3	8	35
21	GGG	3	14.3	2	10	TRP (W)	TGG	5	100	5	100
	GGT	3	14.3	6	29	TYR (Y)	TAC	7	70.0	6	60
HIS (H)	CAC	6	60.0	5	50	10	TAT	3	30.0	4	40
10	CAT	4	40.0	5	50	VAL (V)	GTA	2	7.1	0	0
ILE (I)	ATA	0	0.0	3	25		GTC	11	39.3	8	29
12	ATC	12	100.0	5	42	28	GTG	15	53.6	10	36
	ATT	0	0.0	4	33		GTT	0	0.0	10	36
	Totales	148		149			Totales	148		148	

5.3 – Terminación de vectores binarios.

5.3.1 –*AAD-1 (v3) reconstruido*. El gen de planta optimizada *AAD-1 (v3)* se recibió de Picoscript (el diseño de reconstrucción del gen se completó (ver lo arriba mencionado) y se encargó a Picospript para la construcción) y la secuencia se verificó internamente (SEC ID NO:5) para confirmar que no hubo alteraciones de la secuencia esperada. Las reacciones de secuenciamiento se llevaron a cabo con cebadores Delanteros M13 (SEC ID NO:16) e Inversos M13 (SEC ID NO:17) utilizando los reactivos del "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" de Beckman Coulter como se mencionó anteriormente. Los datos de secuencia se analizaron y los resultados indicaron que no hubo anomalías en la secuencia de ADN de AAD-1 (v3) optimizado. El gen de AAD-1 (v3) se clonó en pDAB726 como un fragmento de Nco I – Sac I. La construcción resultante se denominó pDAB720,

conteniendo: [promotor de AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: *AAD-1 (v3)*: Nt OSM3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR] (verificado con digestos de restricción de Not I). Un fragmento de Not I-Not I que contiene el casete descripto luego se clonó en el sitio Not I del vector binario pDAB3038. El vector binario resultante, pDAB721, que contiene el siguiente casete [promotor de AtUbi10: Nt OSM5'UTR: *AAD-1 (v3)*: Nt OSM 3'UTR: ORF1 poliA 3'UTR: promotor de CsVMV: *PAT*: ORF25/26 3'UTR] se digirió con restricción (con Bam HI, EcoR I, EcoR V, HinD III, Pac I, y Xmn I) para verificar la orientación correcta. La construcción completa verificada (pDAB721) se utilizó para la transformación del *Agrobacterium* (ver sección 6.2).

5.3.2 –*AAD1 (v1)* Nativo y *AAD-1 (v2)* modificado. El gen *AAD-1 (v1)* (SEC ID NO:3) se amplificó por PCR del pDAB3203. Durante la reacción de PCR se realizaron alteraciones dentro de los cebadores para introducir los sitios de restricción de NcoI y SacI en el cebador de 5' y el cebador de 3' respectivamente. Los cebadores "rdpA(ncoI)" [CCC ATG GCT GCT GCA CTG TCC CCC CTC TCC] (SEC ID NO:6) and "3'saci" [GAG CTC ACT AGC GCG CCG GGC GCA CGC CAC CGA] (SEC ID NO:7) se utilizaron para amplificar un fragmento de ADN utilizando el Sistema de Fail Safe PCR (Epicenter).

El amplicón de PCR se ligó en el vector de clonación pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen) y se verificó la secuencia con los cebadores Delantero M13 (SEC ID NO:16) e Inverso M13 (SEC ID NO:17) utilizando los reactivos de secuenciamiento del "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" de Beckman Coulter .

Los datos de la secuencia identificaron un clon con la secuencia correcta. Durante el análisis se identificó un sitio de restricción NotI superfluo hacia el extremo 3' del *AAD-1 (v1)*. Este sitio se eliminó para facilitar la clonación en pDAB3038. Para eliminar el sitio adicional se realizó una reacción de PCR con un cebador interno de 5'. El sitio de NotI se alteró incorporando un nuevo codón para

un aminoácido para eliminar el sitio NotI espurio. Este cambio alteraría la arginina de la posición 212 a una cisteína. Se utilizaron los cebadores de PCR "BstEII/Del NotI" [TGG TGG TGA CCC ATC CGG GCA GCG GCT GCA AGG GCC] (SEC ID NO:8) y "3' saci" (SEC ID NO:7).

Se completó una reacción de PCR utilizando el Sistema de Fail Safe PCR (Epicenter) y el fragmento resultante se clonó en el kit de clonación pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen). Se completó la confirmación del producto correcto de PCR mediante el secuenciamiento del ADN, y el gen "fijo" recibió el nombre de *AAD-1 (v2)* (SEC ID NO:4).

Una reacción de secuenciamiento utilizando el cebador Inverso M13 (SEC ID NO:17) y los reactivos de secuenciamiento del "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" de Beckman Coulter indicaron que se había aislado el fragmento de PCR correcto. Esta construcción se digirió con las enzimas BstEII y SacI. El fragmento resultante se clonó en el pCR2.1 *AAD-1 (v2)* construcción (pCR2.1 Delta NotI) y se confirmó mediante la digestión enzimática de restricción.

El gen *AAD-1 (v2)* modificado luego se clonó en pDAB726 como un fragmento de ADN de NcoI/SacI. La construcción resultante (pDAB708) se verificó con digestos de restricción. Esta construcción luego se clonó en el pDAB3038 como un fragmento de NotI - NotI. La construcción resultante final recibió el nombre de pDAB766, que contiene el promotor de [AtUbi10: Nt OSM5'UTR: *AAD-1 (v2)*: Nt OSM 3'UTR: ORF1 poliA 3'UTR: promotor de CsVMV: *PAT*: ORF25/26 3'UTR] y se digirió por restricción para verificar la orientación correcta. La construcción completa luego se utilizó para transformación en el *Agrobacterium*.

<u>5.3.3 – Diseño de una secuencia de ADN orientada a codones de soja que codifica una EPSPS de soja con mutaciones que confieren tolerancia al glifosato.</u>

307

Este ejemplo enseña el diseño de una nueva secuencia de ADN que codifica una 3-enolpiruvil-shiquimato-5-fosfato sintasa (EPSPS), pero se optimiza para expresión en células de soja. La secuencia de aminoácidos de un EPSPS de soja triplemente mutada se describe en la SEC ID NO:5 del documento WO 2004/009761. Los aminoácidos mutados en la secuencia revelada están en el residuo 183 (treonina de la proteína nativa reemplazada con isoleucina), residuo 186 (arginina en proteína nativa reemplazada con lisina), y residuo 187 (prolina en la proteína nativa reemplazada con serina). De este modo, se puede deducir la secuencia de aminoácidos de la proteína de EPSPS de soja natural reemplazando los aminoácidos sustituidos de la SEC ID NO: 5 de WO 2004/009761 con los aminoácidos nativos en las posiciones apropiadas. Tal secuencia de proteína nativa se presenta aquí como SEC ID NO:20. Una secuencia proteica de EPSPS de soja doblemente mutada, que contiene una mutación en el residuo 183 (treonina de la proteína nativa reemplazada con isoleucina), y en el residuo 187 (prolina en proteína nativa reemplazada con serina) se presenta aquí como SEC ID NO:21.

Una tabla de uso de codones para proteína de soja (*Glicina max*) que codifica secuencias, calculada a partir de 362.096 codones (aproximadamente 870 secuencias codificadoras), se obtuvo del sitio www. "kazusa.or.jp/codon". Esos datos se reformatearon según se muestra en la **Tabla 13.** Las columnas D y H de la **Tabla 13** presentan las distribuciones (en % de uso para todos los codones para ese aminoácido) de codones sinónimos para cada aminoácido, según se halló en las regiones codificadoras de proteínas de genes de soja. Es evidente que algunos codones sinónimos para algunos aminoácidos (un aminoácido puede estar especificado por 1, 2, 3, 4 o 6 codones) están presentes en forma relativamente poco frecuente en regiones codificadoras de proteína de soja (por ejemplo, se compara el uso de los codones de GCG y GCT para

especificar la alanina). Una tabla para el uso de codones de soja sesgados se calculó a partir de los datos de la **Tabla 13.** Los codones hallados en los genes de soja en una proporción inferior al 10% de las apariciones totales para el aminoácido en particular, se ignoraron. Para equilibrar la distribución de las selecciones de codones remanentes para un aminoácido, se calculó una representación promedio ponderado para cada codón, utilizando la fórmula:

% ponderado de C1 = 1/(%C1 + %C2 + %C3 + *etc.*) x %C1 x 100

donde C1 es el codón en cuestión, C2, C3, *etc.* representan los codones sinónimos restantes, y los valores en % para los codones relevantes se toman de las columnas D y H de la **Tabla 13** (ignorando los valores de codones raros en negrita). El valor % ponderado para cada codón se muestra en las columnas C y G de la **Tabla 13.** El TGA se seleccionó arbitrariamente como el terminador de traducción. Las frecuencias de uso de codones sesgados luego se ingresaron a una tabla de códigos genéticos especializada para su uso por el programa de diseño génico OptGene™ (Ocimum Biosolutions LLC, Indianapolis, Indiana).

309

Tabla 13. Representación de codones sinónimos en secuencias codificadoras de proteína de soja, y cálculo de un conjunto de representación de codones sesgados para diseño génico sintético optimizado de soja.

A	B	C	D	E	F	G	H
Amino-ácido	**Codón**	**% en peso**	**% de soja**	**Amino-ácido**	**Codón**	**% en peso**	**% de soja**
ALA (A)	GCA	33.1	30.3	**LEU (L)**	CTA	**DNU**	**9.1**
	GCC	24.5	22.5		CTC	22.4	18.1
	GCG	**DNU***	**8.5**		CTG	16.3	13.2
	GCT	42.3	38.7		CTT	31.5	25.5
ARG (R)	AGA	36.0	30.9		TTA	**DNU**	**9.8**
	AGG	32.2	27.6		TTG	29.9	24.2
	CGA	**DNU**	**8.2**	**LYS (K)**	AAA	42.5	42.5
	CGC	14.8	12.7		AAG	57.5	57.5
	CGG	**DNU**	**6.0**	**MET (M)**	ATG	100.0	100
	CGT	16.9	14.5	**PHE (F)**	TTC	49.2	49.2
ASN (N)	AAC	50.0	50.0		TTT	50.8	50.8
	AAT	50.0	50.0	**PRO (P)**	CCA	39.8	36.5
ASP (D)	GAC	38.1	38.1		CCC	20.9	19.2
	GAT	61.9	61.9		CCG	**DNU**	**8.3**
CYS (C)	TGC	50.0	50.0		CCT	39.3	36.0
	TGT	50.0	50.0	**SER (S)**	AGC	16.0	15.1
FINAL	TAA	**DNU**	40.7		AGT	18.2	17.1
	TAG	**DNU**	22.7		TCA	21.9	20.6
	TGA	100.0	36.6		TCC	18.0	16.9
GLN (Q)	CAA	55.5	55.5		TCG	**DNU**	**6.1**
	CAG	44.5	44.5		TCT	25.8	24.2
GLU (E)	GAA	50.5	50.5	**THR (T)**	ACA	32.4	29.7
	GAG	49.5	49.5		ACC	30.2	27.7
GLY (G)	GGA	31.9	31.9		ACG	**DNU**	**8.3**
	GGC	19.3	19.3		ACT	37.4	34.3
	GGG	18.4	18.4	**TRP (W)**	TGG	100.0	100
	GGT	30.4	30.4	**TYR (Y)**	TAC	48.2	48.2
HIS (H)	CAC	44.8	44.8		TAT	51.8	51.8
	CAT	55.2	55.2	**VAL (V)**	GTA	11.5	11.5
ILE (I)	ATA	23.4	23.4		GTC	17.8	17.8
	ATC	29.9	29.9		GTG	32.0	32.0
	ATT	46.7	46.7		GTT	38.7	38.7

***DNU** = No usar

Para derivar una secuencia de ADN optimizada de soja que codifica la proteína de EPSPS doblemente mutada, la secuencia proteica de la SEC ID NO: 21 se tradujo inversamente por el programa OptGene™ utilizando el código genético sesgado de soja derivado anteriormente. La secuencia de ADN inicial derivada de este modo luego se modificó compensando los cambios de codones (a la vez que retiene la representación promedio ponderada global para los codones) para reducir las cantidades de dupletes de GC y TA entre los codones adyacentes, incrementar las cantidades de dupletes CT y TG entre codones adyacentes, eliminar las estructuras secundarias intra-hebra muy estables, eliminar o agregar sitios de reconocimiento enzimático de restricción, y eliminar otras secuencias que podrían ser dañinas para las manipulaciones de expresión o clonación del gen diseñado. Se realizaron otros refinamientos de la secuencia para eliminar los sitios de unión, corridas largas de residuos de A/T o C/G, y otros motivos que podrían interferir con la estabilidad, transcripción o traducción del ARN de la región codificadora en células de planta. Se realizaron otros cambios para eliminar los Marcos de Lectura Abiertos internos prolongados (marcos diferentes a +1). Estos cambios se realizaron dentro de las restricciones de retener la composición de codones sesgados de soja según se describió anteriormente, y a la vez preservar la secuencia de aminoácidos revelada según la SEC ID NO: 21.

La secuencia de ADN orientada a la soja que codifica la proteína EPSPS de la SEC ID NO:21 se da como bases 1-1575 de la SEC ID NO:22. La síntesis de un fragmento de ADN que comprende la SEC ID NO:22 fue realizada por un proveedor comercial (PicoScript, Houston TX).

5.3.4 – Clonación de construcciones binarias adicionales. La terminación del pDAB3295 y pDAB3757 incorporó el uso de la tecnología de Clonación GateWay Cloning (Invitrogen, cat #11791-043 y cat #12535-019). La tecnología

GateWay utiliza la recombinación específica del sitio en base al fago lambda para insertar un casete génico en un vector. Para mayor información referirse a *Gateway Technology: A universal technology to clone DNA sequence for functional analysis and expression in multiple systems*, © 1999-2003, Invitrogen Corp., 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA 92008 (impreso - 2003). Las otras construcciones creadas para transformación en especies de plantas apropiadas se construyeron utilizando procedimientos similares a los anteriores y otros métodos de clonación molecular estándar (Maniatis *et al.*, 1982). La **Tabla 14** enumera todas las construcciones de transformación utilizadas con los promotores apropiados y características definidas, como así también el cultivo transformado.

El gen *sacB* se agregó al vector binario pDAB3289 como marcador de selección negativa bacteriana para reducir la persistencia del *Agrobacterium* asociada al tejido de planta transformado. SacB es una enzima levan-sacarasa producida por el *Bacillus* spp. y es tóxica para la mayoría de las bacterias Gram negativas cuando se desarrolla en presencia de sacarosa (Gay *et al.*, 1983). El gen *sacB* se recuperó sobre un fragmento *Hind* III del plásmido pRE112 (Edwards, *et al.*, 1998) y se clonó en el único sitio *Hind* III en el pDAB3289.

312

Tabla 14. Construcciones binarias utilizadas en la transformación de varias especies de plantas

pDAB #	pDAS #	Especie * Transformada en	Gen de interés (GOI)	Promotor	Caracter. 1	Caracter. 2	GOI 2	Promotor	Gen de Selección Bacteriana	Gen de Selección Bacteriana 2	Gen de Selección de Planta	Promotor	Método de Trxn
721		A, T, Ct, S, Ca	AAD1 v3	AtUbi10	NtOsm	-	-	-	Eritromicina	-	pat	CsVMV	Agro binario
3230		A	EPSPS	AtUbi10	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	AAD1 v3	CsVMV	Agro binario
3289		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Espectinomicina	sacB	HptII	AtUbi3	Agro binario
3291		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Espectinomicina	-	HptII	AtUbi3	Agro binario
3295		S	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	pat	AtUbi10	haz de Aerosol
3297	1270	A, T	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	pat	AtUbi10	Agro binario
3403		Cn, R	AAD1 v3	Zmubi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicilina	-	Igual que GOI		Filamentos / Pistola
3404		Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicilina	-	pat	OsAct1	Filamentos
3415	1283	Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicilina	-	AHAS v3	OsAct1	Filamentos
3602	1421	Cn	AAD1 v3	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	AHAS v3	OsAct1	Agro Superbinario
3757		Ca	AAD1 v3	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Espectinomicina	-	pat	AtUbi11	Agro binario
3705		A	AAD2 v2	AtUbi10	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Eritromicina	-	pat	CsVMV	Agro binario

312

313

*A = *Arabidopsis* CsVMV = Promotor del Virus de Mosaico de Vean Cassava ZmUbi1 = Promotor de *Zea mays* Ubiquitina 1

T = Tabaco AtUbi10 = Promotor de *Arabidopsis thaliana* Ubiquitina 10 HptII = higromicina fosfotransferasa

S = Soja RB7 Mar v2 = región asociada a la matriz de *Nicotiana tabacum* (MAR)

Ct = Algodón Nt Osm = región no traducida Osmotina 5' de *Nicotiana tabacum* y la Región no traducida Osmotina 3' de *Nicotiana tabacum*

R = Arroz

Cn = Maíz (721 y 793) Atu ORF1 3' UTR = Región no traducida 3' del Marco de Lectura Abierto 1 del *Agrobacterium tumefaciens*

Ca = Canola (3295 y 3757) Atu ORF24 3' UTR = Región no traducida 3' del Marco de Lectura Abierto 24 del *Agrobacterium tumefaciens*

314

Ejemplo 6 – Transformación en *Arabidopsis* y Selección

6.1 – Condiciones de desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

Se suspendieron semillas del *Arabidopsis* de tipo salvaje en una solución al 0,1% de Agarosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Las semillas suspendidas se almacenaron a 4°C durante 2 días para completar los requerimientos de latencia y asegurar la germinación sincrónica de las semillas.

El Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) se cubrió con vermiculita fina y se sub-irrigó con solución de Hoagland hasta que se humedeció. La mezcla del suelo se dejó drenar durante 24 horas. La semilla estratificada se sembró sobre vermiculita y se cubrió con domos de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canada) durante 7 días.

La semillas se germinaron y las plantas se desarrollaron en un Conviron (modelos y CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canada) en condiciones de días extensos (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una intensidad de luz de 120-150 µmol/m^2seg a temperatura (22°C) y humedad (40-50%) constantes. La plantas se irrigaron inicialmente con solución de Hoagland y subsiguientemente con agua deionizada para mantener el suelo húmedo pero no mojado.

6.2 – Transformación del *Agrobacterium*.

Una placa de LB + agar con eritromicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (200mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) conteniendo una colonia de DH5α surcada se utilizó para dar una colonia para inocular 4 ml de cultivos mini prep (líquido LB + eritromicina). Los cultivos se incubaron durante la noche a 37°C con agitación constante. Los Qiagen (Valencia, CA) Spin Mini Preps, realizado según las instrucciones del fabricante, se utilizaron para purificar el ADN plásmido.

Se prepararon células de *Agrobacterium tumefaciens* electro-competentes (cepas Z707s, EHA101s, y LBA4404s) utilizando un protocolo de Weigel &

Glazebrook (2002). La células del *Agrobacterium* competentes se transformaron utilizando un método de electroporación adaptado de Weigel & Glazebrook (2002). 50 µl de células de agro competentes se descongelaron sobre hielo y se agregaron 10-25 ng del plásmido deseado a las células. La mezcla de células y ADN se agregó a cubetas de electroporación pre-enfriadas (2 mm). Se utilizó un electroporador Eppendorf 2510 para la transformación con las siguientes condiciones, Voltaje: 2,4kV, longitud de pulso: 5mseg.

Después de la electroporación, se agregó 1 ml de caldo de YEP (por litro: 10 g de extracto de levadura, 10 g de Bacto-peptona, 5 g de NaCl) a la cubeta y la suspensión de células-YEP se transfirió a un tubo de cultivo de 15 ml. Las células se incubaron a 28°C en un baño de agua con agitación constante durante 4 horas. Después de las incubaciones, el cultivo se plaqueó sobre YEP + agar con eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (250 mg/l). Las placas se incubaron durante 2 a 4 días a 28°C.

Las colonias se seleccionaron y se dispusieron sobre placas de YEP + agar fresco con eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estromicina (250 mg/l) y se incubaron a 28°C durante 1 a 3 días. Las colonias se seleccionaron para análisis de PCR para verificar la presencia del gen inserto utilizando cebadores específicos del vector. Los Qiagen Spin Mini Preps, realizados según las instrucciones del fabricante, se utilizaron para purificar el ADN del plasma a partir de colonias de *Agrobacterium* seleccionadas con la siguiente excepción: 4 ml de alícuotas de un cultivo mini prep durante toda la noche de 15 ml (YEP líquido + eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l)) y estreptomicina (250 mg/l)) se utilizaron para la purificación de ADN. Una alternativa al uso de ADN de Qiagen Spin Mini Prep era lisar las células de Agrobacterium transformadas, suspendidas en 10 µl de agua, a 100°C durante 5 minutos. El ADN del plásmido del vector

binario utilizado en la transformación del *Agrobacterium* se incluyó como control. La reacción de PCR se completó utilizando Taq ADN polimerasa de Takara Mirus Bio Inc. (Madison, Wisconsin) según las instrucciones del fabricante a concentraciones de 0,5x. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Ciclador Térmico MJ Research Peltier programado con las siguientes condiciones; 1) 94°C durante tres minutos, 2) 94°C durante 45 segundos, 3) 55°C durante 30 segundos, 4) 72 C durante 1 minuto, para 29 ciclos luego 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos. La reacción se mantuvo a 4°C después de la ciclación. La amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó por tinción con bromuro de etidio. Se seleccionó una colonia cuyo producto de PCR fue idéntico al plásmido control.

.6.3 – Transformación de *Arabidopsis*.

Se transformó *Arabidopsis* utilizando el método de inmersión floral. La colonia seleccionada se utilizó para inocular uno o más pre-cultivos de 15 a 30 ml de caldo de YEP que contenía eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomicina (250 mg/l). Los cultivos se incubaron durante la noche a 28°C con agitación constante a 220 rpm. Cada pre-cultivo se utilizó para inocular dos cultivos de 500 ml de caldo de YEP con contenido de eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomicina (250 mg/l) y los cultivos se incubaron durante la noche a 28° C con agitación constante. Las células luego se peletizaron a aproximadamente 8700x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante resultante. El pellet celular se suspendió nuevamente suavemente en 500 ml de medios de infiltración conteniendo: 1/2x de Murashige y sales de Skoog/vitaminas B5 de Gamborg, 10% (p/v) de sacarosa, bencilamino purina 0,044µM (10 µl/litro de 1 mg/ml de reserva en DMSO) y 300 µl/litro de Silwet L-77. Las plantas de aproximadamente 1 mes de vida se sumergieron en el medio durante 15 segundos, asegurándose de sumergir la inflorescencia más nueva. Las

plantas luego se colocaron sobre sus lados y se cubrieron (transparente u opaca) durante 24 horas, luego se lavaron con agua, y se colocaron derechas. Las plantas se desarrollaron a 22°C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Aproximadamente cuatro semanas después de la inmersión, las semillas se cosecharon.

6.4 – Selección de las plantas transformadas.

Semillas T_1 recién cosechadas (transformadas con gen [*AAD-1 (v2)*] nativo o [*AAD-1 (v3)*] de planta optimizada) se dejaron secar durante 7 días a temperatura ambiente. Las semillas T_1 se sembraron en bandejas de germinación de 26,5 x 51-cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), recibiendo cada una alícuotas de 200 mg de semillas T_1 estratificadas (~10.000 semillas) que habían sido suspendidas previamente en 40 ml de solución de agarosa 0,1% y almacenadas a 4°C durante 2 días para completar los requerimientos de latencia y asegurar la germinación sincrónica de la semilla.

El Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) se cubrió con vermiculita fina y se sub-irrigó con solución de Hoagland hasta que estuvo húmedo, luego se dejó drenar por gravedad. Cada alícuota de 40 ml de semillas estratificadas se sembró uniformemente sobre la vermiculita con una pipeta y se cubrió con domos de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canada) durante 4 a 5 días. Los domos se eliminaron 1 día antes de la selección transformante inicial utilizando rocío de post-emergencia de glufosinato (seleccionando el gen *PAT* transformado).

Cinco a seis días después de la plantación (DAP) y nuevamente 10 DAP, las plantas T_1 (cotiledón y estadío de 2-4 hojas, respectivamente) se rociaron con una solución al 0,2% de herbicida Liberty (200 g ia/l de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) a un volumen de rocío de 10 ml/bandeja (703 L/ha) utilizando una escopeta de aire comprimido DeVilbiss para suministrar una

proporción eficaz de 280 g ia/ha de glufosinato por aplicación. Las sobrevivientes (plantas de desarrollo activo) se identificaron 5 a 7 días posteriores al rociado final y se trasplantaron individualmente dentro de macetas de 3 pulgadas preparadas con medios para macetas (Metro Mix 360). Las plantas transplantadas se cubrieron con domos de humedad durante 3 a 4 días y se colocaron en una cámara de desarrollo a 22°C como se mencionó anteriormente. Los domos se eliminaron posteriormente y las plantas se llevaron a un invernadero (22±5° C, 50±30% HR, 14 h de luz:10 de oscuridad, mínimo 500 $\mu E/m^2s^1$ natural + luz suplementaria) al menos un dia antes del ensayo para determinar la capacidad del *AAD-1 (v3)* (gen de planta optimizada) o *AAD-1 (v2)* (gen microbiano nativo) para dar resistencia a herbicidas tipo fenoxi auxina.

Las plantas T_1 individuales aleatorias seleccionadas para resistencia al glufosinato anteriores se confirmaron para expresión de la proteína PAT utilizando un kit PAT ELISA (Parte no. 7000045, Strategic Diagnostics, Inc., Newark, DE) para confirmar en forma no destructiva la fidelidad del proceso de selección (protocolo del fabricante). Las plantas luego se asignaron aleatoriamente a varias proporciones de herbicidas de fenoxi (diclorprop o 2,4-D). Las proporciones de fenoxi aplicadas inicialmente fueron 12,5 g ea/ha 2,4-D y 50 o 200 g ea/ha de diclorprop. El GR_{99} para el *Arabidopsis* es aproximadamente 50 g ea/ha de 2,4-D y 200 g ea/ha de diclorprop. Proporciones elevadas se aplicaron en ensayos subsiguientes (50, 200, 800, o 3200g ea/ha).

Todas las aplicaciones de herbicidas de auxina se realizaron utilizando el rociador DeVilbiss según se describió anteriormente para aplicar 703 L/ha de volumen de rocío (0,4 ml de solución/pote de 3 pulgadas) o aplicadas por atomizador de vía en un volumen de 187 L/ha. El 2,4-D utilizado era de grado técnico (Sigma, St. Louis, MO) disuelto en DMSO y diluido en agua (<1% de concentración final de DMSO) o la formulación de sal de dimetilamina comercial

(456 g ae/l, NuFarm, St Joseph, MO). El diclorprop utilizado era de grado técnico (Sigma, St. Louis, MO) disuelto en DMSO y diluido en agua (<1% de concentración final de DMSO). A medida que las proporciones de herbicida aumentaban por encima de 800 g ea/ha, el pH de la solución de rocío se volvió excesivamente ácido, quemando las hojas de las plantas de *Arabidopsis* tiernas y jóvenes y complicando la evaluación de los efectos primarios de los herbicidas. Se tomó una práctica estándar aplicar estas proporciones elevadas de herbicidas de fenoxi en buffer de Tris 200 mM (pH 9,0) hasta un pH final de ~7-8.

Algunas plantas individuales T_1 se sometieron a herbicidas comerciales alternativos en lugar de una fenoxi auxina. Un punto de interés consistió en determinar si el haloxifop podría ser degradado eficazmente *in planta*.

Si bien *Arabidopsis*, que es una dicotiledónea, no es un sistema óptimo para ensayar los herbicidas herbáceos de AOPP que inhiben la ACCasa, las plantas T_1 transformadas con el *AAD-1 (v3)* se sometieron a proporciones elevadas (400-1600 g ea/ha) del ácido RS-haloxifop (sintetizado internamente) que sí causan anormalidades en el crecimiento y muerte de *Arabidopsis* de tipo salvaje utilizando el atomizador DeVilbiss según se describió anteriormente. Las proporciones de lesión se tomaron 7 y 14 días posteriores al tratamiento. De igual modo, las plantas individuales T_1 se trataron con el herbicida de piridiloxiacetato auxina, fluroxipir.

6.5 – Resultados de la selección de plantas transformadas.

Las primeras transformaciones de *Arabidopsis* se llevaron a cabo utilizando el *AAD-1 (v3)* (gen de planta optimizada). Primero los transformantes de T_1 se seleccionaron del ambiente de la semilla no transformada utilizando un esquema de selección de glufosinato. Más de 400.000 semillas de T_1 se clasificaron y se identificaron 493 plantas resistentes al glufosinato (gen PAT), igualando a una frecuencia de transformación/selección del 0,12%. Dependiendo del lote de semillas ensayado, éste varió de 0,05 a 0,23% (*ver* **Tabla 15**). Un pequeño lote de

semillas transformadas con el *AAD-1 (v2)* (nativo) se seleccionó utilizando el agente de selección de glufosinato. Doscientos setenta y ocho plantas individuales de T_1 se identificaron sobre 84.000 semillas evaluadas (0,33% de frecuencia de transformación/selección).

Tabla 15: Selección de AAD-1 (v3) (planta optimizada) o AAD-1 (v2) (nativa), AAD-2 (v1) nativa), o plantas individuales T_1 transformadas con AAD-2 (v2) que utilizan glufosinato y 2,4-D.

Agente de selección	Gen	Sesgo de Codo-nes	Semillas totales sembradas y clasificadas	Cantidad de T_1 resistente	Proporción de selección	Rango de proporción de selección	% de plantas seleccionadas que expresan PAT[3]
Glufosinato[1]	*AAD-1 (v2)*	n	84.000	278	0,33%	0,33%	nd[4]
Glufosinato[1]	*AAD-1 (v3)*	p	400.500	493	0,12%	0,05 a 0,23%	97%
2,4-D[2]	*AAD-1(v3)*	p	70.000	53	0,08%	0,07 a 0,08%	96%
Glufosinato[1]	*AAD-2 (v1)*	n	1.301.500	228	0,018%	0,007 a 0,021%	100%
Glufosinato[1]	*AAD-2(v2)*	p	200.000	224	0,11%	0,11%	nd[4]

[1] Esquema de selección de Glufosinato: 280g ia/ha de glufosinato aplicado 5-6 + 10 DAP
[2] Esquema de selección de 2,4-D: 50 g ia/ha de 2,4-D aplicado 5-7 + 10-14 DAP
[3] Expresión de proteína PAT determinada por cintas de PAT ELISA
[4] nd, no determinado
[5] Sesgo de codones, n=gen microbiano nativo, p=planta optimizada

Las plantas T_1 seleccionadas anteriormente se transplantaron subsiguientemente a potes individuales y se rociaron con varias proporciones de herbicidas de ariloxialcanoato comerciales. La **Tabla 16** compara la respuesta de los genes *AAD-1 (v2)* nativo y *AAD-1 (v3)* de planta optimizada para impartir resistencia al 2,4-D a los transformantes T_1 de *Arabidopsis*. Ambos genes impartieron resistencia a las plantas T_1 de *Arabidopsis* individuales. Dentro de un tratamiento dado, el nivel de respuesta de planta varió enormemente y puede atribuirse al hecho de que cada planta representa un evento de transformación independiente. Es de importancia destacar que en cada proporción de 2,4-D ensayada, hubo individuos que no se vieron afectados mientras que algunos se afectaron severamente. Un promedio de lesión de población total por proporción se presenta en la **Tabla 16** simplemente para demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con *AAD-1 (v2)* o *AAD-1 (v3)* versus los controles transformados de *PAT/Cry1F* o de tipo salvaje. Además es evidente que la tolerancia parece ser significativamente mayor (nivel de frecuencia y total de respuesta individual) para la secuencia de planta optimizada de *AAD-1 (v3)* versus la secuencia nativa de *AAD-1 (v2)* (ver **Tabla 16**). Proporciones más elevadas de 2,4-D (hasta 3.200 g ea/ha) han sido aplicadas a individuos T_1 que expresan el AAD-1 (v3). Los niveles de lesión tienden a ser mayores y la frecuencia de plantas muy resistentes es inferior a estas proporciones elevadas (6x las proporciones de campo). Además a estas proporciones elevadas, la solución atomizadora se vuelve muy ácida a menos que sea regulado el buffer. *Arabidopsis* desarrollada mayormente en la cámara de desarrollo tiene una cutícula muy delgada y los efectos de quemadura severos pueden complicar el ensayo a estas proporciones elevadas. No obstante, algunos individuos han sobrevivido a 3.200 g ea/ha de 2,4-D con menos lesiones o ningún tipo de lesión.

Tabla 16. Respuesta de *Arabidopsis* T_1 transformada con *AAD-1 v3* (planta optimizada), o *AAD-1 v2* (nativa), o *AAD-2* (nativa) a un rango de proporciones de 2,4-D aplicadas en post-emergencia. La respuesta se presenta en términos de % de lesión visual 2 WAT. Los datos se presentan como un histograma de individuos que exhiben una pequeña lesión o ninguna (<20%), lesión moderada (20-40%), o lesión severa (>40%). Dado que cada T_1 es un evento de transformación independiente, se puede esperar una variación significativa de respuestas de T_1 individuales dentro de una proporción dada. Una desviación aritmética estándar y media se presenta para cada tratamiento. El rango en la respuesta individual además se indica en la última columna para cada proporción y transformación. *Arabidopsis* transformada con *PAT/Cry1F* sirvió como control transformado sensible a la auxina. *Arabidopsis* de tipo salvaje no se transformó.

Tabla 16. Respuesta de *Arabidopsis* T_1 transformada con *AAD-1 v3* (planta optimizada) o *AAD-1 v2* (nativa) o *AAD-2* (nativa) a un rango de proporciones de 2,4-D aplicadas en post-emergencia.

	% de lesión			% de lesión	
Gen AAD-1 (v2) nativo					Desv.
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Est.
Buffer de control no tratado	20	6	7	25,3	34,7
50 g ea/ha 2,4-D	55	16	9	14,8	22,7
200 g ea/ha 2,4-D	45	11	24	34,1	39,3
800 g ea/ha 2,4-D	11	32	37	52,5	34,2
gen AAD-2 nativo	% de lesión			% de lesión	

Promedios				Prom.	Desv. Est.
	<20%	20-40%	>40%		
Buffer de control no tratado	4	1	1	25,0	21,7
50 g ea/ha 2,4-D	1	2	11	68,2	30,2
200 g ea/ha 2,4-D	0	3	11	82,7	28,8
800 g ea/ha 2,4-D	0	0	14	99,8	0,8

gen AAD-1 (v3) reconstruido	% de lesión			% de lesión Prom.	Desv. Est.
Promedios	<20%	20-40%	>40%		
Buffer de control no tratado	9	0	0	0,0	0,0
50 g ea/ha 2,4-D	10	1	5	24,3	35,9
200 g ea/ha 2,4-D	11	4	1	14,0	25,9
800 g ea/ha 2,4-D	11	4	1	14,7	26,1

Tipo salvaje	% de lesión			% de lesión Prom.	Desv. Est.
Promedios	<20%	20-40%	>40%		
Buffer de control no tratado	11	0	0	0,0	0,0
50 g ea/ha 2,4-D	0	0	15	90,0	0,0
200 g ea/ha 2,4-D	0	0	15	95,1	0,5
800 g ea/ha 2,4-D	0	0	15	100,0	0,0

PAT/Cry1F (control transformado)	% de lesión			% de lesión	
				Prom.	Desv.
Promedios	<20%	20-40%	>40%		Est.
Buffer de control no tratado	11	0	0	0,0	0,0
50 g ea/ha 2,4-D	0	0	15	90,7	4,2
200 g ea/ha 2,4-D	0	0	15	97,2	1,7
800 g ea/ha 2,4-D	0	0	15	100,0	0,0

La Tabla 17 muestra una respuesta a la dosis similar de *Arabidopsis* T_1 al ácido fenoxipropiónico, diclorprop. Tendencias similares se observaron con el 2,4-D, indicando que la cadena lateral propiónica quiral sirve en realidad como sustrato aceptable. A continuación, se determinó que un grado de tolerancia aumentada al haloxifop podría impartirse a *Arabidopsis* transformada en proporciones elevadas de 400 – 1.600 g ea/ha (**Tabla 18**). La proporción de uso de campo normal para el haloxifop (un herbicida específico de pasturas) es alrededor de 50-70 g ea/ha. En general se considera que las dicotiledóneas son tolerantes por naturaleza a los herbicidas tipo AOPP; sin embargo, se producen efectos fisiológicos severos en *Arabidopsis* en estas proporciones elevadas. Algunos individuos transformados con *AAD1 (v3)* realmente mostraron tolerancia aumentada al haloxifop. Esto aporta los primeros datos *in planta* que el *AAD-1 (v3)* aportará resistencia a AOPP. No se observó resistencia con el fluroxipir (una piriridiloxiacetato auxina) en *Arabidopsis* transformada, consistente con el trabajo *in vitro* que utiliza enzimas expresadas de manera heteróloga.

Tabla 17. Respuesta de *Arabidopsis* T_1 a un rango de proporciones de diclorprop aplicadas en post-emergencia. La respuesta se presentó en términos de % de lesión visual 2 WAT. Los datos se presentan como un histograma de individuos que exhiben una pequeña lesión o ninguna (<20%), lesión moderada

(20-40%), o lesión severa (>40%). Dado que cada T_1 es un evento de transformación independiente, se puede esperar una variación significativa de respuestas de T_1 individuales dentro de una proporción dada. Una desviación aritmética estándar y media se presenta para cada tratamiento. El rango en la respuesta individual además se indica en la última columna para cada proporción y transformación. *Arabidopsis* transformada con *PAT/Cry1F* sirvió como control transformado sensible a la auxina. *Arabidopsis* de tipo salvaje no se transformó.

Tabla 17. Respuesta de *Arabidopsis* T_1 a un rango de proporciones de diclorprop aplicadas en post-emergencia.

	% de lesión			% de lesión		
AAD-1 v3		20-	>40		Desv.	
Promedios	<20%	40%	%	Prom.	Est.	Rango
Control no tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
12.5 g ea/ha RS-diclorprop	7	1	0	5.0	7.6	0-20
50 g ea/ha RS-diclorprop	7	1	0	3.1	8.8	0-25
200 g ea/ha RS-diclorprop	4	1	3	40,0	50.1	0-100
800 g ea/ha RS-diclorprop	0	5	3	51.9	40,0	20-100

PAT/Cry1F Promedios	% de lesión			% de lesión		
	<20%	20-40%	>40 %	Prom.	Desv. Est.	Rango
Control no tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
12.5 g ea/ha RS-diclorprop	0	6	2	38,1	25,3	20-95
50 g ea/ha RS-diclorprop	0	0	8	80,0	25,3	50-100
200 g ea/ha RS-diclorprop	0	0	8	98,3	2,2	95-100
800 g ea/ha RS-diclorprop	0	0	8	100,0	0,0	100

Tipo salvaje Promedios	% de lesión			% de lesión		
	<20%	20-40%	>40 %	Prom.	Desv. Est.	Rango
Control no tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
12.5 g ea/ha RS-diclorprop	3	0	0	13,3	2,9	10-15
50 g ea/ha RS-diclorprop	0	0	3	53,3	5,8	50-60
200 g ea/ha RS-diclorprop	0	0	3	95,0	5,0	90-100
800 g ea/ha RS-diclorprop	0	0	3	100,0	0,0	100

Tabla 18. Respuesta de *Arabidopsis* T1 a un rango de proporciones de haloxifop aplicadas en post-emergencia en proporciones artificialmente elevadas intentando mostrar la tolerancia de la dicotiledónea *Arabidopsis* al graminicida. La respuesta se presenta en términos de % de lesión visual 2 WAT. Los datos se

presentan como un histograma de individuos que exhiben una pequeña lesión o ninguna (<20%), lesión moderada (20-40%), o lesión severa (>40%). Dado que cada T_1 es un evento de transformación independiente, se puede esperar una variación significativa de respuestas de T_1 individuales dentro de una proporción dada. Una desviación aritmética estándar y media se presenta para cada tratamiento. El rango en la respuesta individual además se indica en la última columna para cada proporción y transformación. La *Arabidopsis* transformada con *PAT/Cry1F* sirvió como control transformado sensible a la auxina. La *Arabidopsis* de tipo salvaje no se transformó.

Tabla 18. Respuesta de *Arabidopsis* T1 a un rango de proporciones de haloxifop aplicadas en post-emergencia en proporciones artificialmente elevadas intentando mostrar la tolerancia de la dicotiledónea *Arabidopsis* al graminicida.

	% de lesión			% de lesión		
AAD-1 v3		20-	>40		Desv.	
Promedios	<20%	40%	%	Prom.	Est.	Rango
Control no tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
100 g ea/ha haloxifop	4	0	0	0,0	0,0	0
200 g ea/ha haloxifop	4	0	0	0,0	0,0	0
400 g ea/ha haloxifop	3	1	0	6,3	9,5	0-20
800 g ea/ha haloxifop	1	1	2	46,3	42,7	0-85
1600 g ea/ha haloxifop	1	0	3	65,0	47,3	0-100

PAT/Cry1F Promedios	% de lesión			% de lesión		
	<20%	20-40%	>40 %	Prom.	Desv. Est.	Rango
Control no tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
100 g ea/ha haloxifop	4	0	0	0,0	0,0	0
200 g ea/ha haloxifop	4	0	0	10,0	0,0	10
400 g ea/ha haloxifop	0	4	0	27,5	5,0	20-30
800 g ea/ha haloxifop	0	0	4	78,8	6,3	70-85
1600 g ea/ha haloxifop	0	0	4	47,5	43,5	80-100

Tipo salvaje Promedios	% de lesión			% de lesión		
	<20%	20-40%	>40 %	Prom.	Desv. Est.	Rango
Control no tratado	3	0	0	0,0	0,0	0
100 g ea/ha haloxifop	3	0	0	0,0	0,0	0
200 g ea/ha haloxifop	3	0	0	0,0	0,0	0
400 g ea/ha haloxifop	0	3	0	20,0	0,0	20
800 g ea/ha haloxifop	0	0	3	73,3	10,4	70-85
1600 g ea/ha haloxifop	0	0	3	93,3	11,5	80-100

6.6 – *AAD-1 (v3)* como marcador seleccionable.

La capacidad de utilizar *AAD-1 (v3)* como marcador seleccionable utilizando 2,4-D como agente de selección se analizó inicialmente con la *Arabidopsis* transformada según se describió anteriormente. Las semillas T_1 transformadas con *PAT* y *AAD1 (v3)* (pDAB 721) se sembraron en vegas y se

germinaron según se describió anteriormente y se comparó con semillas similares tratadas con el esquema de selección de glufosinato normal (5 y 10 DAP). El 2,4-D (50g ea/ha) se aplicó al sembradío de *Arabidopsis* como se hizo previamente con el glufosinato. Se ensayó la variación en cantidad de aplicaciones y el tiempo de aplicación. Cada bandeja de plantas recibió ya sea uno o dos tiempos de aplicación de 2,4-D en uno de los siguientes esquemas de tratamiento: 5+10 DAP, 5+14 DAP, 10 DAP, 10+14 DAP, 14 DAP. Las plantas se identificaron como Resistentes o Sensibles 19 DAP y se corrieron cintas del ensayo ELISA para determinar la frecuencia de la co-transformación exitosa de un gen *PAT* activo.

Cincuenta y tres de 70.000 semillas plantadas se identificaron como resistentes al 2,4-D. Se utilizó ELISA para clasificar un subconjunto de 44 individuos de esta población para expresión de la proteína de PAT. Noventa y seis por ciento de los individuos fueron positivos indicando la presencia del gen co-transformado, *PAT*. La baja cantidad de resultados ELISA negativos (4%) está en línea con una relación de error del 3% en poblaciones de plantas resistentes al glufosinato (**Tabla 15**). La eficiencia en la selección parece ser de algún modo inferior con el 2,4-D (0,08%) vs. el glufosinato (0.12%); sin embargo, el rango de proporciones de selección a través de todos los experimentos indicaría que ambos agentes de selección son igualmente buenos para seleccionar la *Arabidopsis* transformada con genes de *AAD-1 (v3)* o *PAT*, respectivamente. Dos aplicaciones sucesivas identifican con mayor precisión individuos resistentes con ambos herbicidas ensayados.

6.7 – Heredabilidad.

Una variedad de eventos T_1 se autopolinizaron para producir semillas T_2. Se ensayó la progenie de estas semillas aplicando 2,4-D (200 g ea/ha) a 100 consanguíneos T_2 aleatorios. Cada planta T_2 individual se transplantó a potes

cuadrados de 7,5 cm de lado antes de la aplicación con atomizador (atomizador de vía a una proporción de aplicación de 187 L/ha). Más del 60% de las familias T_1 (plantas T_2) se segregó en el modelo anticipado Resistente 3: Sensible 1 para un locus heredado dominante con herencia mendeliana según se determinó con el análisis de cuadrados Chi ($P > 0,05$).

Se recolectaron las semillas de 12 a 20 individuos T_2 (semillas T_3). Se ensayaron las progenies de veinticinco consanguíneos T_3 de cada una de las ocho familias T_2 seleccionadas aleatoriamente según se describió previamente. Aproximadamente un tercio de las familias T_2 que se anticipó serían homócigas (poblaciones no segregantes) han sido identificadas en cada línea ensayada: variando en frecuencia de una a cuatro de las ocho familias ensayadas. Estos datos muestran que el *AAD1 (v3)* se integra de manera estable y se hereda de manera Mendeliana a al menos tres generaciones.

6.8 – Resistencia a herbicida adicional atribuible al AAD-1 en *Arabidopsis*.

La capacidad del *AAD-1 (v3)* para dar resistencia a otros herbicidas de ariloxifenoxialcanoato en *Arabidopsis* transgénico se determinó utilizando un ensayo de placa *in vitro* modificado. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* de tipo salvaje como así también de *Arabidopsis thaliana* que contiene el gen AAD-1 (v3) de planta optimizada (plantas hornócigas T_4 id = PAAD1.315.064) se esterilizaron por agitación durante 10 minutos en una solución blanqueadora al 50%. Estas semillas luego se enjuagaron cuatro veces con agua estéril para eliminar la solución blanqueadora.

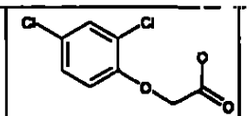
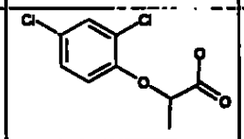
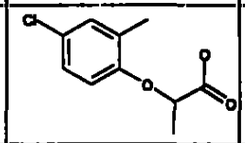
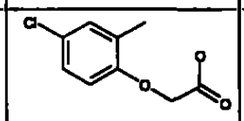
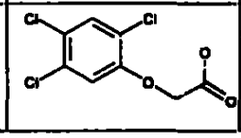
Los ensayos de respuesta a la dosis utilizaron un medio nutriente (ver a continuación) suplementado con varias proporciones de compuestos de ensayo. Los compuestos de ensayo se agregaron al medio calentado (55°C) como soluciones concentradas en DMSO. Los pocillos de control tenían la cantidad apropiada de DMSO sin ningún compuesto adicional. La concentración final de

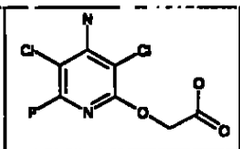
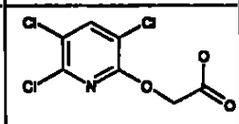
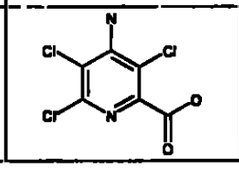
DMSO nunca excedió el 1% (v/v). Después de mezclar intensamente, se agregó una alícuota del medio caliente conteniendo la concentración apropiada de compuesto a cada pocillo de una bandeja de cultivo tisular de poliestireno, de base plana, de 6 pocillos (Falcon 353046, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, NJ). Después que se solidificó el medio, aproximadamente 20 a 30 semillas de *Arabidopsis* se aplicaron sobre la parte superior del medio solidificado y los restantes 2 ml del medio se vertieron sobre las semillas. Las placas se agitaron levemente para dispersar las semillas, se cubrieron y se dejaron enfriar hasta que el medio se solidificó por completo. Las placas se incubaron durante 7 días a 25°C bajo iluminación fluorescente continua (75 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$). La composición del medio nutriente fue según se describe en el Ejemplo 2.2 y en Somerville y Orgen (1982).

Evaluación de la reducción del desarrollo. La porción apical de las plantas de *Arabidopsis* desarrolladas en el medio tratado, se evaluó visualmente con relación a la porción apical de las plantas desarrollada en el medio que contiene sólo DMSO. Los valores se registraron como % de reducción del desarrollo. Las evaluaciones de inhibición de desarrollo de raíz de las plantas de *Arabidopsis* desarrolladas en el medio tratado se lograron extrayendo cuidadosamente las plantas del medio y midiendo la longitud de la raíz. Estas longitudes de raíz luego se compararon con la longitud de raíz de las plantas control para determinar un % de reducción del desarrollo. Se evaluó un mínimo de cinco plantas para cada tratamiento. Los valores registrados son un promedio de todas las plantas evaluadas. La concentración calculada para alcanzar el 50% de efecto de inhibición (I_{50}) se determinó tanto para la raíz como para los brotes de *Arabidopsis* de tipo salvaje y transformada con el AAD-1. Las relaciones de biotipos resistentes a sensibles se incluyen en la **Tabla 19**. Una relación >2 para ambas mediciones de raíz y brote en general significa una resistencia significativa.

Cuanto más alta la relación, mayor el nivel de resistencia. Todas las fenoxi auxinas comerciales mostraron niveles significativos de resistencia incluyendo los ácidos oxiacéticos (2,4-D y MCPA) como así también los ácidos oxipropiónicos (diclorprop y mecoprop). En realidad, la evaluación de raíz crónica muestra que la resistencia al ácido oxipropiónico es más elevada con el AAD-1 (v3) que para los ácidos oxiacéticos, consistentes con las características enzimáticas del AAD-1 (v1). La evaluación de otras auxinas que contienen anillos de piridina mostró que el AAD-1 (v3) no protegía eficazmente a *Arabidopsis* de los herbicidas piridiloxiacetatos, triclopir y fluroxipir, o el herbicida del ácido picolínico, picloram. La amplia resistencia a la fenoxi auxina es la primera informada *in planta*. Las auxinas alternativas a las cuales el AAD-1 no protege serían herramientas viables para el control y contención de los cultivos comerciales transformados con AAD-1 o especies de plantas experimentales.

Tabla 19. Evaluación del ensayo de placa *in vitro* de la resistencia cruzada del sustrato herbicida otorgada por AAD-1 (v3) en *Arabidopsis* T_4 (ARBTH) homóziga.

Compuesto	Estructura	Brote I50 de ARBTH en peso	brote I50 de T3 ARBTH PAAD1.315.064	Raíz I50 de ARBTH en peso	Raíz I50 de T3 ARBTH PAAD1.315.064	Relación de brote	Relación de raiz
		ppm					
Fenoxi auxinas							
2,4-D		0,2	10	< 0,01	0,04	50	> 4
diclorprop		2	5	0,01	1.5	2,5	150
Mecoprop		2	25	0,01	1,5	12,5	150
MCPA		0,2	1	0,01	0,03	5	3
2,4,5-T		1,5	10	<0,01	<0,01	6,67	NA

Piridin auxinas							
Fluroxipir		2	1	0,2	0,2	0,5	1
Triclopir		0,2	0,04	0,02	0,02	0,2	1
Picloram		1	0,5	0,3	0,15	0,5	0,5

6.9 – Resistencia al herbicida en aplicaciones foliares en *Arabidopsis* con AAD-1.

La capacidad de *AAD-1 (v3)* para dar resistencia a otros herbicidas de ariloxifenoxialcanoato auxina en *Arabidopsis* transgénica se determinó por aplicación foliar de varios sustratos descriptos en el Ejemplo 6.8. La generación T_4 de semillas de *Arabidopsis*, homóciga para *AAD-1 (v3)* (línea AAD1.01.315.076) se estratificó, y se sembró en bandejas de selección muy similares a las de *Arabidopsis* (Ejemplo 6.4). Una línea de control transformada que contenía PAT y el gen de resistencia a insectos Cry1F se plantó de manera similar. Los consanguíneos se transfirieron a potes de tres pulgadas individuales en el invernadero. Todas las plantas se rociaron con el uso de un atomizador de vía colocado 187 L/ha. Las plantas se rociaron con una variedad de herbicidas tipo fenoxi auxina: 12,5-1600 g ea/ha de sal de dimetilamina de 2,4-D (DMA) (Riverside Chemicals), 12,5-1600 g ea/ha de mecoprop (AH Marks), 50-3200 g ea/ha de R-diclorprop (AH Marks), 8,75-1120 g ea/ha de 2,4,5-T (grado técnico); herbicidas de piridiloxiacetatos 50-3200 g ea/ha de triclopir (Dow AgroSciences) y 50-3200 g ea/ha de fluroxipir (Dow AgroSciences); y el metabolito de 2,4-D resultante de la actividad de AAD-1, 2,4-diclorofenol (DCP, Sigma) (a 50-3200 g

ea/ha, grado técnico). Todas las aplicaciones se formularon en buffer de Hepes 200 mM (pH 7,5). Cada tratamiento se replicó 3 a 4 veces. Las plantas se evaluaron a los 3 y 14 días después del tratamiento y se promedian sobre dos experimentos.

Estos resultados (ver **Tabla 20**) confirman que *AAD-1 (v3)* en *Arabidopsis* aporta una fuerte resistencia a las auxinas fenoxiacéticas, auxinas fenoxipropiónicas, pero no ha mostrado resistencia cruzada significativa a las auxinas piridiloxiacéticas ensayadas y corrobora los datos de la enzima *in vitro* y la especificidad de sustrato de placa completa. Además, no hay efecto del metabolito, 2,4-diclorofenol (DCP), sobre *Arabidopsis* de tipo salvaje o transgénica.

Tabla 20. Comparación de respuesta de la planta *Arabidopsis* T_4 con AAD-1 (v3) homóziga y de tipo salvaje a varios herbicidas auxínicos de aplicación foliar.

Auxinas fenoxipropiónicas		
	% Prom. de lesión 14DAT	
Tratamiento con herbicida	**AAD1.01.315.076.T_4 plantas AAD1 homózigas**	**PatCry1f - Control**
50 g ea/ha R-Diclorprop	3	31
200 g ea/ha R-Diclorprop	3	73
800 g ea/ha R-Diclorprop	3	89
3200 g ea/ha R-Diclorprop	3	95

12,5 g ea/ha Mecoprop	3	0
25 g ea/ha Mecoprop	0	2
50 g ea/ha Mecoprop	0	17
100 g ea/ha Mecoprop	0	33
200 g ea/ha Mecoprop	3	62
400 g ea/ha Mecoprop	0	78
800 g ea/ha Mecoprop	0	93
1600 g ea/ha Mecoprop	0	100
Auxinas fenoxiacéticas		
Tratamiento con herbicida	**% Prom. de lesión 14DAT**	
	AAD1.01.315.076.T_4 plantas AAD1 homózigas	**Pat/Cry1f - Control**
12,5 g ea/ha 2,4-D DMA	0	67
25 g ea/ha 2,4-D DMA	0	78
50 g ea/ha 2,4-D DMA	0	93
100 g ea/ha 2,4-D DMA	0	100
200 g ea/ha 2,4-D DMA	0	100
400 g ea/ha 2,4-D DMA	0	100
800 g ea/ha 2,4-D DMA	0	100
1600 g ea/ha 2,4-D DMA	0	100
8,75 g ea/ha 2,4,5-T	0	0
17.5 g ea/ha 2,4,5-T	3	20
35 g ea/ha 2,4,5-T	0	43
70 g ea/ha 2,4,5-T	3	85

140 g ea/ha 2,4,5-T	0	95
280 g ea/ha 2,4,5-T	0	98
560 g ea/ha 2,4,5-T	17	100
1120 g ea/ha 2,4,5-T	3	100
Auxinas piridilacéticas		
Tratamiento con herbicida	**% Prom. de lesión 14DAT**	
	AAD1.01.315.076.T$_4$ plantas AAD1 homózigas	**Control de Pat/Cry1f**
50 g ea/ha Triclopir	31	36
200 g ea/ha Triclopir	58	65
800 g ea/ha Triclopir	74	84
3200 g ea/ha Triclopir	97	95
50 g ea/ha Fluroxipir	48	76
200 g ea/ha Fluroxipir	75	85
800 g ea/ha Fluroxipir	88	85
3200 g ea/ha Fluroxipir	95	95
	Metabolito DCP inactivo	
50 g ea/ha 2,4-DCP	0	0
200 g ea/ha 2,4-DCP	0	0
800 g ea/ha 2,4-DCP	0	0
3200 g ea/ha 2,4-DCP	0	0

6.10 – Relación entre desarrollo de la planta y expresión del AAD-1 (v3) en *Arabidopsis*.

Se diseñó un experimento para examinar si el nivel de expresión de la AAD-1 (v3) en *Arabidopsis* varía en diferentes etapas del crecimiento. Una línea *AAD-1 (v3)* T_4 homóziga de elevada tolerancia, (id=PAAD1.01.345.163) se desarrolló en el invernadero. La mitad de las plantas se trataron con 800 g ae /ha de 2,4-D (según se describió previamente) mientras que la otra mitad no se trató. Dos hojas, la tercera hoja de la parte superior y la quinta hoja del fondo, se cosecharon a partir de 5 plantas, ambas tratadas y no tratadas, y se analizaron por experimentos de ELISA y Transferencia Western (según se describe en el Ejemplo 11) a 4, 10, 14, 20 y 25 DAT. Las **Figuras 8A y 8B** mostraron que no hubo diferencia estadísticamente en la expresión del AAD-1 (v3) entre hojas jóvenes y viejas. Además, el herbicida 2,4-D tuvo poco impacto sobre el nivel de expresión de la proteína AAD-1 (v3). Los niveles de proteína se acumularon en plantas más viejas con alguna degradación de proteína significativa en los últimos puntos de tiempo.

En un experimento separado, cuatro líneas T_4 de *Arabidopsis* que muestran diferente nivel de tolerancia al herbicida 2,4-D se rociaron con varios niveles (0, 200, 800 and 3200 g/ha) de 2,4-D y se examinaron la lesión del herbicida y la expresión del AAD-1 (v3). Cuatro días después del tratamiento con herbicida, se observó poco daño en tres de las cuatro líneas, aún en la dosis más alta ensayada (**Figura 9A**). Estas plantas además expresaron un alto nivel del AAD-1 (v3), de 0,1 a 0,25% (**Figura 9B**). Por el contrario, la línea de baja tolerancia expresó menos del 0,1% de AAD-1 (v3) en TSP y sufrió una lesión observable. De mayor importancia, se recuperaron de la lesión en 14 DAT (**Figura 9A**), indicando que el bajo nivel de expresión del AAD-1 (v3) pudo proteger las plantas del daño herbicida serio. Todas las plantas control sufrieron una lesión seria y murieron 14 DAT a dosis de 800 g ea/ha de 2,4-D y anteriores.

6.11 – Análisis molecular de *Arabidopsis con AAD-1 (v3)*.

Se realizó un ensayo Invader (métodos de Procedimientos Third WProm Agbio Kit) para número de copia del gen PAT y/o análisis de Southern blot con el ADN total obtenido del kit Qiagen DNeasy sobre múltiples líneas homózigas del *AAD-1 (v3)* para determinar la integración estable de la unidad de transformación de planta que contiene *PAT* y *AAD-1 (v3)*. El análisis supuso un enlace físico directo de estos genes en la medida que estaban contenidos en el mismo plásmido.

Para el análisis Southern, un total de 1 µg de ADN se sometió a digestión durante la noche de Nsi I para el pDAB721 para obtener los datos de integración. Las muestras se corrieron sobre gel de agarosa al 0,85% durante toda la noche a 40 voltios. El gel luego se desnaturalizó en NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. El gel luego se neutralizó en Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M pH 7,5 durante 30 minutos. Luego se armó un aparato de gel 20SSC para obtener un gel de gravedad a transferencia de membrana de nylon (Millipore INYC00010) durante la noche. Después de la transferencia nocturna la membrana se sometió a luz UV mediante un entrecruzador (stratagene UV stratalinker 1800) a 1200 X100 microjoules. La membrana luego se lavó en SDS 0,1%, 0,1 SSC durante 45 minutos. Después del lavado de 45 minutos, la membrana se horneó durante 30 horas a 80°C, luego se almacenó a 4°C hasta la hibridación. El fragmento del molde de hibridación consistió en cebadores preparados (Pat 5-3 AGATACCCTTGGTTGGTTGC) (SEC ID NO:23) y (Pat 3-3 CAGATGGATCGTTTGGA AGG) (SEC ID NO:24) diseñados para obtener la región codificadora de *PAT*. El producto se corrió sobre gel de agarosa al 1% y se cortó y luego se extrajo el gel utilizando el procedimiento de extracción de gel Qiagen (28706). La membrana luego se sometió a un paso de pre-hibridación a 60°C durante 1 hora en buffer de Perfect Hyb (Sigma H7033). Se utilizó el procedimiento del cebador it RmT dCTP-marcación rxn (Stratagene 300392) para

desarrollar la sonda de base de p32 (Perkin Elmer). La sonda se limpió utilizando las columnas de Probe Quant. G50 (Amersham 27-5335-01). Dos millones de conteos CPM por ml de buffer Perfect Hyb se utilizaron para hibridar las transferencias southern durante la noche. Después de la hibridación nocturna las transferencias se sometieron a dos lavados de 20 minutos a 65°C en SDS 0,1%, 0,1 SSC. Las transferencias luego se expusieron a una película durante la noche, incubando a -80°C.

Los resultados demostraron que todas las plantas resistentes al 2,4-D ensayadas contenian *PAT* (y de este modo, por inferencia, *AAD-1 (v3)*). El análisis del número de copias mostró que los insertos totales variaron de 1 a >10 copias. Esto se correlaciona también con los datos de expresión de proteína de AAD-1 (V3) indicando que la presencia de la enzima da niveles significativamente elevados de resistencia (>>200 veces) a todos los ácidos fenoxiacéticos y fenoxipropiónicos disponibles en el comercio.

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

Se obtuvieron semillas de *Arabidopsis* T_1, según se describió previamente, conteniendo el plásmido pDAB3230 (*AAD-1 (v3)* + *EPSPS*) que codifica para una característica de resistencia al glifosato putativa. Los transformantes de T_1 se seleccionaron utilizando *AAD-1 (v3)* como marcador seleccionable según lo descripto en el ejemplo 6.6, salvo que la proporción de 2,4-D utilizada fue 75 g ea/ha. Veinticuatro eventos de T_1 individualmente transformados se recuperaron del intento de primera selección y se transfirieron a potes de tres pulgadas en el invernadero según se describió previamente. Además se ensayaron tres líneas de *Arabidopsis* control diferentes: Columbia-0 de tipo salvaje, líneas homózigas de *AAD-1 (v3)* + *PAT* T_5 (pDAB721-transformado), y la línea homóziga *PAT* + *Cry1F* (control transformado). Sólo las plantas de pDAB3230 se preseleccionaron en el

estadío de plántula para tolerancia al 2,4-D. Cuatro días posteriores al transplante, las plantas se dividieron uniformemente para tratamiento foliar por atomizador de vía según se describió previamente con 0, 26,25, 105, 420, o 1680 g ea/ha de glifosato (Glyphomax Plus, Dow AgroSciences) en buffer de Hepes (200 mM pH 7,5). Todos los tratamientos se replicaron 4 o 5 veces. Las plantas se evaluaron 7 y 14 días después del tratamiento. Se calcularon los valores de I_{50} y muestran un nivel >14 veces de tolerancia impartida por el *EPSPS* apilado molecularmente con *AAD-1 (v3)* (*ver* **Figura 10**). El AAD-1 (v3) no aportó resistencia al glifosato en sí mismo (re: respuesta de pDAB721). Estas plantas de T_1 se desarrollarán hasta dar semillas, autopolinizadas para dar semillas T_2. Las plantas de pDAB 3230 T_1 han demostrado tolerancia a dosis letales de 2,4-D y glifosato. Además se ensayaron plantas T_2 para demostrar que estas plantas no transformadas soportan tratamientos de glifosato + 2,4-D aplicados en mezcla de tanque según se describe en el Ejemplo 21 y que se muestran para maíz transformado con *AAD-1 (v3)* en el Ejemplo 8.

Ejemplo 7 – Transformación mediada por filamentos en maíz, y uso del *AAD-1 (v3)* como marcador seleccionable

7.1 – Clonación del *AAD-1 (v3)*.

El fragmento de *AAD-1 (v3)* se recibió sobre un fragmento de NcoI/SacI. La construcción de pDAB4005 se digirió con NcoI y SacI y se aisló el fragmento del esqueleto de 5175 pb. Los dos fragmentos se ligaron utilizando T4 ADN ligasa y se transformaron en células DH5α. Se realizaron Minipreps sobre las colonias resultantes utilizando el kit QIA Spin mini prep de Qiagen y las colonias se digirieron para controlar la orientación. El plásmido intermedio correcto se denominó pDAB3403. Ambos, pDAB3403 y pDAB8505 (OsAct1/PAT/ZmLip) se digirieron con NotI. Las bandas de los 3442 pb del pDAB3403 y la banda de los 11017 pb del pDAB8505 se aislaron y se purificaron. Los fragmentos se ligaron,

se transformaron en DH5α, y los plásmidos resultantes se rastrearon para orientación. La construcción final se denominó pDAB3404, la cual contiene ZmUbi1/po-aad1/ZmPer5::OsAct1/PAT/ZmLip.

7.2 – Iniciación de callos/suspensión

Para obtener embriones inmaduros para iniciación del cultivo de callos, se realizaron cruzamientos de F_1 entre los progenitores Hi-II desarrollados en invernaderos A y B (Armstrong *et al.* 1991). Cuando los embriones fueron de 1,0-1,2 mm de tamaño (aproximadamente 9 a 10 días posteriores a la polinización), las espigas se cosecharon y se esterilizaron en superficie mediante frotación con jabón Liqui-Nox®, se sumergieron en etanol 70% durante 2 a 3 minutos, luego se sumergieron en solución de blanqueo comercial 20% (hipoclorito de sodio 0,1%) durante 30 minutos.

Las espigas se enjuagaron en agua destilada, estéril, y los embriones zigóticos inmaduros se dividieron asépticamente y se cultivaron sobre el medio 15Ag10 (Medio de N6 (Chu *et al.*, 1975), 1,0 mg/l de 2,4-D, 20 g/l de sacarosa, 100 mg/l de hidrolizado de caseína (digesto enzimático), L –prolina 25 mM, 10 mg/l de $AgNO_3$, 2,5 g/l de Gelrite, pH 5,8) durante 2 a 3 semanas con el escutelo saliendo del medio. El tejido que mostró la morfología apropiada (Welter *et al.*, 1995) se transfirió selectivamente en intervalos de dos semanas sobre medio fresco de 15Ag10 durante aproximadamente 6 semanas, luego se transfirió a medio 4 (Medio N6, 1,0 mg/l de 2,4-D, 20 g/l de sacarosa, 100 mg/l de hidrolizado de caseína (digesto enzimático), L-prolina 6 mM, 2,5 g/l de Gelrite, pH 5,8) en intervalos de dos semanas durante aproximadamente 2 meses.

Para iniciar cultivos de suspensión embriogénicos, aproximadamente 3 ml de volumen de célula empacada (PVC) de tejido calloso que se origina de un único embrión se agregaron a aproximadamente 30 ml de H9CP+ medio líquido (mezcla de sales basales MS (Murashige and Skoog, 1962), vitaminas MS

modificadas que contiene 10 veces menos ácido nicotínico y 5 veces más tiamina-HCl, 2,0 mg/l de 2,4-D, 2,0 mg/l de ácido α-naftalenacético (NAA), 30 g/l de sacarosa, 200 mg/l de hidrolizado de caseína (digesto ácido), 100 mg/l de *mio*-inositol, L-prolina 6 mM, 5% v/v de agua de coco (agregada antes del subcultivo), pH 6,0). Los cultivos de suspensión se mantuvieron en condiciones oscuras en matraces Erlenmeyer de 125 ml en un agitador controlado por temperatura a 125 *rpm* a 28°C. Las líneas celulares típicamente se establecieron dentro de 2 a 3 meses después de la iniciación. Durante el establecimiento, las suspensiones se subcultivaron cada 3,5 días agregando 3 ml de PCV de células y 7 ml de medio acondicionado a 20 ml de h9CP fresco + medio líquido utilizando una pipeta de boca ancha. Una vez que el tejido empezó a duplicarse en desarrollo, las suspensiones se escalonaron y se mantuvieron en matraces de 500 ml por lo que 12 ml de PCV de células y 28 ml de medio condicionado se transfirieron a 80 ml de H9CP + medio. Una vez que las suspensiones se establecieron completamente, se criopreservaron para uso futuro.

7.3 – Criopreservación y descongelamiento de suspensiones.

Dos días después del sub-cultivo, 4 ml de PCV de células en suspensión y 4 ml de medio acondicionado se agregaron a 8 ml de medio crioprotector (disuelto en H9CP+ medio sin agua de coco, glicerol 1 M, DMSO 1 M, de sacarosa 2 M, esterilizado por filtración) y se dejó agitar a 125 *rpm* a 4°C durante 1 hora en un matraz de 125 ml. Después de 1 hora, se agregaron 4,5 ml a un vial Corning cryo de 5,0 ml enfriado. Una vez que se llenaron, los viales individuales, se mantuvieron durante 15 minutos a 4°C en un congelador de proporciones controladas, luego se dejó congelar a una razón de –0,5°C/minuto hasta alcanzar una temperatura final de –40°C. Después de alcanzar la temperatura final, los recipientes se transfirieron a cajas dentro de estantes dentro de una unidad de

almacenamiento Cryoplus 4 (Forma Scientific) llena con vapores de nitrógeno líquido.

Para descongelamiento, los viales se retiraron de la unidad de almacenamiento y se colocaron en un contenedor de hielo seco cerrado, luego se sumergieron en un baño de agua mantenido a 40-45°C hasta que cesó la "ebullición". Una vez descongelado, el contenido se vertió en una pila de papeles de filtro Whatman de ~8 estéril de 70 mm (No. 4) en cápsulas de Petri de 100x25 mm. Se dejó que el líquido se absorba en los filtros durante varios minutos, luego el filtro superior conteniendo las células se transfirió sobre el medio GN6 (medio N6, 2,0 mg/l de 2,4-D, 30 g/l de sacarosa, 2,5 g/l de Gelrite, pH 5,8) durante 1 semana. Después de 1 semana, sólo el tejido con morfología promisoria se transfirió al papel de filtro directamente sobre medio GN6 fresco. Este tejido se subcultivó cada 7 a 14 días hasta que 1 a 3 gramos estuvieron disponibles para iniciar la suspensión en aproximadamente 30 ml de H9CP fresco + medio en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Tres mililitros de PCV se subcultivaron en H9CP fresco + medio cada 3,5 días hasta que se obtuvo un total de 12 ml de PCV, en cuyo momento el subcultivo tuvo lugar de la forma que se describió previamente.

7.4 – Respuesta a la dosis de tejido no transformado al ácido haloxifop.

Las líneas celulares Hi-II donantes no transformadas se combinaron, se trataron con filamentos sin ADN, se filtraron sobre el medio GN6 en la proporción de 6 ml por filtro, y se permitió que formaran callos durante 2 a 3 semanas a 28°C. Aproximadamente 200 mg del tejido de suspensión con callos por tratamiento se transfirieron al medio de selección en placas de 60x20 mm que contenían ácido R-haloxifop 30, 100 o 300 nM. Se utilizaron tres replicados por concentración. Un medio de control que contiene 1 mg/l de bialafos (de Herbiace commercial formulation, Meiji Seika, Japón), GN6 (1H), también se incluyó para comparación. El callo se retiró después de 2 semanas, se pesó, y se transfirió a un medio fresco

de la misma concentración durante otras dos semanas. Después de un total de 4 semanas de tiempo transcurrido, se retiró el tejido, se pesó una última vez, y luego se descartó. Los resultados se muestran en la **Figura 11.**

Además se completaron dos estudios de respuesta a la dosis separados de tejido de callo a los productos de degradación fenólicosl de haloxifop y cihalofop, respectivamente, para confirmar que este producto final no sería dañino al desarrollo del callo. Los datos de respuesta a la dosis de cihalofop fenol (ver **Figura 12)** muestran que a 1 µM de cihalofop fenol, el crecimiento todavía es 76% tan elevado como el control sin cihalofop fenol. Los datos de respuesta a la dosis al haloxifop fenol mostraron que aun a 300 nM de haloxifop fenol, el crecimiento fue igual o superior al control que carece de haloxifop fenol (no se muestran datos).

7.5 – Transformación mediada con Filamentos utilizando selección de bialafos

Aproximadamente 24 horas antes de la transformación, se subcultivaron 12 ml de PCV de células en suspensión de maíz embriogénico criopreservado previamente más 28 ml de medio acondicionado, en 180 ml de medio líquido de GN6 (medio de GN6 que carece de Gelrite) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, y se colocó en un agitador a 125 rpm a 28°C. Esto se repitió 2 veces utilizando la misma línea celular de modo que un total de 36 ml de PCV se distribuyeron en 3 matraces. Después de 24 horas se eliminó el medio líquido de GN6 y se reemplazó con 72 ml de medio osmótico de GN6 S/M (medio de N6, 2,0 mg/l de 2,4-D, 30 g/l de sacarosa, 45,5 g/l de sorbitol, 45,5 g/l de manitol, 100 mg/l de *mio*-inositol, pH 6,0) por matraz para plasmolizar las células. Los matraces se colocaron sobre un agitador en la oscuridad durante 30 a 35 minutos, y durante este tiempo una suspensión de 50 mg/ml de filamentos de carburo de silicio se preparó agregando el volumen apropiado de medio líquido de GN6 S/M a ~405

mg de filamentos de carburo de silicio, pre-autoclavados (Advanced Composite Materials, Inc.).

Después de la incubación en GN6 S/M, los contenidos de cada matraz se combinaron en una botella para centrífuga de 250 ml. Una vez que las células se depositaron en el fondo, todo salvo ~14 ml de líquido de GN6 S/M se extrajo y se recolectó en un matraz de 1 litro para uso futuro. La suspensión pre-humedecida de los filamentos se agitó con vortex durante 60 segundos a velocidad máxima y se agregaron 8,1 ml a la botella, a la cual se agregaron 170 µg de ADN como último paso. La botella se colocó inmediatamente en un mezclador de pintura comercial Red Devil 5400 modificado y se agitó durante 10 segundos. Después de la agitación, el cóctel de células, el medio, los filamentos y el ADN se agregó al contenido del matraz de 1 litro junto con 125 ml de medio líquido de GN6 fresco para reducir la osmolaridad. Las células se dejaron recuperar sobre un agitador durante 2 horas antes de filtrarse sobre papel de filtro #4 Whatman (5,5 cm) utilizando una unidad recolectora de células de vidrio que se conectó a línea de vacío.

Ya sea 3 o 6 ml de suspensión dispersa se pipetearon sobre la superficie del filtro a medida que se sacó el vacío. Los filtros se colocaron sobre placas de 60 x 20 mm de medio GN6. Las placas se cultivaron durante 1 semana a 28°C en una caja oscura que se selló de manera flexible con una sola capa de plástico (<2 mils de espesor) para minimizar la evaporación de las placas individuales.

Después de una semana, los papeles de filtro se transfirieron a placas de 60x20 mm de medio GN6 (1H) (Medio de N6, 2,0 mg/l de 2,4-D, 30 g/l de sacarosa, 100 mg/l de *mio*-inositol, 1,0 mg/l de bialafos, 2,5 g/l de Gelrite, pH 5,8) o medio GN6D (1H) (igual que GN6 (1H) salvo con 8,0 mg/l de dicamba y 0,8 mg/l de 2,4-D).

Las placas se colocaron en cajas y se cultivaron como se mencionó anteriormente durante otra semana. Dos semanas de la pos-transformación, el tejido se insertó emparejando ya sea la mitad de las células sobre la placa o todas las células sobre la placa en 2,0 ml de medio de agarosa de GN6 fundido (medio N6, 2,0 mg/l de 2,4-D, 30 g/l de sacarosa, 100 mg/l de *mio*-inositol, 7 g/l de agarosa Sea Plaque, pH 5,8, autoclavado durante sólo 10 minutos a 121°C) conteniendo 1 mg/l de bialafos. El tejido se disgregó y los 3 ml de agarosa y tejido se vertieron uniformemente sobre la superficie de una placa de 100 x 15 mm de GN6 (1H) o medio GN6D (1H). Esto se repitió para todas las placas restantes. Una vez insertas, las placas se sellaron individualmente con Nescofilm® o Parafilm M®, y luego se cultivaron durante 1 semana a 28°C en cajas oscuras.

Los aislados putativamente transformados fueron típicamente visibles a las 5 a 8 semanas de pos-transformación. Todos los aislados potenciales se retiraron de la placa inserta y se transfirieron al medio de selección fresco de la misma concentración en placas de 60 x 20 mm. Si fue evidente un crecimiento sostenido después de aproximadamente 2 semanas, un evento se consideró resistente y se sometió a análisis molecular.

La regeneración se inició transfiriendo el tejido de callo a un medio de inducción basado en citoquinina, 28 (1H), conteniendo 1 mg/l de bialafos, sales de MS y vitaminas, 30,0 g/l de sacarosa, 5 mg/l de BAP, 0,25 mg/l de 2,4-D, 2,5 g/l de Gelrite; pH 5,7. Las células se dejaron desarrollar en luz baja (13 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) durante una semana, luego luz más alta (40 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) durante otra semana antes de ser transferidas al medio de regeneración, 36 (1H), el cual fue idéntico a 28 (1H) salvo que carecía de reguladores del crecimiento vegetal. Se retiraron pequeñas plántulas (3-5 cm) y se colocaron en tubos de cultivo de 150 x 25 mm conteniendo medio de SHGA libre de selección (sales basales de Schenk y

Hildebrandt y vitaminas, 1972; 1 g/l de *mio*-inositol, 10 g/l de sacarosa, 2,0 g/l de Gelrite, pH 5,8). Una vez que las plántulas desarrollaron una raíz suficiente y un sistema de brote, se transplantaron a tierra en el invernadero.

7.6 – Transformación mediada por Filamentos utilizando selección de haloxifop.

Los parámetros de administración de ADN para selección directa de "fops" fueron idénticos al procedimiento de selección de bialafos salvo que 85 µg de pDAB3403 y 85 µg de construcción conteniendo un indicador GFP (Proteína Fluorescente Verde) se co-transformaron juntos, y sólo 3 ml de suspensión se filtraron sobre el medio de GN6 luego de la recuperación de 2 horas.

Después de 0 a 7 días sobre el medio libre de selección de GN6, los papeles de filtro se transfirieron a placas de 60x20 mm de medio de GN6 conteniendo 2 mg/l de 2,4-D más ácido R-haloxifop 50, 100 o 200 nM. Las placas se colocaron en cajas y se cultivaron durante otra semana. Después de una semana, el tejido se insertó emparejando todas las células de la placa en 3,0 ml de medio de agarosa de GN6 fundido conteniendo la misma concentración de agente de selección que en la transferencia previa. Todos los pasos posteriores fueron idénticos al protocolo de selección/regeneración de PAT salvo que se incluyó ácido R-haloxifop 100 nM en el medio de regeneración en lugar de 1 mg/l de bialafos.

7.7 – Resultados. Se iniciaron múltiples experimentos que ensayan varios niveles de haloxifop y cihalofop, y se recuperaron 47 aislados de la selección directa. Un subconjunto de los eventos de callo se sometió a selección utilizando análisis de PCR y Western. Luego de estos datos de expresión, se sometieron 21 eventos líderes a análisis Southern. Los resultados utilizando NcoI, un único cortador, para obtener datos de integración luego del sondaje con *AAD-1 (v3)*,

mostraron inequívocamente una integración estable del *AAD-1 (v3)* luego de la transformación mediada por filamentos acoplada con selección "fop".

7.8 – Demostración cuantitativa de tolerancia *in vitro* a partir de selección de bialafos de los eventos de callo que expresan el AAD-1 (v3)

Noventa y siete aislados de callo recuperados de la selección de bialafos se sometieron a análisis de número de copias de PAT mediante el Invader y análisis de PTU del *AAD-1 (v3)* mediante PCR (ver Ejemplo 7.10). La expresión de proteínas del AAD-1 (v3) utilizando Western blot/Sandwich ELISA (Ejemplo 11) se completó sobre un subconjunto de los eventos. Se describe un resumen en la **Tabla 21** a continuación. Al menos 15 plantas T_0 se regeneraron a partir de cada uno de estos eventos y se enviaron para ensayo de aspersión y producción de semillas.

Tabla 21.

Evento	Copia PAT #	PCR para *AAD-1 (v3)* PTU	Western de Callo
3404-001	2	+	+
3404-006	2	+	+
3404-013	3	+	+
3404-017	1	+	+
3404-020	3	+	nd
3404-022	2	+	+
3404-025	2	+	+
3404-027	3	+	+
3404-031	1	+	+
3404-033	2	+	nd
3404-036	3	+	+
3404-044	3	+	+
3404-050	3	+	+
3404-053	3	+	+

Tabla 21.			
Evento	Copia PAT #	PCR para *AAD-1 (v3)* PTU	Western de Callo
3404-074	2	+	+
3404-082	2	+	+

Se evaluó un subconjunto más pequeño de estos eventos en estudios de respuesta a la dosis en comparación con un control no transformado. Se ensayó un rango de concentraciones de haloxifop (de formulación Gallant Super), hasta 400 nM. Los datos de respuesta a la dosis para un evento, 3404-006, se generaron utilizando los métodos generales del Ejemplo 7.4, y se muestran en la **Figura 13**. Esto muestra que el evento 3404-006 no mostró una reducción significativa en el crecimiento del callo a concentraciones de haloxifop hasta 400 nM por lo que el desarrollo tisular del callo de maíz no transgénico se inhibió a esta proporción. Estos datos no han sido normalizados para dar cuenta de las diferencias de crecimiento inherentes que no están relacionadas con la expresión del transgen.

7.9 – Transformación mediada por Filamentos utilizando selección de imazetapir

El casete de ZmUbi1/*AAD-1 (v3)*/ZmPer5 se eliminó del pDAB3404 con AscI/SwaI y se insertó en el pDAB2212 para crear el vector de transformación con filamentos pDAB3415 del *AAD-1 (v3)* y el *AHAS*, el cual se denomina también pDAS1283. Una vez completada, esta construcción se transformó en maíz mediante transformación mediada por filamentos de carburo de silicio según se describe en el Ejemplo 7.4 salvo que se filtraron 2 ml de células, seguido de una recuperación de 7 días sobre medio GN6 seguido de la selección sobre el medio

que contiene imazetapir 3 µM proveniente del herbicida Pursuit® DG. Luego del análisis Invader, se identificaron 36 eventos que contenían los genes AAD-1 (v3) y AHAS.

Cincuenta y tres eventos de callo de maíz de estas transformaciones se ensayaron en experimentos de ELISA y Transferencia Western para su expresión de AAD-1 (v3) – un subconjunto de los datos se muestra a continuación. Para los eventos enumerados en la **Tabla 22**, los niveles de expresión de los detectados positivos oscilaron entre 90 y más de 1000 ppm de proteínas solubles totales.

Tabla 22.

Número ID del evento de AAD-1	Nivel de Expresión (ppm)	Transferencia Western
1283[1]-001	2	-
1283[1]-002	206	+++
1283[1]-003	1	-
1283[1]-004	90	+++
1283[1]-005	1	-
1283[1]-006	105	+++
1283[1]-007	212	++
1283[1]-008	114	±
1283[1]-009	305	+
1283[1]-010	2	-
1283[1]-011	4	-
1283[1]-012	200	+++
1283[1]-013	134	+++
1283[1]-014	4	-
1283[1]-015	194	+++
1283[1]-016	4	-

Tabla 22.		
Número ID del evento de AAD-1	**Nivel de Expresión (ppm)**	**Transferencia Western**
1283[1]-017	196	+++
1283[1]-018	3	-
1283[1]-019	178	+
1283[1]-020	260	++
1283[1]-021	144	+++
1283[1]-022	140	+++
1283[1]-023	191	+++
1283[1]-024	392	++
1283[1]-025	368	++
1283[1]-026	14	-
1283[1]-027	1006	++
Control Neg	3	-
Control Neg	3	-
Estándar (0,5 µg/ml)		++
Estándar (5 µg/ml)		++++

7.10– Análisis molecular: Materiales y métodos para maíz.

7.10.1 – Aislamiento y cuantificación de ADN de recolección de tejido. Se colocó tejido fresco dentro de tubos y se liofilizó a 4°C durante 2 días. Después que el tejido estuvo totalmente seco, una perla de tungsteno (valenita) se colocó en el tubo y las muestras se sometieron a 1 minuto de molienda seca utilizando un molino de vidrio Kelco. Se siguió el procedimiento de aislamiento de ADN Dneasy estándar (Qiagen, DNeasy 69109). Una alícuota del ADN extraído se tiñó

luego con Pico Green (Sondas Moleculares P7589) y se leyó en el fluorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/µl.

7.10.2 – Análisis del ensayo Invader. Las muestras de ADN se diluyeron a 20 ng/µl luego se desnaturalizaron en un termociclador a 95°C durante 10 minutos. Luego se preparó la mezcla de Signal Probe utilizando la mezcla oligo provista y $MgCl_2$ (Third WProm Technologies). Una alícuota de 7,5 µl se colocó en cada pocillo de la placa de ensayo Invader seguido de una alícuota de 7,5 µl de controles, estándares, y 20 ng/µl de muestras desconocidas diluidas. Cada pocillo se superpuso con 15 µl de aceite mineral (Sigma). Luego las placas se incubaron a 63°C durante 1 hora y se leyeron sobre el fluorómetro (Biotek). El cálculo de % de señal respecto del fondo para la sonda blanco dividido por el % de señal sobre la sonda control interna de fondo calculará la relación. La relación de los estándares de copia conocidos desarrollada y validada con el análisis de transferencia Southern, se utilizó para identificar la copia estimada de los eventos desconocidos.

7.10.3 – Reacción en cadena de la polimerasa. Un total de 100 ng de ADN total se utilizó como molde. Se utilizaron 20 mM de cada cebador con el kit Takara Ex Taq PCR Polymerase (Mirus TAKRR001A). Los cebadores para el *AAD-1 (v3)* PTU fueron (Delantero – ATAATGCCAGC CTGTTAAACGCC) (SEC ID NO:25) y (Inverso – CTCAAGCATATGAATGACCT CGA) (SEC ID NO:26). La reacción de PCR se llevó a cabo en termociclador Geneamp 9700 (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 63°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 45 segundos, y 72°C durante 10 minutos. Los cebadores para la PCR de Región Codificadora del *AAD-1 (v3)* fueron (Delantero – ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEC ID NO:27) e (Inverso – CGGGC AGGCCTAACTCCACCAA) (SEC ID NO:28). La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador Geneamp 9700 (Applied

Biosystems), sometiendo las muestras a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 45 segundos seguido de 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis sobre gel de agarosa 1% teñido con EtBr.

7.10.4 – Análisis de transferencia Southern. El análisis de transferencia Southern se realizó con ADN total obtenido del kit Qiagen DNeasy. Un total de 2 µg de ADN se sometieron a digestión de Afl II durante toda la noche y además EcoRV para pDAB3404, NcoI para pDAB3403, y SpeI para pDAB1421 para obtener los datos de integración. Después de la digestión de toda la noche se corrió una alícuota de ~100 ng sobre gel al 1% para asegurar la completa digestión. Después de asegurarse esto, las muestras se corrieron sobre un gel de agarosa 0,85% durante toda la noche a 40 voltios. El gel luego se desnaturalizó en NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. Luego el gel se neutralizó en Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,5, durante 30 minutos. Un aparato de gel conteniendo 20x SSC luego se colocó para obtener un gel de gravedad para la transferencia a membrana de nylon (Millipore INYC00010) durante la noche. Después de la transferencia nocturna, la membrana se sometió a luz UV mediante un entrecruzador (Stratagene UV stratalinker 1800) a 1200 X100 microjoules. Luego la membrana se lavó en SDS 0,1%, 0,1 SSC durante 45 minutos. Después del lavado de 45 minutos, la membrana se horneó durante 3 horas a 80°C y luego se almacenó a 4°C hasta la hibridación. El fragmento de molde de hibridación se preparó utilizando la PCR de región codificadora anterior utilizando el plásmido pDAB3404. El producto se corrió sobre gel de agarosa 1% y se recortó y luego se extrajo el gel utilizando el procedimiento de extracción de gel Qiagen (28706). La membrana luego se sometió a un paso de pre-hibridación a 60°C durante 1 hora en buffer Perfect Hyb (Sigma H7033). El procedimiento del cebador it RmT dCTP-marcación rxn (Stratagene 300392) se utilizó para

desarrollar la sonda de base p32 (Perkin Elmer). La sonda se limpió utilizando las columnas G50 de Probe Quant. (Amersham 27-5335-01). Dos millones de conteos CPM por ml de buffer Perfect Hyb se utilizaron para hibridar las transferencias southern durante la noche. Después de la hibridación nocturna las transferencias se sometieron a dos lavados de 20 minutos a 65°C en SDS 0,1%, 0,1 SSC. Las transferencias luego se expusieron a una película durante la noche, incubando a -80° C.

Ejemplo 8 – Datos de tolerancia *in vivo* y tolerancia de campo generados a partir de eventos de (pDAB3404) *AAD-1 (v3)* seleccionados *de PAT*

8.1 – Tolerancia de las plantas de maíz T_0 a los herbicidas tipo AOPP.

Si más de 15 plantas clonadas por evento se regeneraban con éxito, luego las plantas extras se transferían al invernadero para muestreo de tolerancia preliminar con herbicidas tipo AOPP aplicados pos-emergencia sobre plantas de maíz T_0. Las plantas aclimatadas en invernadero se dejaron desarrollar hasta que 2 a 4 hojas de vista normal nuevas, emergieron del verticilo (es decir, las plantas habían transitado de las condiciones de cultivo de tejido a la condiciones de desarrollo del invernadero). Las plantas se desarrollaron a 27°C en condiciones de 16 horas de luz: 8 horas de oscuridad en el invernadero. Las plantas luego se trataron con formulaciones comerciales de uno a tres herbicidas tipo AOPP: Assure® II (DuPont), Clincher* (Dow AgroSciences), o Gallant Super* (Dow AgroSciences) para quizalofop, cihalofop, o haloxifop, respectivamente. Las aplicaciones de herbicida se realizaron con un atomizador de vía a un volumen de atomización de 187 l/ha, con una altura de rocío de 50 cm, y todos los rocíos contenían 1% v/v de adyuvante concentrado de aceite para cultivo Agridex. El número de clones de cada evento varió de semana en semana debido a la proporción de regeneración y aclimatación de cada evento. Globalmente, se hizo el intento de tratar clones representativos de cada evento con un rango de dosis

de herbicida que varía de 1X de la dosis letal (~1/8 X dosis de campo) hasta 8X las dosis de campo (64 X la dosis letal). Una dosis letal se define como la proporción que causa >95% de lesión al endógamo Hi-II. Hi-II es el antecedente genético de los transformantes de la presente invención.

En general, los AOPP son herbicidas muy potentes que matan al maíz. El maíz Hi-II de tres a cuatro hojas proveniente de semillas se muere efectivamente (>95% de lesión) con 8,8, 62,5, y 4,4 g ea/ha de haloxifop, cihalofop, y quizalofop, respectivamente. Cada línea transformada con *AAD-1 (v3)* ensayada sobrevivió a una dosis letal mínima de cada herbicida tipo AOPP ensayado. En realidad, la mayoría de las líneas ensayadas sobrevivieron sin lesión visible (14 DAT) aún cuando se trataron con una dosis 8X la de campo (64X la dosis letal) de quizalofop. Varios clones individuales de los eventos "017" y "038," sin embargo, sí sufrieron una lesión significativa a proporciones elevadas. Esto podría ser una función de la expresión génica inferior debido a cómo y dónde el gen se insertó.

El nivel elevado de tolerancia a AOPP se demostró en la mayoría de los eventos, aún cuando las aplicaciones se realizaron a plantas que salieron del cultivo tisular (etapa T_0). Significativamente, esta tolerancia se mostró para los tres herbicidas tipo AOPP y probablemente se extenderá a todos los herbicidas tipo AOPP según se mostró previamente para AAD-1 *in vitro*.

La Figura 14 muestra las respuestas de varios clones del evento no transformado y transformado con *AAD-1 (v3)* a dosis letales de dos herbicidas tipo AOPP (haloxifop y quizalofop) aplicados 1 semana antes.

La Tabla 23 muestra los datos para las respuestas de eventos de maíz T_0 transformados con *AAD-1 (v3)* a tres herbicidas tipo AOPP aplicados pos-emergencia.

Tabla 23. Respuesta de eventos de maiz T_0 transformados con *AAD-1 (v3)* seleccionados a tres herbicidas tipo AOPP aplicados en post-emergencia.

Construcción	Evento	Clon	Haloxifop* g ea/ha	Cihalofop** g ea/ha	Quizalofop*** g ea/ha	% de lesión 14 DAT
3404	001	016	8,8			0
3404	001	018		62,5		0
3404	001	017			8,8	0
3404	001	019			8,8	30
3404	001	020			35	0
3404	017	018			35	0
3404	017	019			35	0
3404	017	020			70	0
3404	017	021			70	0
3404	017	022			140	0
3404	017	023			140	30
3404	017	024			280	30
3404	017	025			280	20
3404	022	019	8,8			0
3404	022	020	17,5			0
3404	022	016	17,5			0
3404	022	024		62,5		0
3404	022	018		125		0
3404	022	021			8,8	0
3404	022	017			17,5	0
3404	022	022			35	0
3404	022	023			70	0
3404	033	012			35	0
3404	033	013			70	0
3404	033	014			70	0
3404	033	015			140	0
3404	033	016			280	0
3404	038	016	8,8			0
3404	038	018		62,5		0
3404	038	017			8,8	0
3404	038	019			35	70
3404	038	020			35	80
3404	038	021			70	80

Tabla 23. Respuesta de eventos de maíz T_0 transformados con *AAD-1 (v3)* seleccionados a tres herbicidas tipo AOPP aplicados en post-emergencia.

Construcción	Evento	Clon	Haloxifop* g ea/ha	Cihalofop** g ea/ha	Quizalofop*** g ea/ha	% de lesión 14 DAT
3404	038	022			70	80
			(dosis letal = 8,8 g ea/ha)	(dosis letal = 62,5 g ea/ha)	(dosis letal = 4,4 g ea/ha)	

*Gallant super® + 1% COC (v/v)
**Clincher ® + 1% COC (v/v)
***Assure II + 1% COC (v/v)
®Marca registrada de Dow AgroSciences, LLC

8.2 – Tolerancia de campo de plantas de maíz pDAB3404 T_1 a los herbicidas quizalofop, 2,4-D y glufosinato.

Se establecieron dos pruebas de campo en estaciones en Hawai e Indiana. Se utilizaron semillas de maíz de plantas T_1 endogámicas para evaluar dieciséis líneas de eventos de AAD1 para tolerancia contra quizalofop y 2,4-D. Se incluyeron tres híbridos no transformados a los fines de comparación. El híbrido Hi-II x 5XH571 es de la misma familia que las líneas de eventos de *AAD-1 (v3)*. El híbrido Croplan 585SR es una línea resistente al sethoxidim.

El diseño experimental era una parcela de muestreo discontinua con cuatro replicaciones. La principal parcela de muestreo era el tratamiento con herbicida y la sub-parcela era el evento de *AAD-1 (v3)* o híbrido de comparación. Las parcelas eran una fila de 3,7 metros con aproximadamente veinticinco semillas plantadas en cada fila. Para eventos de AAD1, las semillas de un linaje diferente dentro del evento se plantaron en cada replicado.

El glufosinato a 560 g ia/ha se aplicó a las parcelas de *AAD-1 (v3)* en la etapa V2 para eliminar las plantas no transformadas. Los tratamientos

experimentales incluyeron formulaciones comerciales de quizalofop aplicadas a 70 y 140 g ea/ha, de 2,4-D (sal de dimetilamina) a 560 y 1120 g ea/ha, y un control no tratado. Los tratamientos se aplicaron utilizando un equipo de lanza de transmisión de mochila que suministraba 187 l/ha de volumen de vehículo a una presión de 130-200 kpa. Los tratamientos de quizalofop se aplicaron en la etapa de maíz V3-V4 y los tratamientos de 2,4-D se aplicaron en la etapa V5-V6.

Las parcelas tratadas con quizalofop se evaluaron visualmente para comprobar la lesión del cultivo a una y tres semanas después de la aplicación (WAA) utilizando una escala de 0-100%, donde 0 es igual a ninguna lesión y 100 es igual a muerte completa. Las parcelas tratadas con 2,4-D se evaluaron visualmente para el desplome de la planta a 2 días después de la aplicación (DAA) utilizando una escala de 0-100% donde 0 es igual a ningún desplome de ninguna planta y 100 es igual a todas las plantas postradas. Además, las parcelas de 2,4-D se evaluaron visualmente a 3-4 WAA para determinar la deformación de la raíz de apoyo utilizando una escala de 0-10.

8.2.1 – Resultados.

La respuesta del evento de *AAD-1 (v3)* a las proporciones más elevadas ensayadas de quizalofop y 2,4-D se muestran en la **Tabla 24**. Estas proporciones representan aproximadamente dos veces las proporciones de uso comercial normal. Los híbridos no transformados se lesionaron seriamente (80-100%) por quizalofop a 70 g ea/ha incluyendo la línea resistente al sethoxidim, si bien mostraron una tolerancia levemente mejor que los otros dos híbridos. Todos los eventos de *AAD-1 (v3)* salvo un linaje del evento 3404.001 mostraron excelente tolerancia al quizalofop a 70 g ea/ha. No se observaron síntomas visibles sobre los eventos de *AAD-1 (v3)* salvo con los eventos indicados anteriormente.

Tabla 24.

Tratamiento (proporción) =	Quizalofop (140 g ea/ha)		2,4-D amina (1120 g ea/ha)		2,4-D amina (1120 g ea/ha)		Resultados del análisis			Relaciones de Resistencia Segregación luego del rociado c/Liberty		
Evaluación =	% Lesión 3 WAA (escala 0-100)		% Desplome 2 DAA (escala 0-100)		Deformación de raíz de apoyo 3-4 WAA (escala 0-10)		número de copia de hoja de AAD-1 (Análisis Southern)	Hoja de AAD-1 Western Blot T_0	Hoja de AAD-1 ELISA T_0	Promedio de Población T_1		Promedio de Población T_2
Evento o Híbrido	IN	HI	IN	HI	IN	HI				IN	HI	HI
3404.001	25	25	0	5	1	2	3	+++	+++	40%	47%	X
3404.006	0	0	0	0	0	0	1	++	+++	33%	26%	X
3404.013	0	0	0	0	0	0	1	+	+++	63%	58%	X
3404.017	0	0	1	0	0	0	2	+/-	++	48%	47%	X
3404.020	0	0	0	0	0	0	2	++	+++	50%	51%	X
3404.022	0	0	1	0	0	0	1	+	++	51%	57%	76%*
3404.025	0	0	0	0	0	0	2	+++	++++	55%	59%	X
3404.027	0	0	3	0	0	0	5	+	++	51%	50%	X
3404.031	0	0	1	0	0	0	1	++	++++	47%	43%	61%*
3404.033	0	0	0	0	0	0	2 o 3	+	++	52%	49%	X
3404.036	0	0	0	0	0	0	4	++	+++	52%	48%	X
3404.044	0	0	1	0	0	1	1	+	+/-	50%	48%	X
3404.050	0	0	0	1	0	1	2	nd	nd	38%	28%	X
3404.053	0	0	1	0	0	0	2	+++	+++	48%	56%	X
3404.074	0	0	0	0	0	0	1	++	+++	53%	52%	73%*
3404.082	0	0	0	0	0	1	3	nd	nd	38%	36%	X
DK493	100	100	20	23	8	9						
HI-II X 5XH571	100	100	13	34	7	9						
CROPLAN 585SR	80	96	11	33	9	9						

* Corresponde a segregación de característica dominante de locus simple según lo determinado por el análisis chí cuadrático (P>0,05)

El 2,4-D en la proporción de 1120 g ea/ha originó niveles significativos (11-33%) de desplome epinástico en los híbridos no transformados, una respuesta normal cuando se aplicó más allá de la etapa de crecimiento V4. Se observó muy poco o ningún desplome con todos los eventos de *AAD-1 (v3)* salvo un linaje de 3404.001 (ubicación Indiana solamente) donde se produjeron niveles moderados de desplome (5-13%).

Las raíces de apoyo de híbridos no transformados se deformaron severamente (variando de 9 en una escala de 0-10) con 2,4-D en la proporción

de 1120 g ea/ha. Nuevamente, esta es una respuesta normal al 2,4-D aplicado sobre la etapa de crecimiento V4. Como con la respuesta al desplome, se observó poca o ninguna lesión de raíz de apoyo con todos los eventos de *AAD-1 (v3)* salvo un linaje de 3404.001.

Se produjeron tendencias similares con proporciones ensayadas más bajas de quizalofop y 2,4-D si bien a niveles de respuesta reducidos pero aún significativos en los híbridos no transformados (no se muestran datos).

Estos resultados indican que la mayoría de las líneas de eventos transformadas con *AAD-1 (v3)* mostraron un nivel elevado de resistencia al quizalofop y al 2,4-D en proporciones que fueron letales o causaron malformaciones epinásticas severas a híbridos de maíz no transformados.

8.2.2- Relaciones de segregación Mendelianas esperadas sobre tres eventos de T_2. Las plantas de linajes individuales de cada evento se autopolinizaron al azar en el campo. Se cosecharon semillas de T_2 a mano a la madurez fisiológica. En base al número de copias génicas simples (ver **Tabla 24** anterior) y el rendimiento total en la generación de T_1 (segregación, tolerancia al herbicida, y vigor), se eligieron tres eventos (022, 031, y 074) para una posterior evaluación en el campo. Las filas de crianza de cada evento se plantaron utilizando un plantador cónico de precisión consistiendo cada una de ellas en 2500-3000 semillas. En la etapa de crecimiento V2, todas las líneas de *AAD-1 (v3)* se rociaron con 140 g ea/ha de quizalofop (Assure® II) utilizando un atomizador de mochila según se describió previamente. Esta proporción rápidamente mató todos los segregantes "nulos" (no transformados). Cada evento tenía una relación de segregación consistente con la herencia Mendeliana de un gen dominante, de locus único (3 resistentes: 1 sensible, o 75% de supervivencia) (ver **Tabla 24**). Los homocigotos y hemicigotos del evento 74 se identificaron por ensayo de zigosidad (referirsee a la descripción del ensayo Invader del *AAD-1*

(v3) para maíz). Las plantas hemicigotas se eliminaron y las plantas homózigas de *AAD-1 (v3)* se cruzaron con el endógamo de maíz BE1146 introgresado y homózigo para la característica de resistencia al glifosato, NK603, creando una semilla híbrida F_1 homogénea que es hemizigota para la resistencia al glifosato, *AAD-1 (v3)*, y resistente al glufosinato.

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

Las plantas de maíz homózigas T_2 de *AAD-1 (v3)/PAT* se cruzaron con plantas de maíz resistentes al glifosato produciendo semilla F_1 conteniendo *AAD-1 (v3)*, *PAT*, y genes de resistencia al glifosato según se describió en el ejemplo anterior.

Las semillas F_1 se plantaron en forma individual en potes de 3 pulgadas preparados con medio de crecimiento Metro-Mix® 360 (Sun Gro Horticulture). Los potes se subirrigaron inicialmente con solución de Hoagland hasta que se humedecieron, luego se dejaron drenar por gravedad, y se desarrollaron a 27°C en condiciones de 16 horas de luz: 8 horas de oscuridad en el invernadero. Para el resto del estudio las plantas se subirrigaron con agua desionizada.

Las plantas se dejaron desarrollar hasta que emergieron 2 a 4 hojas del verticilo. En este punto las aplicaciones de herbicida se realizaron con un atomizador de vía a un volumen de atomización de 187 l/ha, con una altura de rocío de 50 cm. Las plantas se rociaron con proporciones de 2,4-D DMA, glifosato, glufosinato, y varias combinaciones de los tres. Todas las aplicaciones se formularon en buffer de Hepes 200 mM (pH 7,5). En aplicaciones por atomización donde el glufosinato estaba presente el tratamiento se formuló con la adición de 2% p/v de sulfato de amonio.

A los 3 y 14 días después del tratamiento (DAT) se evaluaron las plantas. Se asignó a las plantas una relación de lesión con respecto a atrofia, clorosis, y

necrosis. Las plantas con una relación de lesión del 90% o por encima se consideraron muertas. Los resultados del estudio a 14 DAT pueden observarse en la **Tabla 25.**

Tabla 25.

	Proporción de campo	% de lesión a 14 DAT	
		Hi II X 5XH751	RR/PAT/AAD1
		Prom.	Prom.
Control no tratado	-	0	0
840 g ea/ha de glifosato	1X	98	0
1680 g ea/ha de glifosato	2X	100	0
3360 g ea/ha de glifosato	4X	100	0
560 g ea/ha de 2,4-D DMA	1X	10	0
1120 g ea/ha de 2,4-D DMA	2X	14	0
2240 g ea/ha de 2,4-D DMA	4X	29	0
470 g ea/ha de glufosinato	1X	80	0
940 g ea/ha de glufosinato	2X	90	3
1880 g ea/ha de glufosinato	4X	96	15
840 g ea/ha de glifosato + 560 g ea/ha de 2,4-D DMA	1X + 1X	96	1
1680 g ea/ha de glifosato +1120 g ea/ha 2,4-D DMA	2X + 2X	100	2
3360 g ea/ha de glifosato + 2240 g ea/ha 2,4-D DMA	4X + 4X	100	1
470 g ea/ha de glufosinato + 560 g ea/ha 2,4-D DMA	1X + 1X	89	5
940 g ea/ha de glufosinato + 1120 g ea/ha 2,4-D DMA	2X + 2X	91	10
1880 g ea/ha de glufosinato + 2240 g ea/ha 2,4-D DMA	4X + 4X	97	13
840 g ea/ha de glifosato + 470 g ea/ha de glufosinato	1X + 1X	90	5
1680 g ea/ha de glifosato + 940 g ea/ha de glufosinato	2X + 2X	98	15
3360 g ea/ha de glifosato + 1880 g ea/ha de glufosinato	4X + 4X	100	15

Este estudio demostró que el gen de *AAD-1 (v3)* en maíz puede apilarse con un gen de resistencia al glifosato y un gen de resistencia al glufosinato para

dar tolerancia a nivel de campo fuerte al 2,4-D, glifosato, y/o glufosinato solos o en combinaciones de mezcla de tanque.

8.3.1 – Resistencia del maíz con *AAD-1 (v3)* utilizando una mezcla de tanque de 2,4-D DMA y quizalofop. Las semillas de T_2BC_1 del evento hemizigoto número 3404-025.001R/R001 Bulked.001.S058 se plantaron individualmente en potes de 3 pulgadas preparados con un medio de crecimiento Metro-Mix® 360. Los potes se sub-irrigaron inicialmente con solución de Hoagland hasta que se tornaron húmedos, luego se dejaron drenar por gravedad, y se desarrollaron a 27°C en condiciones de 15 horas de luz y 8 horas de oscuridad en el invernadero. Para el resto del estudio las plantas se sub-irrigaron con agua desionizada.

Las plantas se dejaron desarrollar hasta la etapa V1 en el invernadero. En este punto las plantas se seleccionaron con 560 g ea/ha de Assure® II con la adición de 1% de concentrado de aceite de cultivo Agridex en buffer de Hepes 200 mM con el atomizador de vía fijado a 187 l/ha. Las plantas se dejaron 4 días para que muestren los síntomas de la selección. Ninguna planta sufrió lesiones. Las aplicaciones de herbicida se realizaron con un atomizador de vía a un volumen de atomizado de 187 l/ha, a una altura de rocío de 18 pulgadas. Todas las aplicaciones se formularon en buffer de Hepes 200 mM (pH 7,5) con la adición de 1% v/v de Agridex.

A los 3 y 14 días después del tratamiento (DAT) se evaluaron las plantas. A las plantas se les asignó una proporción de lesión con respecto a atrofia, clorosis, y necrosis. Las plantas que recibieron una proporción de lesión de 90% o más se consideran muertas. Las plantas de este linaje particular tenían 0% de lesión a 14 DAT para todas las combinaciones de mezcla de tanque, mientras que la del tipo salvaje tenían 100% de lesión. Estos resultados indican que el AAD-1 (v3) no sólo aporta fuerte resistencia a nivel de campo al 2,4-D y quizalofop en forma individual, sino además a proporciones exageradas de combinaciones múltiples

de los dos productos químicos. Se podría esperar lógicamente implementar las mediciones de control de malezas nuevas con combinaciones de fenoxi auxinas y graminicidas de AOPP (u otros cultivos transformados con AAD-1) no posibilitados previamente por un único gen HTC.

8.3.2 - Tolerancia de las plantas de maíz T_0 (pDAB3403) al herbicida quizalofop. Un blanco de aproximadamente ocho clones de planta T_0 de cada uno de los 17 eventos se regeneraron y se transfirieron al invernadero para rastreo de tolerancia preliminar con proporción discriminatoria aplicada pos-emergencia del herbicida quizalofop aplicado mediante atomizador de vía a 35 g ea/ha (1X la proporción de campo, 4X la dosis letal) a plantas de maíz T_0 adaptadas al invernadero, de 3 hojas, utilizando las condiciones del atomizador de vía previamente descriptas. Las plantas se clasificaron como resistentes o sensibles 7 días después del tratamiento. Se incluyó maíz no transgénico, control con cada aplicación de atomizado. Dos eventos, Evento 014 y 047, tenían dos o más clones T_0 sensibles a 35 g ea/ha de quizalofop, indicando un nivel inesperado de sensibilidad para este evento. Los otros 15 eventos mostraron integración estable, expresión de proteína, y capacidad de tolerar una dosis 4X la letal de quizalofop a nivel de planta completa.

8.3.3 Expresión de AAD-1 (v3) con respecto a la tolerancia de quizalofop.

Tres linajes T2 diferentes de 3404 transformaciones que se pre-rastrearon con Liberty® (según se describió previamente) para eliminar los nulos, se eligieron para comparar su tolerancia al quizalofop con respecto a su expresión de AAD-1 (v3). La expresión se midió a 14 DAT (los datos no se muestran) y a 30 DAT (ver **Figura 15**). La línea de tolerancia más alta, evento 3404-074, siempre se expresó con una cantidad más alta de AAD-1 (v3) que los otros dos eventos a 1X y proporciones de campo más altas. Estos datos concluyen que el maíz que expresa el AAD-1 (v3) se puede proteger de la lesión de quizalofop al nivel más

elevado ensayado (2.240 g/ha), el cual es 16 veces la dosis de campo de 35 g/ha. Además, el nivel de expresión fue consistente con el período del experimento.

Ejemplo 9 – Transformación del maíz con *AAD-1 (v3)* mediada por *Agrobacterium*

9.1 – Material de Planta.

Semillas de un cruce de F_1 "High II" (*es decir*, Padre A and B) (Armstrong *et al.*, 1991) se plantaron directamente en potes de 5 galones conteniendo 95:5 de Metro-Mix® 360: suelo mineral. Las plantas se desarrollaron en el invernadero con un fotoperíodo de 16 horas suplementado con una combinación de lámparas de sodio y haluro metálico de alta presión.

9.2 – Fuente de Tejido.

Para obtener embriones Hi-II (F2) inmaduros, se realizaron polinizaciones de plántulas. El día de la polinización, se embolsaron inflorescencias masculinas activamente separadas y se recolectó polen fresco y se aplicó cuidadosamente sobre las sedas. Los embriones inmaduros se aislaron según se describió en el Ejemplo 7.2.

9.3 – Preparación de un vector superbinario.

La producción de una construcción del *Agrobacterium*, pDAB2272, conteniendo el gen de *AAD-1 (v3)* en combinación con el gen marcador AHAS seleccionable se logró aislando el fragmento NotI de 3443 pares de bases del pDAB3404 conteniendo el ZmUbi1 v2/ *AAD-1 (v3)*/ZmPer5 v2 e insertándolo en el sitio NotI de pDAB8549. El plásmido resultante contiene los casetes de ZmUbi1 v2/ *AAD-1 (v3)*/ ZmPer5 v2 y el OsAct1 v2/AHAS v3/ZmLip v1 flanqueados por regiones MAR no-idénticas en la orientación directa. Esto se transformó subsiguientemente en LBA4404/pSB1 para crear el vector superbinario, el cual se denominó pDAB3602 pero además se denominó pDAS1421.

9.4 – Suministro bacteriano.

Todas las transformaciones utilizan el vector "Super binario" de Japan Tobacco descripto en la Patente Estadounidense No. 5.591.616 ("Method for Transforming Monocotyledons"). Para preparar la suspensión de *Agrobacterium* para tratamiento, 1-2 anillos de la bacteria recombinante pDAS1421 de una placa marcada de YP se colocaron en 5 ml de medio LS-inf. Mod (Medio Basal LS (Linsmaier and Skoog, 1965), vitaminas N6, 1,5 mg/l de 2,4-D, 68,5 g/l de sacarosa, 36,0 g/l de glucosa, L-prolina 6 mM, pH 5,2). La mezcla se agitó con vortex hasta que se logró una suspensión uniforme. La concentración bacteriana se tomó utilizando un colorímetro fotoeléctrico Klett-Summerson leyendo la densidad de la solución. La solución se ajustó a una concentración de Klett 200 (~ $1x10^9$ cfu/ml) y se agregó a la solución actetosiringona 100 µM.

9.5 – Infección y co-cultivo.

Los embriones inmaduros se aíslan directamente en un tubo de microcentrífuga conteniendo 2 ml de medio LS-inf. Mod liquid. Cada tubo, conteniendo ~100 embriones, se agita con vortex durante 3 a 5 segundos. El medio se elimina y se reemplaza con medio líquido fresco y se repite la agitación con vortex. El medio líquido se elimina nuevamente y esta vez se reemplaza con solución de *Agrobacterium* a la concentración de Klett 200. La mezcla de *Agrobacterium* y embriones se agita durante 30 segundos. Al cabo de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, los embriones se transfirieron al medio LS-As Mod (Medio Basal LS, vitaminas N6, 1,5 mg/l de 2,4-D, 30,0 g/l de sacarosa, L-prolina 6 mM, 0,85 mg/l de $AgNO_3$, acetosiringona100 µM, 3,0 g/l de Gelrite, pH 5,8) para un co-cultivo de 5 días a 25°C.

9.6 – Respuesta a la dosis utilizando embriones inmaduros.

Los estudios de respuesta a la dosis se iniciaron utilizando embriones inmaduros tratados con la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 que carece de un plásmido según se describió previamente. Una vez tratados, los embriones se

dejaron co-cultivar durante 5 días a 25°C y luego se transfirieron al medio de selección conteniendo varios niveles de R-haloxifop o R-cihalofop. Además los embriones se transfirieron al medio conteniendo 1 mg/l de bialafos e imazetapir 100 nM como controles negativos. Se valoraron los embriones para el % de formación de callo embriogénico después de 2 semanas, y luego nuevamente después de 4 semanas. Los embriones se ensayaron a niveles de R-haloxifop hasta 30 nM; sin embargo, se observó una reducción insuficiente de formación de callo a los niveles más elevados, de modo que se utilizaron concentraciones más elevadas (50 – 100 nM) para los experimentos de transformación. Los datos de los embriones desarrollados sobre medios que contienen cihalofop se muestran en la **Figura 17**.

9.7 – Selección

Después del co-cultivo, los embriones se movieron a través de un esquema de selección de 2 pasos después de lo cual se obtuvieron aislados transformados. Para selección, se utilizó medio LSD Mod (Medio Basal LS, vitaminas N6, 1,5 mg/l de 2,4-D, 0,5 g/l de MES, 30,0 g/l de sacarosa, L-prolina 6 mM, 1,0 mg/l de $AgNO_3$, 250 mg/l de cefotaxima, 2,5 g/l de Gelrite, pH 5,7) junto con uno de dos niveles de selección de haloxifop, cihalofop o imazetapir. A través de la fase de selección, los embriones se cultivaron en la oscuridad a 28°C. Primero los embriones se transfirieron a un nivel inicial de selección (R-haloxifop 50-100 nM o R-cihalofop 300 nM) durante 14 días, luego se movieron hasta un nivel de selección superior (ácido R-haloxifop 250-500 nM o cihalofop1,5 µM) en una proporción de 5 embriones/placa. Un subconjunto de embriones se apuraron de manera similar con imazetapir 100 a 500 nM de Pursuit® DG como control positivo. Se utilizó Pursuit® como agente de selección química cuando se utilizó el gen *AHAS*, en base a la Patente Estadounidense No. 5.731.180. El tejido se transfirió a intervalos de 2 semanas en el mismo medio hasta que se obtuvieron

colonias embriogénicas. Estas colonias se mantuvieron a una presión de selección elevada durante el período de cultivo restante. Las colonias transgénicas recuperadas se incrementaron transfiriéndolas a un medio fresco a intervalos de 2 semanas para regeneración y ulterior análisis.

9.8. – Regeneración y producción de semillas.

Para regeneración, los cultivos se transfirieron a un medio de "inducción" 28 y un medio de "regeneración" 36 según se describió previamente conteniendo ya sea R-haloxifop 100 nM o cihalofop 1,5 µM para diferenciación de plántulas. Cuando se establecieron las plántulas, se transfirieron a tubos de SHGA para permitir un futuro crecimiento y desarrollo de brotes y raíces según se describió previamente. Las polinizaciones controladas para producción de semillas se llevaron a cabo según se describió previamente.

9.9 - Recuperación del evento y especificaciones del análisis; rastreo de planta completa de linajes de maíz T_0 conteniendo el *AAD-1 (v3)* y el *AHAS* (pDAS1421).

Setenta y dos eventos transformados con *Agrobacterium* se seleccionaron de varios niveles de ácido R-haloxifop y ácido R-cihalofop *in vitro*. Veintidós muestras de callo se analizaron por análisis de transferencia Southern para integración estable del *AAD-1 (v3)* en el genoma según se describió previamente. Se eligieron para su regeneración diez eventos de copia simple, según se indica en la **Tabla 26**.

Tabla 26.

Evento de maíz	Selección del agente *in vitro*	Southern Copia # (callo)	Transferencia Western (AAD-1) Callo T_0	Evaluación de linajes T_0 resistentes a 35 g ea/ha de quizalofop	
	(nM)	AAD-1		Resistente	Sensible
1421[21]-016	50 Haloxifop	1	+	8	0
1421[22]-020	100 Haloxifop	1	++	8	0
1421[22]-022	100 Haloxifop	1	+	8	0
1421[22]-023	100 Haloxifop	1	++	8	0
1421[3]-036	100 Haloxifop	1	++	8	0
1421[4]-031	300 Cihalofop	1	++	9	0
1421[4]-032	300 Cihalofop	1	++	8	0
1421[4]-033	300 Cihalofop	1	++	12	0
1421[4]-034	300 Cihalofop	1	++	8	0
1421[4]-035	300 Cihalofop	1	++	6	0
Eventos con más de una copia no se llevaron al invernadero					

Un mínimo de seis linajes clonales regenerados por evento se pasaron a tierra en el invernadero y se rastrearon utilizando un atomizador de vía según se describió anteriormente para aplicar 35 g ea/ha de quizalofop cuando hubieran emergido de 2 a 4 hojas nuevas normales (ver sección 8.3.3). La presencia de la proteína de AAD-1 en una transferencia Western se correlacionó perfectamente con la resistencia al herbicida en la generación de T_0 sin considerar cuál herbicida tipo AOPP se utilizó para selección. No hay impacto negativo del segundo gen HTC (*AHAS*) sobre la función del *AAD-1 (v3)*.

Ejemplo 10 – Purificación de AAD-1 (v1) para creación y caracterización bioquímica del anticuerpo

Todas las operaciones durante la purificación se llevaron a cabo a 4°C. Las células de *E. coli* frescas o congeladas de aproximadamente 1 l de cultivo, desarrolladas e inducidas como en el Ejemplo 3, se suspendieron nuevamente en 200 ml de buffer de extracción conteniendo Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, y 2 ml de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma), y se desgarraron por tratamiento de ultrasonicación sobre hielo utilizando un sonicador Branson. El extracto soluble se

obtuvo por centrifugación en un rotor GSA (Sorvall) a 12.000 rpm (24.000g) durante 20 minutos. Luego el sobrenadante se cargó sobre una columna de intercambio iónico Mono Q (Pharmacia HR 10/10) equilibrada con Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, y la columna se lavó con el mismo buffer para 10 CV (80 ml). La proteína se eluyó con 80 ml de un gradiente lineal de 0 a 0,25 M de NaCl en buffer de columna, mientras se recolectaron fracciones de 2 ml. Las fracciones conteniendo AAD-1 (v1) se unificaron y se concentraron utilizando columnas de centrifugación de membrana MWCO 30 kDa (Millipore). La muestra luego se separó sobre una columna de exclusión Superdex de tamaño 200 (Pharmacia, XK 16/60) con buffer conteniendo Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M y DTT 1 mM, pH 8,0 a un caudal de flujo de 1 ml/min. Los procedimientos de purificación se analizaron por SDS-PAGE, y la concentración de proteína se determinó por el ensayo Bradford utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Ejemplo 11 – Purificación de AAD1 recombinante y producción de anticuerpo

El plásmido pDAB3203 conteniendo el gen *AAD-1 (v1)* se mantuvo congelado a -80°C en células TOP10F' (Invitrogen) como cepa recombinante DR1878. Para expresión, el ADN del plásmido del cultivo celular TOP10F' utilizando el Kit Wizard de Promega (Fisher cat. #PR-A1460) se transformó en células BL-21 Star (DE3) (Invitrogen cat. #C6010-03) siguiendo el protocolo del fabricante. Después de la transformación, 50 µl de las células se plaquearon sobre placas de LB S/S agar y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Todas las colonias de la placa de agar completas se unificaron en 100 ml de LB en un matraz de tres pantallas de 500 ml y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante 1 hora. La expresión génica luego se indujo con IPTG 1 mM, y se incubó durante 4 horas a 30°C con agitación a 200 rpm. Los 100 ml de cultivo se

centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min. Luego se descartó el sobrenadante, y los pellets se suspendieron nuevamente en 200 ml de extracción conteniendo Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM y 2 ml de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma), y se disgregaron por tratamiento de ultrasonicación sobre hielo utilizando un sonicador Branson. El lisado se centrifugó a 24.000x g durante 20 min para eliminar los detritos celulares. El sobrenadante conteniendo la proteína de AAD-1 luego se sometió a protocolo de purificación.

Todas las purificaciones de AAD-1 (v1) se llevaron a cabo a 4°C según se menciona en el Ejemplo 10, a menos que se indique lo contrario. El lisado celular se cargó sobre una columna de intercambio iónico Mono Q (Pharmacia Cat. #HR 10/10) equilibrada con Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM, seguida de 80 ml de lavado con el mismo buffer. Las proteínas se eluyeron con 80 ml de un gradiente lineal de 0 a 0,25 M de NaCl en buffer de columna, mientras se recolectaron fracciones de 2 ml. Las fracciones conteniendo AAD-1 (v1) se unieron y se concentraron utilizando columnas de centrifugación de membrana MWCO 30 kDa (Millipore). La muestra luego se separó sobre una columna de exclusión Superdex de tamaño 200 (Pharmacia, XK 16/60) con buffer conteniendo Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 0,15 M y DTT 1 mM. La concentración de proteína se determinó por el ensayo Bradford utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Cinco miligramos de AAD-1 (v1) purificada se entregaron a Zymed Laboratories, Inc. (South San Francisco, CA) para producción de anticuerpo policlonal de conejo. El conejo recibió 5 inyecciones en el período de 5 semanas, conteniendo cada inyección 0,5 mg de la proteína purificada suspendida en 1 ml de adyuvante de Freund incompleto. Se ensayaron los sueros tanto en experimentos de ELISA como de transferencia Western para confirmar la

especificidad y afinidad antes de la purificación de afinidad y conjugación de peroxidasa de rábano (HRP) (Zymed Lab Inc).

11.1 – Extracción de AAD-1 (v3) de hojas de plantas.

Aproximadamente 50 a 100 mg de tejido de hoja se cortaron en pequeñas piezas y se puso en tubos microfugos conteniendo dos perlas de acero inoxidable (4,5 mm; Daisy Co., cat. #145462-000) y 300 µl de buffer de extracción de planta (PBS conteniendo 0,1% de Triton X-100 y DTT 10 mM). Los tubos se agitaron durante 4 minutos con un batidor de perlas a velocidad máxima seguido de centrifugación durante 10 min a 5.000 x g. El sobrenadante conteniendo las proteinas solubles de planta se analizó para determinar las concentraciones de proteínas solubles totales (TSP) y AAD-1 (v3)

11.2 – Ensayo de Bradford.

La concentración de proteína soluble total de tejidos de hoja de planta se determinó por ensayo de Bradford utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Cinco microlitros de BSA diluido en serie en PBS o extracto de planta se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos por triplicado. Para los estándares, las concentraciones variaron de 2000 a 15,6 µg/ml. El concentrado de ensayo de proteína primero se diluyó cinco veces en PBS y se agregaron 250 µl a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Cada densidad óptica (DO) se midió a 595 nm utilizando un lector de microplacas. La concentración de proteína de cada muestra se extrapoló de una curva estándar utilizando el Softmax® Pro (ver. 4.0) (Molecular Devices).

11.3 – Ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA).

El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente a menos que se especificara lo contrario. Cien microlitros de anticuerpo anti-AAD-1 purificado (0,5 µg/ml) se recubrieron sobre un pocillo de placa de microtitulación de 96 pocillos y se incubó a 4°C durante 16 horas. La placa se lavó cuatro veces con buffer de

lavado (solución salina 100 mM regulada con buffer fosfato (PBS; pH 7,4) conteniendo 0,05% de Tween 20) utilizando un lavador de placa, seguido del bloqueo con 4% de leche descremada disuelta en PBS durante 1 hora. Después del lavado, 100 µl de AAD-1 estándar de concentraciones conocidas o extracto de planta (ver sección previa) se incubaron en los pocillos. Para una curva estándar, las concentraciones de AAD-1 purificadas variaron de 100 a 1,6 ng/ml por triplicado. Los extractos de planta se diluyeron 5, 10, 20, y 40 veces en PBS y se analizaron por duplicado. Después de 1 hora de incubación, la placa se lavó como se hizo anteriormente. Cien microlitros de conjugado de anticuerpo anti-AAD-1 y HRP (0,25 ug/ml) se incubaron en cada pocillo durante 1 hora antes del lavado. Cien microlitros de sustrato de HRP, 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (Pierce), se incubaron en cada pocillo durante 10 minutos antes de que la reacción se detenga agregando 100 µl de H_2SO_4 0,4N. La DO de cada pocillo se midió utilizando un lector de microplacas a 450 nm. Para determinar las concentraciones de AAD-1 en extracto de planta, el valor de DO de los duplicados se promedió y se extrapolaron de la curva estándar utilizando el Softmax® Pro ver. 4.0 (Molecular Devices).

Para comparación, cada muestra se normalizó con su concentración de TSP y se calculó el porcentaje de expresión a TSP.

11.4 – Análisis de transferencia Western.

Los extractos de planta o estándares de AAD-1 (5 y 0,5 µg/ml) se incubaron con buffer de muestra Laemmli a 95°C durante 10 minutos y se separaron electroforéticamente en gel de Tris-Glicina 8-16% Precast. Las proteínas luego se electro-transfirieron sobre membrana de nitrocelulosa utilizando un protocolo estándar. Después del bloqueo en 4% de leche descremada en PBS, se detectó la proteína de AAD-1 mediante antisuero anti-AAD1 seguido de conjugados de cabra anti-conejo/HRP. La proteína detectada se

visualizó por Reactivo de Análisis ECL Western de sustrato de quimioluminiscencia (Amersham cat. #RPN 21058).

Ejemplo 12 – Transformación del tabaco

La transformación del tabaco con *Agrobacterium tumefaciens* se llevó a cabo mediante un método similar, pero no idéntico, a los métodos publicados (Horsch *et al.*, 1988). Para aportar tejido de origen para la transformación, la semilla de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Kentucky 160) se esterilizó en la superficie y se plantó sobre la superficie del medio de TOB, el cual es un medio Murashige y Skoog libre de hormonas (Murashige y Skoog, 1962) solidificado con agar. Las plantas se desarrollaron durante 6 a 8 semanas en un cuarto incubador iluminado a 28-30°C y las hojas se recolectaron en forma estéril para su uso en el protocolo de transformación. Partes de aproximadamente un centímetro cuadrado se cortaron de estas hojas, excluyendo la nervadura. Los cultivos de las cepas del *Agrobacterium* (EHA101S conteniendo pDAB721, *AAD-1 (v3)* + *PAT*), se desarrollaron durante la noche en un matraz sobre un agitador colocado a 250 rpm a 28°C, se peletizaron en una centrífuga y se suspendieron nuevamente en sales de Murashige & Skoog estériles, y se ajustaron hasta una densidad óptica final de 0,5 a 600 nm. Las partes de hojas se sumergieron en esta suspensión bacteriana durante aproximadamente 30 segundos, luego se secaron sobre toallas de papel estéril y se colocaron con el lado derecho hacia arriba sobre el medio de TOB+ (medio Murashige & Skoog conteniendo 1 mg/l de ácido indolacético y 2,5 mg/l de benciladenina) y se incubaron en la oscuridad a 28°C. Dos días más tarde los trozos de hoja se movieron al medio de TOB+ conteniendo 250 mg/l de cefotaxima (Agri-Bio, North Miami, Florida) y 5 mg/l de glufosinato de amonio (ingrediente activo en Basta, Bayer Crop Sciences) y se incubaron a 28-30°C en la luz. Los trozos de hoja se movieron a un medio de TOB+ fresco con cefotaxima y Basta dos veces por semana durante las primeras dos semanas y

una vez por semana en adelante. Cuatro a seis semanas después, los trozos de hoja se trataron con la bacteria, las pequeñas plantas que surgieron de los focos transformados se retiraron de esta preparación de tejido y se plantaron en un medio de TOB conteniendo 250 mg/l de cefotaxima y 10 mg/l de Basta en vasos de Phytatray™ II (Sigma). Estas plántulas se desarrollaron en un cuarto incubador iluminado. Después de 3 semanas, se tomaron cortes de tallos y se re-plantaron en el mismo medio. Las plantas estuvieron listas para ser enviadas al invernadero después de 2 a 3 semanas adicionales.

Las plantas se trasladaron al invernadero lavando el agar de las raíces, transplantando en suelo en potes cuadrados de 13,75 cm, colocando el pote en una bolsa Ziploc® (SC Johnson & Son, Inc.), colocando agua potable en el fondo de la bolsa, y colocando a luz indirecta en un invernadero a 30°C durante una semana. Después de 3 a 7 días, la bolsa se abrió; las plantas se esterilizaron y se dejaron desarrollar en la bolsa abierta hasta que las plantas se aclimataron al invernadero, en cuyo momento la bolsa se retiró. Las plantas se desarrollaron en condiciones de invernadero cálidas ordinarias (30°C, 16 horas al día, 8 horas de noche, mínimo natural + luz suplementaria = 500 $\mu E/m^2s^1$).

Previo a la propagación, las plantas T_0 se muestrearon para análisis de ADN para determinar el número de copias del inserto. El gen *PAT* que se unió molecularmente al *AAD-1 (v3)* se ensayó para conveniencia. El tejido fresco se colocó en tubos y se liofilizó a 4°C durante 2 días. Después que el tejido estuvo totalmente seco, se colocó una perla de tungsteno (valenita) en el tubo y las muestras se sometieron a 1 minuto de molienda seca utilizando un molino de vidrio Kelco. Luego se siguió el procedimiento de aislamiento de ADN Dneasy estándar (Qiagen, DNeasy 69109). Una alicuota del ADN extraído luego se tiñó con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se leyó en el flouorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/µl.

Las muestras de ADN se diluyeron a 9 ng/µl, luego se desnaturalizaron por incubación en un termociclador a 95°C durante 10 minutos. Luego se preparó la mezcla de sonda de señal utilizando la mezcla de oligonucleótidos suministrada y MgCl2 (Third Wave Technologies). Una alícuota de 7,5 µl se colocó en cada pocillo de la placa de ensayo Invader seguido de una alícuota de 7,5 µl de controles, estándares, y 20 ng/µl de muestras desconocidas diluidas. Cada pocillo se cubrió con 15 µl de aceite mineral (Sigma). Las placas luego se incubaron a 63°C durante 1,5 hora y se leyeron sobre el fluorómetro (Biotek). El cálculo de % de señal sobre el fondo para la sonda blanco dividido por el % de señal sobre el fondo de la sonda control interna dará la relación. La relación de estándares de copias conocidas, desarrollada y validada con análisis de transferencia Southern se utilizó para identificar la copia estimada de los eventos desconocidos **(Tabla 27).**

Tabla 27. Eventos de tabaco T0 transformados con pDAB721 (*AAD-1(v3)* + *PAT*).

Evento	Número de copias de PAT (Southern)	PCR de región codificadora para AAD-1	ELISA (µg AAD-1 / ml de extracto de planta)	Tolerancia relativa al rociado con 2,4-D*
721(1)1	1	+	0,9	Media
721(2)1	nd	nd	0,6	Media
721(2)2	5	+	0,3	Baja
721(2)3	3	+	2,6	Media
721(2)5	5	+	4,1	Variable
721(2)6	3	+	0,5	Variable
721(2)8	5	+	0,3	Alta
721(2)11	3	+	n/a	Alta
721(2)12	3	+	4,1	Media
721(2)13	2	+	0,5	Media
721(2)14	5	+	0,2	Alta
721(2)16	4	+	3,2	Media
721(2)17	3	+	nd	Alta
721(2)18	5	+	nd	Alta
721(2)19	>10	+	nd	Baja
721(2)20	5	+	nd	Media
721(2)21	4	+	nd	Alta
721(2)22	7	+	nd	Medio
721(2)23	>10	+	nd	Variable
721(3)003	3	+	nd	Variable
721(3)008	2	+	nd	Alta
721(3)012	1	+	nd	Alta

721(3)4	2	+	0,5	Alta
721(3)5	9	+	3,3	Alta
721(3)6	4	+	7,1	Variable
721(3)9	2	+	1	Baja
721(3)10	3	+	0,6	Alta
721(3)11	7	+	6	Baja
721(3)13	4	+	0,1	Alta
721(3)014	2	+	0,1	Media

nd = no realizada

Leyenda:	Tolerancia relativa*	de lesión a 3200 g ea/ha de 2,4-D (14DAT)
	Baja	>50% de lesión
	Media	20-50% de lesión
	Alta	<20% de lesión
	Variable	inconsistente

Las estimaciones de número de copias se confirmaron por Análisis Southern en varios eventos. El análisis de transferencia Southern se realizó con ADN total obtenido del kit Qiagen DNeasy. Un total de 2 µgs de ADN se sometió a digestión nocturna de NsiI y también HindIII para pDAB721 para obtener los datos de integración. Después de la digestión nocturna, se corrió una alícuota de ~100 ngs sobre gel 1% para asegurar la digestión completa. Después de asegurarse esto, las muestras se procesaron utilizando el mismo protocolo que en el Ejemplo 6 sección 11.

Además todos los eventos se ensayaron para determinar la presencia del gen *AAD-1 (v3)* por PCR utilizando las mimas muestras de ADN extraídas. Un total de 100 ng de ADN total se utilizó como molde. Se utilizó 20 mM de cada cebador con el kit Takara Ex Taq PCR Polimerase (Mirus TAKRR001A). Los cebadores para la PCR de la región codificadora del PCR AAD-1 fueron

(RdpAcodF ATGGCTCA TGCTGCCCTCAGCC) (SEC ID NO:27) y (RdpAcodR CGGGCAGGCCTAACTCCACC AA) (SEC ID NO:28). La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 64°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 45 segundos seguido de 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis sobre gel de agarosa 1% teñido con EtBr. Cuatro a 12 linajes clonales de cada uno de los 30 eventos positivos de PCR se regeneraron y se trasladaron al invernadero.

Una planta representativa de cada uno de los 19 eventos se ensayó para la expresión de AAD-1 (v3) por los métodos de ELISA previamente descriptos. Todos los eventos ensayados mostraron niveles detectables de AAD-1 (v3) (**Tabla 27**). La expresión de la proteína varió entre eventos.

Las plantas T_0 de cada uno de los 30 eventos se provocaron con un amplio rango de 2,4-D rociado sobre plantas que tenían una altura de 3 a 4 pulgadas. Las aplicaciones de rocío se realizaron según se describió previamente utilizando un atomizador de vía a un volumen de rocío de 187 l/ha. Se aplicó sal de dimetilamina del 2,4-D (Riverside Corp) a 0, 50, 200, 800, o 3200 g ea/ha a clones representativos de cada evento mezclado en agua desionizada. Cada tratamiento se replicó de una a tres veces. Las proporciones de lesión se registraron 3 y 14 DAT. Cada evento ensayado fue más tolerante al 2,4-D que la línea control no transformada KY160. En varios eventos, alguna epinastía relacionada con el herbicida auxínico inicial se produjo a dosis de 800 g ea/ha o menos. Algunos eventos no estaban dañados con esta proporción (equivalente a 1,5X de proporción de campo). Todos los eventos sufrieron alguna lesión auxínica temporaria de nivel 3 DAT cuando se trataron con 3200 g ea/ha. También se produjo algo de quemado de hojas en esta proporción debido a la acidez de la

solución de rocío. Se reguló el pH de ensayos futuros con proporciones elevadas de 2,4-D. La respuesta de las plantas T_0 tratadas con 3200 g ea/ha de 2,4-D (~6X proporción de campo) se utilizó para discernir tolerancia relativa de cada evento: "baja" (>50% de lesión 14 DAT), "media" (20-50% de lesión), "alta" (<20% de lesión). Algunos eventos no fueron uniformes en respuesta entre los replicados y se consideraron "variables" (**Tabla 27**).

Verificación de tolerancia alta al 2,4-D.

Dos a cuatro individuos T_0 que sobrevivieron a altas proporciones de 2,4-D se reservaron de cada evento y se dejaron auto-fertilizar en el invernadero para dar lugar a semillas T_1. Dos líneas de tabaco de *AAD-1 (v3)* (evento 721(2)-013.010 y 721(3)-008.005) se eligieron de la generación T_0. La semilla de T_1 se estratificó, y se sembró en bandejas de selección similares a la de *Arabidopsis* (Ejemplo 6.4), seguido de eliminación selectiva de nulos transformados en esta población segregante con 280 g ia/ha de glufosinato (selección de PAT). Las sobrevivientes se transfirieron a potes individuales de 3 pulgadas en el invernadero. Estas líneas aportaron niveles medios y altos de resistencia al 2,4-D en la generación T_0. La consistencia mejorada de respuesta se prevé en plantas T_1 que no surgieron directamente del cultivo tisular. Estas plantas se compararon contra el tabaco KY 160 de tipo salvaje. Todas las plantas se rociaron con el uso de un atomizador de vía colocado a 187 l/ha. Las plantas se rociaron desde un rango de 70-4480 g ea/ha de sal de dimetilamina del 2,4-D (DMA), R-Diclorprop, y una mezcla 50/50 de los dos herbicidas. Todas las aplicaciones se formularon en buffer Hepes 200mM (pH 7,5). Cada tratamiento se replicó cuatro veces. Las plantas se evaluaron a los 3 y 14 días después del tratamiento. A las plantas se les asignó una relación de lesión con respecto a atrofia, clorosis y necrosis. La generación T_1 es segregante, de modo que se esperó alguna respuesta variable debido a la diferencia en zigosidad. (**Tabla 28**). No se observó lesión alguna en

proporciones por debajo de las proporciones 1X de campo (560 g ea/ha) para el 2,4-D o el R-diclorprop en cualquier evento. Se observó una baja lesión aún hasta 8 veces las proporciones de campo (4480 g ea/ha) y se exhibió como achaparrado, sin lesión herbicida auxínica. Estos resultados indicaron que el *AAD-1 (v3)*, puede aportar tolerancia de nivel comercial, aún en un cultivo dicotiledóneo muy sensible a la auxina como el tabaco. Estos resultados además muestran que se puede impartir a los herbicidas tipo fenoxi auxina, resistencia tanto quiral (ácido 2,4-diclorofenoxipropiónico) como aquiral (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) solos o en combinación de mezcla de tanque.

Tabla 28. Respuesta de plantas de tabaco T_1 con AAD-1 segregantes a los herbicidas tipo fenoxi auxinas.

Herbicida	KY160 – de tipo salvaje	721(2)013.010 (tolerancia media en generación T_0)	721(3)008.005 (alta tolerancia en generación T_0)
	% Promedio de lesión de replicados 14 DAT		
560 g ea/ha de 2,4-D DMA	75	5	0
1120 g ea/ha de 2,4-D DMA	80	5	2
2240 g ea/ha 2,4-D de DMA	90	5	0
4480 g ea/ha 2,4-D de DMA	95	5	5
560 g ea/ha de R-diclorprop	70	5	0
1120 g ea/ha de R-diclorprop	75	5	0
2240 g ea/ha de R-diclorprop	88	5	0
4480 g ea/ha de R-diclorprop	95	10	5
560 g ea/ha 2,4-D de DMA/R-diclorprop	80	5	5
1120 g ea/ha de 2,4-D DMA/R-diclorprop	80	10	10
2240 g ea/ha de 2,4-D DMA/R-	95	15	15

diclorprop 4480 g ea/ha de 2,4-D DMA/R-diclorprop	95	15	15

También se llevó a cabo un ensayo de progenie de 100 plantas sobre cada una de las dos líneas de *AAD-1 (v3)* (eventos 721(2)-013.010 y 721(3)-008.005). Las semillas se estratificaron, se sembraron y se transplantaron con respecto al procedimiento anterior salvo que las plantas nulas no se eliminaron por selección de Liberty. Todas las plantas luego se rociaron con 560 g ea/ha de 2,4-D DMA según se describió previamente. Después de 14 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Ambos eventos '013' y '008' se segregaron como una característica Mendeliana dominante de locus único (3R:1S) según se determinó por el análisis de Chi cuadrático. El AAD-1 es heredable como un gen de resistencia a la fenoxi auxina fuerte en múltiples especies.

La tolerancia a nivel de campo se demostrará por la plantación de semillas de T_1 o T_2 en el invernadero, eliminando selectivamente las plantas nulas por selección de Liberty según se describió previamente, y levantando los plantines individuales en mesetas de transplante de 72 pocillos (Hummert International) en medio Metro 360 de acuerdo con las condiciones de crecimiento indicadas anteriormente. Las plantas individuales se transplantarán en los potes de campo utilizando un plantador vegetal individual. Se utilizará irrigación por inmersión o superficial para mantener el crecimiento de las plantas con vigor. Una vez que las plantas alcancen una altura de 6 a 12 pulgadas, las plantas de tabaco se rociarán con un rango amplio de fenoxi auxinas y se dosificarán según se mostró anteriormente. Las situaciones de estrés ambientales son más significativas en condiciones de campo; sin embargo, en base a la experiencia previa con maíz

transformado con *AAD-1 (v3)*, se espera un fuerte traslado de la resistencia del invernadero al campo.

Ejemplo 13 – Transformación de la Soja

La mejora de la soja a través de técnicas de transferencia génica se ha logrado para rasgos tales como la tolerancia a los herbicidas (Padgette *et al.*, 1995), modificación de aminoácidos (Falco *et al.*, 1995), y resistencia a los insectos (Parrott *et al.*, 1994). La introducción de rasgos extraños en especies de cultivos requiere métodos que permitan la producción de rutina de líneas transgénicas usando secuencias marcadoras susceptibles de selección, que contienen inserciones simples. Los transgenes deben heredarse como locus funcional simple para simplificar el mejoramiento. Se ha informado sobre la colocación de genes extraños en la soja cultivada a través de bombardeo de microproyectiles de brotes embrionarios zigóticos (McCabe *et al.*, 1988) o cultivos embriogénicos somáticos (Finer and McMullen, 1991), y transformación de explantos con cotiledones mediada por *Agrobacterium* (Hinchee *et al.*, 1988) o embriones zigóticos (Chee *et al.*, 1989).

Los transformantes derivados de transformaciones mediadas por *Agrobacterium* tienden a poseer inserciones simples con un número bajo de copias (Birch, 1991). Existen beneficios y desventajas asociados con cada uno de los tres tejidos blanco investigados para la transferencia de genes en ejes embrionarios zigóticos de la soja (Chee *et al.*, 1989; McCabe *et al.*, 1988), cotiledones (Hinchee *et al.*, 1988) y cultivos embriogénicos somáticos (Finer and McMullen, 1991). Los últimos se han investigado de manera extensiva como tejido blanco para transferencia génica directa. Los cultivos embriogénicos tienden a ser bastante prolíficos y pueden mantenerse durante un período prolongado. Sin embargo, se han asociado esterilidad y aberraciones cromosómicas de los transformantes primarios con la edad de las suspensiones embriogénicas (Singh

et al., 1998) y de este modo la iniciación continua de nuevos cultivos resulta ser necesaria para los sistemas de transformación de la soja que utilizan este tejido. Este sistema necesita un alto nivel de 2,4-D, concentración de 40 mg/l, para iniciar el callo embriogénico y esto plantea un problema fundamental en el uso del gen *AAD-1 (v3)* ya que el locus transformado podría no desarrollarse en forma adicional con 2,4-D en el medio. Por lo tanto, la transformación basada en meristemas es ideal para el desarrollo de plantas resistentes al 2,4-D usando *AAD-1 (v3)*.

13.1 – Método de transformación 1: transformación del nodo cotiledónico de la soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Los primeros informes de transformación de soja apuntaban a células meristemáticas en la región del nodo cotiledónico (Hinchee *et al.*, 1988) y multiplicación de brotes a partir de los meristemas apicales (McCabe *et al.*, 1988). En el método del nodo cotiledónico basado en *A. tumefaciens*, la preparación de explantos y la composición del medio de cultivo estimulan la proliferación de meristemas auxiliares en el nodo (Hinchee *et al.*, 1988). Aún no resulta claro si se inicia un cultivo de callo realmente desdiferenciado, aunque totipotencial, con el uso de estos tratamientos. La recuperación de múltiples clones de un evento de transformación de un explanto única y la recuperación poco frecuente de plantas quiméricas (Clemente *et al.*, 2000; Olhoft *et al.*, 2003) indica un único origen celular seguido de multiplicación de la célula transgénica para producir un cultivo de meristemas transgénicos en proliferación o un brote transformado de manera uniforme que se somete a multiplicación adicional del brote. El método de multipllicación del brote de la soja, basado originalmente en el bombardeo de microproyectiles (McCabe *et al.*, 1988) y, más recientemente, adaptado para transformación mediada por *Agrobacterium* (Martinell *et al.*, 2002), aparentemente no sufre el mismo nivel o tipo de desdiferenciación que el método del nodo

cotiledónico dado que el sistema se basa en la identificación exitosa de las quimeras de las líneas germinales. La variedad de genotipos que se han transformado a través del método del nodo cotiledónico basado en *Agrobacterium* se encuentra en crecimiento sostenido (Olhoft y Somers, 2001). Este método de multiplicación de brote y meristema *de novo* está menos limitado a genotipos específicos. Además, este es un protocolo no basado en 2,4-D que sería ideal para el sistema de selección de 2,4-D. De este modo, el método del nodo cotiledónico puede ser el método de elección para desarrollar cultivares de soja resistentes al 2,4-D. Aunque este método se describió a principios de 1988 (Hinchee *et al.*, 1988), sólo se ha optimizado muy recientemente para transformación de rutina de alta frecuencia de varios genotipos de soja (Zhang *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2004).

13.1.1 – Preparación del *Agrobacterium*. El plásmido, pDAB721, contiene el gen *AAD-1* (v3) bajo el control del promotor *Arabidopsis* Ubi10. Este plásmido también transporta el gen *PAT* bajo el control del promotor de la actina del arroz que codifica una enzima que degrada el glufosinato, que puede usarse como agente de selección para los transformantes. Este vector puede usarse en el experimento de transformación descrito a continuación. La construcción pDAB721 se movilizó en la cepa de *Agrobacterium* EHA101S por electroporación.

Los cultivos de *Agrobacterium* que albergan a pDAB721 usados en las transformaciones pueden cultivarse en medio YEP (10 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl, pH 7,0). Los cultivos de *Agrobacterium* se peletizan a baja velocidad y se resuspenden en medio líquido de SCM (ver más adelante) a una DO660 de 0,6 para usar en las inoculaciones.

13.1.2 – Transformación de la planta. Semillas de genotipos públicos "Thorne," "Williams82," o "NE3001," de soja, pueden desinfectarse a través de un lavado de 20 minutos en lavandina comercial al 20% (v/v) (NaClO) modificada con

2 gotas de Liqui-Nox®. Las semillas deben enjuagarse cinco veces con agua estéril en medio de SHGA sin hormonas y dejarse germinar durante 5 días a 24°C, con un régimen de luz/oscuridad de 18/6 horas. El medio B5 consiste en macro y micro nutrientes y vitaminas descritos por Gamborg *et al.* (1968) (Sigma, cat. #G 5893, St. Louis). Todos los medios se solidifican con agar lavado al 0,8% (p/v) (Sigma cat. #A 8678). En forma alternativa, ciertos genotipos de la soja pueden someterse a un procedimiento de esterilización de superficie seca usando cloro gaseoso (Cl_2) mediante el cual se colocan las semillas maduras en placas de Petri de 100 x 25 mm en una sola capa usando aproximadamente 130 semillas por placa. Se colocan aproximadamente 3-4 placas en un desecador dentro de una campana de humo de modo tal que todas las placas estén medio abiertas y que haya suficiente espacio para un vaso de precipitadoss de 250 ml en el medio del desecador. El vaso de precipitados se llena con 95 ml de blanqueador comercial, al cual se agrega 5 ml de HCl concentrado (12N) gota a gota a lo largo del lateral del vaso de precipitados. Inmediatamente se cierra el desecador y se deja reposar durante por lo menos 16 horas en una campana de humo. Luego de la esterilización, se cierran las placas, luego se llevan a una campana de flujo laminar y se deja abierta durante aproximadamente 30 minutos para eliminar cualquier exceso de gas Cl_2. Luego se germinan las semillas como se describió con anterioridad. Las superficies esterilizadas en superficie seca permanecerán estériles a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 semanas. Se preparan explantos para inoculación como se describió con anterioridad (Hinchee *et al.*, 1988).

Los explantos deben inocularse durante 30 minutos. El medio de co-cultivo y re-suspensión de *Agrobacterium* consiste en medio B5 suplementado con 1 mg/l de BAP, 1 mg/l de GA3, sacarosa al 3% (p/v), MES (ácido 2-[N-morfolin]etan sulfónico) 20 mM, 400 mg/l de L-cisteína (Olhoft y Somers, 2001) pH 5,7,

ditiotreitol 0,99 mM (DTT), y acetosiringona 200 µM (AS). Los explantos se co-cultivan durante 5 dias a 25°C. Luego del co-cultivo, los explantos se lavan en el medio de co-cultivo que contiene 100 mg/l de timentina y 200 mg/l de cefotaxima, sin MES ni AS.

Los explantos deben colocarse en medio de inducción de brote y transferirse cada 14 días durante un total de 28 días antes de la selección del herbicida. El medio de inducción del brote consiste en medio B5 de potencia completa suplementado con 1,7 mg/l de BAP, 100 mg/l de timentina, 200 mg/l de cefotaxima pH 5,7 y sacarosa al 3% (p/v). Los cotiledones deben colocarse con adaxial hacia arriba con el brote de la región nodal cotiledónica hacia el medio, modificado con niveles crecientes de Basta (2, 5, 6 luego 7 mg/l de glufosinato de amonio) o niveles sub-letales de 2,4-D que varían desde 10 mg hasta 400 mg/l cada 2 semanas durante un total de 8 semanas.

Los explantos que se diferencian se transfieren posteriormente a medio de elongación de brote durante un adicional de 4 a 10 semanas bajo la misma selección de glufosinato o bajo presión reducida de selección de 2,4-D que varían desde 10 mg hasta 100 mg/l. El medio de elongación consistía en medio B5 (Sigma cat. #M0404) modificado con 1 mg/l de zeatin ribósido, 0,1 mg/l de IAA (ácido indol-3-acético), 0,5 mg/l de GA3, 50 mg/l de glutamina, 50 mg/l de asparagina, y sacarosa al 3% (p/v), pH 5,8. Los brotes elongados deben plantarse, sin selección adicional, en medio MS/B5 de media potencia con vitaminas de potencia completa más 0,5 mg/l de NAA (ácido α-naftalenacético) o 0,1 mg/l de IAA y 2% (p/v) de sacarosa.

Los antibióticos, timentina y cefotaxima, se mantienen dentro del medio durante toda la selección. Se transfieren los cultivos a medio recién preparado cada 2 semanas. Se aclimatan los plantines durante 1 a 2 semanas antes de transferir al invernadero.

13.1.3 – Evaluación de la progenie. Se dejará auto-fertilizar plantas T_0 en el invernadero para dar lugar a semillas T_1. Las plantas T_1 (y en la medida que se produzcan clones de plantas T_0) se asperjarán con un rango de dosis de herbicida para determinar el nivel de protección de herbicida producido por los genes *AAD-1 (v3)* y *PAT* en la soja transgénica. Los índices de 2,4-D usados en las plantas T_0 normalmente usarán una o dos proporciones selectivas en el rango de 100-400 g ea/ha. Se tratará la semilla T_1 con una dosis más amplia de herbicida que varia desde 50-3200 g ea/ha de 2,4-D. Del mismo modo, se seleccionarán las plantas T_0 y T_1 para determinar la resistencia al glufosinato mediante tratamiento de post-emergencia con 200-800 y 50-3200 g ea/ha de glufosinato, respectivamente. El análisis de la expresión de proteínas ocurrirá como se describe en el Ejemplo 9 para *Arabidopsis* y maiz. La determinación de la herencia de *AAD-1 (v3)* se realizará usando segregación de la progenie de T_1 y T_2 con respecto a la tolerancia al herbicida.

13.2 – Método de transformación 2: Transformación mediada por *Agrobacterium* "sin agitar" de células en suspensión de soja no regenerables.

Se cultivaron las suspensiones de células de Soja DAS en un ciclo de 3d con 10 ml de volumen de suspensión asentado transferido a 115 ml de medio liquido recién preparado. El volumen celular asentado se determinó dejando reposar la suspensión celular durante 2 min en el matraz de 125 ml luego de girar vigorosamente y luego de sacar las células de la parte inferior del matraz con una pipeta de 10 ml de calibre amplio. Luego se transfirieron los matraces a agitadores orbitales a 140 rpm.

Se transfirieron alicuotas de 4 ml de las células en suspensión a una DO^{600} de 0,72 junto con acetosiringona 200 µM (AS) sobre una placa de Petri estéril de 100x25. Se agregó suspensión de EHA105 *Agrobacterium* a una densidad DO^{650} de 1,2 en un volumen de 100 µl y se mezcló bien. La mezcla de *Agrobacterium* y

la suspensión celular se agitó bien y se transfirió la placa a la cámara de cultivo en oscuridad donde se mantuvo la temperatura a 25°C.

13.2.1 – Selección de células en suspensión de soja y aislamiento de colonias transformadas. Luego de 4 días de co-cultivo se agitó nuevamente la placa para mezclar bien la suspensión y se transfirió una alícuota de 1,5 ml al medio de selección y se esparció sobre el medio en gel sobre una placa de Petri de 100 x 15. El medio de selección consistía en medio B5 de potencia completa suplementado con 1,7 mg/l BAP, 100 mg/l de timentina, 200 mg/l de cefotaxima pH 5,7 y sacarosa al 3% (p/v) y el medio se modificó con glufosinato de amonio a nivel de 5 mg/l. Luego de un secado de 10 min en campana las placas se incubaron durante 4 semanas en la oscuridad a 28°C. Aparecieron colonias en la selección y se transfirieron un total de 11 colonias a medio fresco de 3 experimentos diferentes y se mantuvieron durante 3-4 meses. La totalidad de las 11 colonias resistentes produjeron callos que crecieron en el medio de selección lque contenía 5 mg/l de glufosinato..Las células en suspensión no transformadas fueron sensibles cuando se colocaron en placas sobre medio con 0,5 mg/l de glufosinato de amonio. Sin embargo, las colonias transformadas fueron resistentes a una concentración 5x de glufosinato de amonio y se mantuvieron durante un máximo de 4 meses.

Se tomaron muestras de los eventos de los callos para realizar análisis cuando alcanzaron los 2 a 3 cm de diámetro. Por lo menos dos de los aislados de colonias, cada uno de dos experimentos diferentes, se analizaron para determinar la expresión de las proteínas AAD1. Los análisis de ELISA y Western realizados sobre estos dos aislados mostró expresión positiva de las proteíans AAD1. Tanto el análisis ELISA (**Tabla 29**) como la transferencia Western (**Figura 18**) sobre dos callos de soja separados transformados con gen *AAD-1* (v3) indicaron que las células de callo expresan proteína AAD-1 (v3). El análisis ELISA sándwich detectó

0,0318% y 0,0102% de proteína soluble total AAD-1 (v3) en dos muestras de tejidos de callos diferentes. Debido a la sensibilidad y reactividad cruzada del antisuero, se observaron múltiples bandas en la transferencia western. Sin embargo, se observó banda específica de AAD-1 (v3) en ambas muestras de callos pero no en el tejido de tipo salvaje (negativo). Los análisis por PCR de la región de codificación mostraron productos de tamaño esperado de las regiones de codificación AAD1 y PAT en estas colonias indicando que se transformaron.

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

Evento	AAD-1 PCR de región codificadora	PAT PCR de región codificadora	T SP (µg/ml)	AAD-1 (ng/ml)	% de Expresión
1-1	+	+	1995,13	633,89	0,0318%
2-1	+	+	2018,91	205,92	0,0102%
Control Negativo	-	-	2074,63	-1,22	-0,0001%

13.3 – Método de transformación 3: transformación mediada por haz de aerosol de tejido de callo de soja embriogénico.

El cultivo de tejido de callo de soja embriogénico y el haz posterior fueron como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6.809.232 (Held *et al.*).

Se recolectaron por separado callos embriogénicos de varias variedades de Stine elite, incluyendo 96E750, 96E94, 97E986, 96E144 y 96E692, en el centro de las placas de B1-30 3Co5My o B1-30 3Co5My0.25PA0,5K tres días después de transferir a medio fresco. El tejido luego se roció con pDAB3295 usando ADN linealizado a una concentración de aproximadamente 0,2 µg/ml. Luego de rociar, el callo embriogénico se transfirió a B1-30 3Co5My o B1-30 3Co5My0.25PA0,5K fresco para un pasaje de un mes. El tejido se transfirió luego a medio selectivo que contenía 1 mg/l de bialafos. Con bialafos, la selección normalmente se mantuvo a 1 mg/l durante los primeros dos pasajes de un mes y luego aumentó a

2 mg/l para los siguientes tres a siete meses. Los eventos transgénicos se identificaron cuando el tejido del callo generado por experimentos de transformación comenzó a organizarse y desarrollarse en estructuras embriogénicas mientras que aún se encontraba en medio selectivo que contenía 2,4-D más bialafos. Una vez identificadas, las estructuras en maduración se regeneraron en plantas de acuerdo con el siguiente protocolo: Se transfirieron las estructuras embriogénicas B1-30 3Co5My o B1-30 3/co5My0.25PA0,5K a medio B3. Luego de 3 a 4 semanas de cultivo en medio B3, las estructuras individuales se transfirieron a medio fresco. Luego de otras 3 a 4 semanas, los embriones en maduración se transfirieron a medio B5G y se colocaron a la luz. Los embriones que se habían elongado y produjeron raíces se transfirieron a tubos que contenían medio 1/2 B5G donde continuaron el desarrollo hasta formar plantines; y estos plantines se retiraron de los tubos y se colocaron en potes.

Se evaluaron las variaciones del medio mencionado en la **Tabla 30**, *por ej.* B1-30 3Co5My, que se hizo agregando agua de coco al 3% y 5 gm/l de mioinositol a B1-30. Otras variaciones incluyeron: B1-30 3Co5My0.25 PA0,5K que contenía medio basal B1-30 más 3% de agua de coco, 5 gm/l de mioinositol, 0,25 gm/l de ácido fítico, y 0,5 gm/l de KH_2PO_4 adicional y 1/2 B5G que contenía todos los componentes del medio B5G a la mitad de la concentración.

Tabla 30. Medio de Cultivo para Soja			
	Componentes en 1 Litro		
	B1-30	B3	B5G
Sales Ms	4,43 g	4,43 g	
Sales B5			3,19 g
NaEDTA	37,3 mg	37,3 mg	37,3 mg
2,4-D	30 mg		
Carbón activado		5 g	
Phytagar	8g	8g	
Gelrite			2g
pH	5,8	5,8	5,8

Ejemplo 14 – Activación de *AAD-1 (v3)* en Algodón

14.1 – Protocolo de transformación del algodón.

Se esteriliza la superficie de semillas de algodón (genotipo Co310) en etanol 95% durante 1 minuto, se enjuaga, se esteriliza con lavandina comercial al 50% durante veinte minutos, y luego se enjuaga 3 veces con agua destilada estéril antes de germinar en medio G (**Tabla 31**) en recipientes Magenta GA-7 y se mantiene bajo intensidad de luz alta de 40-60 µE/m2, con el fotoperiodo fijado en 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 28°C.

Se aislan segmentos de cotiledones (~5mm) cuadrados de plántulas de 7-10 días en medio M líquido (**Tabla 31**) en cápsulas de Petri (Nunc, item #0875728). Los segmentos cortados se tratan con una solución de *Agrobacterium* (durante 30 minutos) luego se transfieren a medio M semisólido (Tabla **31**) y se someten a co-cultivo durante 2-3 días. Luego del co-cultivo, se transfieren los segmentos a medio de MG (**Tabla 31**). La carbenicilina es el antibiótico usado para matar el *Agrobacterium* y el glufosinato de amonio es el agente seleccionado que permitirla el crecimiento sólo de aquellas células que contienen el gen transferido.

Preparación del *Agrobacterium*. Inocular 35ml de medio Y (Tabla **31**) (que contiene estreptomicina (concentrado de 100 mg/ml) y eritromicina (concentrado

de 100 mg/ml)), con un bucle de bacteria para cultivo hasta la mañana siguiente en la oscuridad a 28°C, mientras se agita a 150 rpm. Al día siguiente, verter la solución de *Agrobacterium* en un tubo de oakridge estéril (Nalge-Nunc, 3139-0050), y centrifugar en Beckman J2-21 a 8.000 rpm durante 5 minutos. Verter para eliminar el sobrenadante y suspender nuevamente el pellet en 25 ml de líquido M (Tabla 31) y pasar por vórtex. Colocar una alícuota en un tubo de cultivo de vidrio (Fisher, 14-961-27) para lectura de Klett (Klett-Summerson, modelo 800-3). Diluir la nueva suspensión usando medio M líquido a una lectura de medida de Klett de 10^8 unidades formadoras de colonia por ml con un volumen total de 40 ml.

Luego de tres semanas, el callo de los segmentos de cotiledones se aisla y se transfiere a medio MG fresco. El callo se transfiere durante un adicional de 3 semanas en medio de MG. Luego se transfiere el callo a medio CG (**Tabla 31**), y se transfiere nuevamente a medio fresco de selección después de tres semanas. Luego de otras tres semanas el tejido del callo se transfiere a medio D (**Tabla 31**) que carece de reguladores del crecimiento de las plantas para inducción del callo embriogénico. Luego de 4-8 semanas en este medio, se forma el callo embriogénico, y puede distinguirse del callo no embriogénico por su color blanco amarillento y células granulares. Los embriones comienzan a regenerarse apenas después y son de color verde distinto.

Se aíslan y se transfieren embriones más grandes, bien desarrollados a medio DK (**Tabla 31**) para desarrollo embrionario. Luego de 3 semanas (o cuando se hayan desarrollado los embriones), los embriones germinados se transfieren a medio fresco para desarrollo de brote y raíz. Luego de 4-8 semanas, todas las plantas bien desarrolladas se transfieren al suelo y se cultivan hasta la madurez. Luego de un par de meses, la planta ha crecido hasta el punto que puede asperjarse para determinar si tiene resistencia al 2,4-D.

Tabla 31. Medios para Transformación del Algodón								
Componentes en 1 litro	**G**	**Líquido M**	**M**	**MG**	**CG**	**D**	**DK**	**Y**
Sales LS (5X)	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml			
Glucosa		30 gramos	30 gramos	30 gramos	30 gramos	20 gramos		
Vit. B5 modificada (1000x)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	10 ml	1 ml	
Kinetina (1mM)		1ml	1 ml	1 ml	4.6 ml		0,5ml	
2,4-D (1mM)		1ml	1 ml	1 ml				
Agar	8 gramos		8 gramos	8 gramos	8 gramos	8 gramos	8 gramos	
Sales DKWs (D190)						1 paquete	1 paquete	
Mioinositol (100x)						1 ml	10 ml	
Sacarosa 3%	30 gramos						30 gramos	10 gramos
NAA								
Carbenicilina (250 mg/ml)				2 ml	0,4 ml			
GLA (10mg/ml)				0,5 ml	0,3 ml			
Peptona								10 gramos
Extracto de Levadura								10 gramos
NaCl								5 gramos

14.2 – Especificaciones del experimento.

Para este experimento se trataron 500 segmentos de cotiledones con pDAB721. De los 500 segmentos tratados, 475 tenían callo aislado mientras se encontraban en selección (95% de frecuencia de transformación). El callo se seleccionó en glufosinato de amonio, debido a la inclusión del gen *PAT* en la construcción, dado que ya había un esquema de selección desarrollado. El análisis de la línea de callo en forma de PCR e Invader se inició para determinar los patrones de inserción y estar seguros de que el gen estaba presente en la etapa del callo, luego las líneas de callo que resultaron embriogénicas se enviaron para análisis Western.

14.3 – Resultados del análisis del callo.

El objetivo del análisis es eliminar cualquier línea que no tenga el PTU completo, no muestre expresión o que tenga un alto número de copias, de modo que esas líneas no se regeneran. De las 475 líneas de callos de pDAB721 transformadas, 306 se enviaron para análisis de PCR y valoración Invader (**Tabla 32**). Muy pocas líneas fueron PCR negativas. Los resultados de Invader no están completos en este momento, ya que algunas muestras tenían bajas cantidades de ADN cuando se las extrajo, y estas se han re-sometido. Sin embargo, los datos actuales de Invader muestran que algunas de las líneas sometidas tenían un alto número de copias (número de copias >2) (**Tabla 32**). Debido al extenso número de líneas que pasaron el análisis, fue necesario reducir el número de líneas celulares embriogénicas mantenidas debido al volumen. Noventa líneas se habían enviado para análisis Western, y ocho de estas fueron negativas. El análisis western mostró una alta expresión de la mayoría de las líneas (**Tabla 32**). Ochenta y dos líneas de callos embriogénicas se mantienen para regeneración de las plantas en base a los resultados del estudio (y los resultados pendientes).

398

Tabla 32. Análisis de callos de algodón

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

Tabla 32. Análisis de callos de algodón

Línea	Copia #	PTU	Western
33	bajo ADN	pos	****
34	bajo ADN	pos débil	*****
35	bajo ADN	pos	****
36	bajo ADN	pos	neg
37	bajo ADN	pos	****
38	bajo ADN	neg	*****
39	1	pos	****
40	bajo ADN	pos	*
41	bajo ADN	pos	*
42	bajo ADN	pos	**
estándar	AAD1	5ug/ml	*****
estándar	AAD1	0,5ug/ml	**

Línea	Copia #	PTU	Western
75	Bajo ADN	pos	***
76	Bajo ADN	pos	neg
77	bajo ADN	pos débil	****
78	bajo ADN	pos	****
79	1	pos	**
80	bajo ADN	pos	***
81	bajo ADN	pos	***
82	bajo ADN	pos	***
83	bajo ADN	neg	****
84	bajo ADN	pos	***
85	bajo ADN	pos	**
86	bajo ADN	pos	*

14.4 – Regeneración de plantas.

Dos líneas de algodón *AAD-1 (v3)* han producido plantas de acuerdo con el protocolo anterior que se han enviado al invernadero. Para demostrar que el gen *AAD-1* (v3) provee resistencia al 2,4-D en el algodón, tanto la planta del algodón *AAD-1 (v3)* y las plantas de algodón de tipo salvaje se asperjaron con un aspersor de rastreo configurado a 187 l/ha. Las plantas se asperjaron a 560 g ea/ha de 2,4-DMA formulado en buffer de Hepes 200 mM (pH 7,5). Las plantas se evaluaron a los 3, 7, y 14 días después del tratamiento. Se asignó a las plantas clasificaciones de lesiones con respecto a atrofia, clorosis, y necrosis. Las plantas que recibieron una clasificación de lesión de 90% o más se consideraron muertas. Tres días después del tratamiento (DAT) la planta del tipo salvaje comenzó a mostra epinasia y recibió una clasificación del 15%; en contraste, la planta *AAD-1 (v3)* mostró 0% de lesiones. Alrededor de 7 DAT la epinasia continuó en la planta de tipo salvaje y los nuevos brotes comenzaron a tornarse marrones. Recibió una clasificación de 50% en este momento. A los 14 DAT la planta *AAD-1 (v3)* aún no tenía lesiones, mientras

que la de tipo salvaje estaba severamente atrofiada, y las nuevas áreas de crecimiento fueron marrones y arrugadas. De este modo, la planta de tipo salvaje recibió una clasificación de 90% a los 14 DAT.

Este estudio demuestra que el gen *AAD-1* (v3) en el algodón provee tolerancia sustancial a 2,4-D hasta por lo menos 560 g ea/ha.

Ejemplo 15 – Transformación con *Agrobacterium* de Otros Cultivos

En vista de la revelación de la invención, pueden transformarse cultivos adicionales de acuerdo con la presente invención usando técnicas que son conocidas en el arte. Para la transformación mediada por *Agrobacterium* del centeno, *ver, por ej.*, Popelka and Altpeter (2003). Para la transformación mediada por *Agrobacterium* de la soja, *ver, por ej.*, Hinchee *et al.*, 1988. Para la transformación mediada por *Agrobacterium* del sorgo, *ver, por ej.*, Zhao *et al.*, 2000. Para la transformación mediada por *Agrobacterium* de la cebada, *ver, por ej.*, Tingay *et al.*, 1997. Para la transformación mediada por *Agrobacterium* del trigo, *ver, por ej.*, Cheng *et al.*, 1997. Para la transformación mediada por *Agrobacterium* del arroz, *ver, por ej.*, Hiei *et al.*, 1997.

Los nombres en latín de estas y otras plantas se dan a continuación. Debe resultar claro que estas y otras técnicas de transformación (sin *Agrobacterium*) pueden usarse para transformar *AAD-1 (v3)* en estas y otras plantas, incluyendo sin carácter limitativo Maíz (*Gramineae Zea mays*), Trigo (*Pooideae Triticum* spp.), Arroz (*Gramineae Oryza* spp. y *Zizania* spp.), Cebada (*Pooideae Hordeum* spp.), Algodón (*Abroma Dicotyledoneae Abroma augusta*, y *Malvaceae Gossypium* spp.), Soja (*Soya Leguminosae Glycine max*), Remolacha (*Chenopodiaceae Beta vulgaris altissima*), Caña de azúcar (*Arenga pinnata*), Tomate (*Solanaceae Lycopersicon esculentum* y otras spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* y otras spp., y *Cyphomandra betacea*), Papa, Batata, Centeno (*Pooideae Secale* spp.), Pimientos (*Solanaceae Capsicum*

401

annuum, *sinense* y *frutescens*), Lechuga (*Compositae Lactuca sativa*, *perennis* y *pulchella*), Coles, Apio (*Umbelliferae Apium graveolens*), Berenjena (*Solanaceae Solanum melongena*), Sorgo (todas las especies de *Sorghum*), Alfalfa (*Leguminosae Medicago sativum*), Zanahoria (*Umbelliferae Daucus carota sativa*), Porotos (*Leguminosae Phaseolus* spp. y otros géneros), Avena (*Avena Sativa* y *Strigosa*), Arvejas (*Leguminosae Pisum*, *Vigna*, y *Tetragonolobus* spp.), Girasol (*Compositae Heliande Thus annuus*), Calabaza (*Dicotyledoneae Cucurbita* spp.), Pepino (*Dicotyledoneae genera*), Tabaco (*Solanaceae Nicotiana* spp.), *Arabidopsis* (*Cruciferae Arabidopsis thaliana*), Césped (*Lolium*, *Agrostis* y otras familias), y Trébol (*Leguminosae*). Dichas plantas, con genes *AAD-1* (v3), por ejemplo, se incluyen en la presente invención.

Ejemplo 16 – Apilamiento de *AAD-1 (v3) con* Gen AHAS de Resistencia a los Herbicidas

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

Ejemplo 17 – Evidencia Adicional de Resultados Sorprendentes: *AAD-1 vs. AAD-2*

17.1 – Clonación inicial de *AAD-2 (v1).*

Se identificó otro gen de la base de datos NCBI (ver el sitio en Internet ncbi.nlm.nih.gov; # de acceso AP005940) como homólogo con solo 44% de identidad de aminoácidos con *tfdA*. Este gen se denomina aquí *AAD-2 (v1)* por consistencia. La identidad porcentual se determinó primero traduciendo las secuencias de ADN de *AAD-2* y *tfdA* (SEC ID NO: 12 y No. de Acceso al GENBANK. M16730, respectivamente) a las proteínas (SEC ID NO: 13 y No. de Acceso al GENBANK. M16730, respectivamente), luego usando ClustalW

en el paquete de software VectorNTI para realizar la alineación de las secuencias múltiples.

La cepa de *Bradyrhizobium japonicum* que contenía el gen *AAD-2(v1)* se obtuvo de Northern Regional Research Laboratory (NRRL, cepa #B4450). La cepa liofilizada se revivió de acuerdo con el protocolo de NRRL y se almacenó a -80°C en glicerol 20% para uso interno como cepa Dow Bacterial DB 663. De este stock del congelador, luego se llenó una placa de Tryptic Soy Agar con un puñado de células para aislamiento, y se incubó a 28°C durante 3 días. Se usó una colonia única para inocular 100 ml de Tryptic Soy Broth en un matraz de 500 ml de tres deflectores, que se incubó hasta la mañana siguiente a 28°C en un agitador de piso a 150 rpm. De esto, se aisló el ADN total con el protocolo gram negativo del kit DNeasy de Qiagen (Qiagen cat. #69504). Se diseñaron los siguientes cebadores para ampliar el gen blanco del ADN genómico, Delantero: 5' ACT AGT AAC AAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA CGA T 3' [(brjap 5'(spel) SEC ID NO: 14 (sitio de restricción agregado Spe I y Sitio de Unión al Ribosoma (RBS))] e Inverso: 5' TTC TCG AGC TAT CAC TCC GCC GCC TGC TGC TGC 3' [(br jap 3' (xhol) SEC ID NO: 15 (se agregó un sitio Xho I)].

Se armaron reacciones de cincuenta microlitros de la siguiente manera: Buffer Fail Safe 25 µl, ea. cebador 1 µl (50 ng/µl), DNAg 1 µl (200 ng/µl), H_2O 21 µl, Taq polimerasa 1 µl (2,5 unidades/µl). Tres Buffers Fail Safe—A, B, y C—se usaron en tres reacciones separadas. Luego se llevó a cabo la PCR en las siguientes condiciones: 95°C 3,0 minutos de ciclo de desnaturalización por calor; 1,0 minuto a 95°C, 1,0 minuto a 50°C, 1,5 minutos a 72°C, durante 30 ciclos; seguido de un ciclo final de 5 minutos a 72°C, usando el FailSafe PCR System (Epicenter cat. #FS99100). El producto resultante de PCR de ~1 kb se clonó en pCR 2.1 (Invitrogen cat. #K4550-40) siguiendo el protocolo incluido,

con *E. coli* TOP10F' químicamente compentente como cepa huésped, para verificación de la secuencia de nucleótidos.

Diez de las colonias blancas resultantes se levantaron en 3 µl de Caldo Luria + 1000 µg/ml Ampicilina (LB Amp), y se cultivaron hasta la mañana siguiente a 37°C con agitación. Se purificaron los plásmidos de cada cultivo usando Nucleospin Plus Plasmid Miniprep Kit (BD Biosciences cat. #K3063-2) y siguiendo el protocolo incluido. La digestión por restricción de los ADN aislados se completó para confirmar la presencia del producto de PCR en el vector pCR2.1. El ADN del plásmido se digirió con la enzima de restricción EcoRI (New England Biolabs cat. #R0101S). Se llevó a cabo la secuenciación con el Kit CEQ Quick Start de Beckman (Beckman Coulter cat. #608120) usando cebadores M13 Delantero [5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'] (SEC ID NO: 16) e Inverso [5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'] (SEC ID NO: 17), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esta secuencia génica y su correspondiente proteína recibió una nueva designación general *AD-2 (v1)* para consistencia interna.

17.2 – Completado del vector binario *AAD-2 (v1).*

El gen *AAD-2(v1)* se amplificó por PCR a partir de pDAB3202. Durante la reacción por PCR se realizaron alteraciones dentro de los cebadores para introducir los sitios de restricción AflIII y SacI en el cebador 5' y cebador 3', respectivamente. Los cebadores "NcoI of Brady" [5' TAT ACC ACA TGT CGA TCG CCA TCC GGC AGC TT 3'] (SEC ID NO: 18) y "SacI of Brady" [5' GAG CTC CTA TCA CTC CGC CGC CTG CTG CTG CAC 3'] (SEC ID NO: 19) se usaron para amplificar un fragmento de ADN usando el Fail Safe PCR System (Epicentre). El producto de PCR se clonó en el vector de clonación pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen) y se verificó la secuencia con cebadores M13 Delantero y M13 Inverso usando los reactivos de secuenciación de Beckman Coulter "Dye

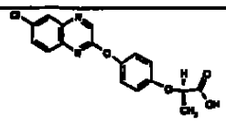
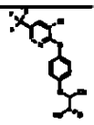
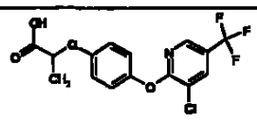
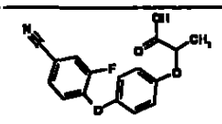
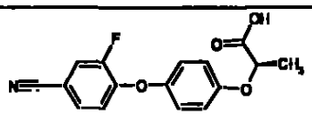
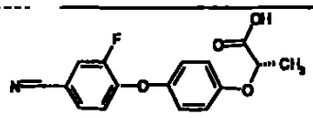
Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit". La secuencia DLTa identificó un clon con la secuencia correcta (pDAB716). El fragmento génico AflIII/SacI *AAD-2 (v1)* se clonó luego en el vector NcoI/SacI pDAB726. La construcción resultante (pDAB717); promotor AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: *AAD-2 (v1)*: Nt OSM3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR se verificó con las digestiones de restricción (con NcoI/SacI). Esta construcción se clonó en el pDAB3038 binario como fragmento de ADN NotI – NotI. La construcción resultante (pDAB767); promotor AtUbi10: Nt OSM5'UTR: *AAD-2 (v1)*: Nt OSM 3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR: promotor CsVMV: *PAT*: ORF25/26 3'UTR se digirió por restricción (con NotI, EcoRI, HinDIII, NcoI, PvuII, y SalI) para verificación de la orientación correcta. La construcción completada (pDAB767) luego se usó para transformación en *Agrobacterium*.

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

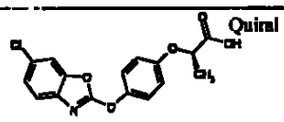
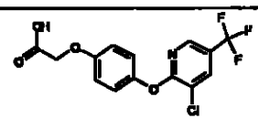
La actividad de un extracto de *E. coli* que expresa AAD-2 (v1) (pDAB3202) preparado como en el Ejemplo 11 se evaluó en cuatro herbicidas, 2,4-D, (R,S)-diclorprop, (R,S)-haloxifop y (R)-haloxifop (todos a una concentración final de 0,5 mM) usando 3 µl (42 µg) de extracto de *E. coli* por ensayo con un período de ensayo de 15 min. La **Figura 22** muestra que la actividad relativa de AAD-2 (v1) en los sustratos fue de 2,4-D = diclorprop > (R,S)-haloxifop >> (R)-haloxifop. De este modo, AAD-2 (v1) difiere de AAD-1 (v1) en el sentido que tiene un nivel de actividad similar sobre 2,4-D que sobre diclorprop (mientras que la actividad de AAD-1 (v1) sobre 2,4-D es ~10% la de diclorprop). AAD-2 (v1) también difiere de AAD-1 (v1) en el sentido que es incapaz de actuar sobre (R)-haloxifop. La **Tabla 33** muestra datos de sustratos adicionales evaluados con AAD-1 (v1) y AAD-2 (v1) que confirman que AAD-2 (v1) es específico para sustratos (S)-enantioméricos, en contraste con AAD-1

(v1) que es específico para enantiómeros (R). En otra prueba, se encontró que AAD-2 (v1) difiere de AAD-1 (v1) en el sentido que libera poco o ningún fenol detectable del 2,4-D sulfonato (en el cual un grupo sulfonato reemplaza al carboxilato de 2,4-D) mientras que AAD-1 (v1) produce niveles significativos de fenol a partir de este compuesto (~25% de 2,4-D.)

Tabla 33. Comparación de la actividad de AAD1 y AAD2 sobre varios sustratos. Se evaluaron los sustratos a 0,5 mM durante 15 min en MOPS 25 mM pH 6,8, Fe^{2+} 200 µM, ascorbato de Na 200 µM, α-cetoglutarato 1 mM usando 4 µl de extracto de AAD1 (32 µg de proteína) o 3 µl de extracto de AAD2 (42 µg de proteína).

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

406

	11044492	fenoxaprop	R	0,14	0
	43865	haloxifop-acetato	--	0	0,22

La cinética enzimática de AAD-1 (v1) y AAD-2 (v1) parcialmente purificadas se comparó usando 2,4-D como sustrato. Los valores de K_m para 2,4-D fueron de 97 y 423 µM para AAD-1 (v1) y AAD-2 (v1) respectivamente y los valores de V_{max} aparentes fueron 0,11 y 0,86 unidades de A_{510}, respectivamente (**Tabla 34**). Dado que se usaron cantidades equivalentes de enzima en los ensayos (según la determinación realizada por análisis SDS-PAGE), puede concluirse que la k_{cat} de AAD-2 (v1) para 2,4-D es casi 8 veces mayor que AAD-1 (v1) y la relación k_{cat}/K_m es 2 veces mayor. De este modo AAD-2 (v1) es significativamente más eficiente en la ruptura del 2,4-D *in vitro* que AAD-1 (v1). Esto contrasta en forma sorprendente con los hallazgos *in planta* informados a continuación, donde las plantas que expresan AAD-1 (v1) son significativamente mejores al conferir resistencia contra 2,4-D con relación a AAD-2 (v1).

Tabla 34. Comparación de los valores de Km y "Vmax" para las ariloxialcanoato dioxigenasas (AADs) de pDAB3202 (AAD-2) y pDAB3203 [AAD-1 (v1)] con diferentes sustratos herbicidas:

Enzima	Compuesto	Km (µM) ±SE	Vmax (unidades A510)	Km/Vmax (unidades arbitrarias)
AAD-2	2,4-D	423 (±1)	0,86	2,03
AAD-1 (v1)	2,4-D	97 (±21)	0,11	1,16

Notas: Los ensayos se realizaron en MOPS pH 6,75 + α-cetoglutarato 1 mM + ascorbato de Na 0,1 mM + Fe^{2+} 0,1 mM y los fenoles colorimétricamente liberados detectados usando 4-aminoantipirina/ferricianuro.

17.4 – Evaluación de *Arabidopsis* transformada.

Se dejaron secar semillas T_1 recién cosechadas transformadas con un gen nativo [*AAD-1 (v2)*], optimizado en la planta [*AAD-1 (v3)*], o *AAD-2 (v1)* nativo, durante 7 días a temperatura ambiente. Las semillas T_1 se sembraron en bandejas de germinación de 26,5 x 51 cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), recibiendo cada una alícuotas de 200 mg de semillas T_1 estratificadas (~10.000 semillas) que se habían suspendido anteriormente en 40 ml de solución de agarosa al 0,1% y se almacenaron a 4°C durante 2 días para completar los requerimientos de latencia y asegurar la germinación sincrónica de las semillas.

Se cubrió Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) con vermiculita fina y se sub-irrigó con solución de Hoagland hasta humedecerse y se dejó drenar por gravedad. Cada alícuota de 40 ml de semilla estratificada se sembró en forma pareja sobre la vermiculita con una pipeta y se cubrió con domos de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4-5 días. Se retiraron las cúpulas 1 día antes de la selección inicial del transformante usando aerosol de post-emergencia de glufosinato (selección del gen *PAT* co-transformado).

Cinco a seis días después de la plantación (DAP, siglas en inglés) y nuevamente 10 DAP, las plantas T_1 (etapa de cotiledones y 2-4 hojas, respectivamente) se asperjaron con una solución al 0,2% de herbicida Liberty (200 g ai/l de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) a un volumen de aspersión de 10 ml/bandeja (703 l/ha) usando una punta de aspersión de aire comprimido DeVilbiss para aplicar una tasa efectiva de 280 g ia/ha de glufosinato por aplicación. Las sobrevivientes (plantas que crecían en forma activa) se identificaron 5-7 días después de la aspersión final y se transplantaron individualmente en potes de 3 pulgadas preparados con medio para potes (Metro Mix 360). Las plantas transplantadas se cubrieron con

domos de humedad durante 3-4 días y se colocaron en una cámara para cultivo a 22°C como antes. Posteriormente se retiraron las cúpulas y las plantas se movieron al invernadero (22±5°C, 50±30% HR, 14 horas de luz: 10 de oscuridad, mínimo 500 $\mu E/m^2s^1$ natural + luz suplementaria) por lo menos 1 día antes de la prueba de la capacidad de *AAD-1 (v3)*, *AAD-1 (v2)* o *AAD-2 (v1)* de proveer resistencia al herbicida tipo fenoxi auxina.

Se confirmaron las plantas individuales T_1 seleccionadas al azar por su resistencia al glufosinato para la expresión de la proteína PAT usando un kit PAT ELISA (Parte no. 7000045, Strategic Diagnostics, Inc., Newark, DE), para confirmar de un modo no destructivo la fidelidad del proceso de selección (protocolo del fabricante). Luego se asignaron las plantas en forma aleatoria a varias proporciones de 2,4-D (50-800 g ea/ha).

Las aplicaciones de herbicida se efectuaron por aspersor de bandeja en un volumen de aspersión de 187 l/ha. El 2,4-D fue la formulación de sal de dimetilamina comercial (456 g ae/l, NuFarm, St Joseph, MO) mezclada en buffer de Tris 200 mM (pH 9,0).

17.5 – Resultados de la selección de plantas transformadas.

Las primeras transformaciones con *Arabidopsis* se condujeron usando *AAD-1 (v3)*. Los transformantes T_1 se eligieron primero del fondo de semillas no transformadas usando un esquema de selección de glufosinato. Se seleccionaron más de 400.000 semillas T_1 y se identificaron 493 plantas resistentes al glufosinato (gen *PAT*), que equivalen a una frecuencia de transformación/selección de 0,12%. Dependiendo del lote de semillas evaluadas, esta varió de 0,05-0,23% (ver **Tabla 15** en el Ejemplo 6.5 anterior). Además se seleccionó un pequeño lote de semillas transformadas con *AAD-1 (v2)* nativo usando el agente de selección glufosinato. Se identificaron doscientos setenta y ocho individuos T_1 resistentes al glufosinato de 84.000

semillas evaluadas (frecuencia de transformación/selección 0,33%). De manera sorprendente, las transformaciones de *Arabidopsis* usando el gen *AAD-2(v1)* nativo suministraron una muy baja frecuencia de transformación cuando se evaluaron para determinar la tolerancia al glufosinato (función del marcador seleccionable *PAT*). Aproximadamente se han evaluado 1,3 millones de semillas y sólo 228 transformantes de glufosinato se recuperaron, lo que equivale a una frecuencia de transformación/selección del 0,018% (ver **Tabla 15**). La frecuencia de transformación para *AAD-2 (v1)* nativo fue sólo del 6% de la del *AAD-1 (v2)* nativo. El gen *AAD2 (v1)* nativo se optimizó posteriormente en forma sintética, se clonó y se transformó como pDAB3705, en Arabidopsis usando métodos descritos anteriormente (ver Ejemplo 5). El *AAD2 (v2)* optimizado en la planta (SEC ID NO: 29, que codifica la SEC ID NO: 30) produjo una frecuencia de selección de *Arabidopsis* de T_1 normal usando herbicida Liberty de aproximadamente 0,11% (ver **Tabla 15**).

Las plantas T_1 seleccionadas anteriormente se trasplantaron posteriormente a potes individuales y se asperjaron con varias dosis de herbicidas de ariloxialcanoato comerciales. La **Tabla 16** (en el Ejemplo 6.5 anterior) compara la respuesta de los genes *AAD-1 (v2)*, *AAD-1 (v3)*, *AAD-2 (v1) y AAD-1(v2)* al impartir resistencia al 2,4-D a los transformantes T_1 de *Arabidopsis*. Todos los genes proporcionaron realmente cierta resistencia significativa al 2,4-D versus las líneas de control transformadas y no transformadas; sin embargo, las construcciones individuales fueron altamente variables en su capacidad de impartir resistencia al 2,4-D a plantas T_1 de *Arabidopsis* individuales. Dentro de un tratamiento determinado, el nivel de respuesta de la planta varió ampliamente y puede atribuirse al hecho de que cada planta representa un evento de transformación independiente. Es importante observar que, en cada dosis de 2,4-D evaluado, hubo individuos

que no se vieron afectados mientras que algunos se afectaron en forma severa. Se presenta un promedio de lesiones en la población global por índice en la **Tabla 16** simplemente para demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con *AAD-1 (v2)*, *AAD-1 (v3)*, *AAD-2 (v1)* o *AAD-2 (v2)* versus los controles transformados con *PAT/Cry1F* o de tipo salvaje.

De manera sorprendente, los transformantes de *AAD-2 (v1)* fueron mucho menos resistentes al 2,4-D que los genes *AAD-1 (v2)* o *AAD-1* (v3) (**Tabla 16**) tanto a partir de la frecuencia de plantas altamente tolerantes como también del promedio global de lesiones. Ninguna planta transformada con *AAD-2 (v1)* sobrevivió a 200 g de ea/ha de 2,4-D relativamente sin lesiones (<20% de lesiones visuales), y el daño general de la población fue de aproximadamente el 83%. Por el contrario, 56% (45 de 80) de plantas T_1 transformadas con *AAD-1 (v2)* sobrevivieron a 200 g de ea/ha de 2,4-D sin lesiones (promedio de lesiones de la población = 34%), y >73% (11 de 15) de plantas T_1 de *AAD-1 (v3)* no tuvieron lesiones (promedio de lesiones de la población = 14%). *Ver* **Figura 20.** La tolerancia mejoró levemente para *AAD2 (v2)* optimizado en la planta versus el gen nativo; sin embargo, la comparación de ambos genes *AAD-1* y *-2* optimizados en la planta indica un promedio significativo para *AAD-1 (v3) in planta* (ver **Tabla 16**).

Estos resultados son inesperados dado que la comparación *in vitro* de AAD-1 (v2) y AAD-2 (v1) nativos indicó que el 2,4-D se degradaba mejor por AAD-2 (v1). AAD-2 (v1) se expresa en plantas T_1 individuales hasta niveles variables con el tamaño anticipado; sin embargo, se produce poca protección frente al 2,4-D por esta proteína expresada. Existe poca correlación entre el nivel de expresión observado en la transferencia Western y el nivel de lesión por 2,4-D en las mismas plantas. Ver **Figura 21**. No hubo ninguna diferencia significativa evidente en el nivel de expresión de las proteínas (*in planta)* para

411

los genes *AAD-2* nativos y optimizados en la planta. Estos datos corroboran hallazgos anteriores que hacen que la expresión funcional de AAD-1 (v3) *in planta* para impartir resistencia a los herbicidas 2,4-D y AOPP sea inesperada.

Ejemplo 18 – Aplicaciones para Quemado de Pre-plantas

Este y los Ejemplos que siguen son ejemplos específicos de nuevos usos herbicidas hechos posibles por la presente invención de AAD-1.

Las aplicaciones herbicidas de quemado de pre-plantas pretenden matar las malezas que han emergido durante el invierno o a principios de la primavera antes de plantar un cultivo determinado. Normalmente estas aplicaciones se aplican en sistemas de manejo con agricultura reducida o sin agricultura donde la eliminación física de las malezas no se completa antes de la plantación. Un programa herbicida, por lo tanto, debe controlar un espectro muy amplio de malezas de hoja ancha y gramíneas presentes en el momento de la plantación. El glifosato, la gramoxona y el glufosinato son ejemplos de herbicidas no selectivos, no residuales ampliamente usados para aplicaciones herbicidas para el quemado de pre-plantas. Algunas malezas, sin embargo, son difíciles de controlar en este momento de la estación debido a uno o más de los siguientes hechos: insensibilidad inherente de las especies de malezas o biotipo al herbicida, tamaño relativamente grande de malezas anuales del invierno, y condiciones de clima frío que limitan la captación y la actividad del herbicida. Se encuentran disponibles varias opciones herbicidas para mezclar en tanque con estos herbicidas para aumentar el espectro y la actividad sobre las malezas donde los herbicidas no selectivos son débiles. Un ejemplo serían las aplicaciones para mezcla en tanque de 2,4-D con glifosato para ayudar en el control de *Conyza canadensis* (erigerón de Canadá). El glifosato puede usarse desde 420 hasta 1680 g ea/ha, más normalmente 560 a 840 g ea/ha, para el control por quemado de pre-plantas de la mayoría de las malezas

presentes, 280 – 1120 g ea/ha de 2,4-D pueden aplicarse para ayudar en el control de muchas especies de malezas de hoja ancha (*por ej.*, maleza doméstica). El 2,4-D es un herbicida de elección ya que es efectivo sobre un rango muy amplio de malezas de hoja ancha, efectvo incluso a bajas temperaturas y es extremadamente económico. Sin embargo, si la cosecha posterior es una cosecha dicotiledónea sensible, los residuos de 2,4-D en el suelo (a pesar de su escasa vida útil) pueden producir un impacto negativo sobre el cultivo. La soja es un cultivo sensible y requiere un período de tiempo mínimo de 7 días (para un índice de 280 g ea/ha de 2,4-D) a por lo menos 30 días (para aplicaciones de 2,4-D de 1120 g ea/ha) entre las aplicaciones de quemado y la plantación. El 2,4-D está prohibido como tratamiento para quemado antes de la plantación de algodón (ver rótulos federales, la mayoría se encuentran disponibles a través de CPR, 2003 o en Internet en cdms.net/manuf/manuf.asp). Con el algodón o soja transformados con *AAD-1 (v3)*, estos cultivos deben tener la capacidad de sobrevivir a los residuos de 2,4-D en el suelo a partir de las aplicaciones para quemado aplicadas hasta el momento, e incluso después, de la plantación antes del surgimiento del cultivo. La mayor flexibilidad y el reducido costo de los compañeros de mezclado en tanque (o premezcla comercial) mejorarán las opciones del control de las malezas y aumentarán la robustez de las aplicaciones de quemado en situaciones sin agricultura o con agricultura reducida. Este ejemplo es una de las muchas opciones que se encontrarán disponibles. Aquellas personas expertas en el arte del control de malezas observarán una variedad de otras aplicaciones incluyendo, sin carácter limitativo, gramoxona + 2,4-D o glufosinato + 2,4-D mediante el uso de productos descritos en rótulos herbicidas federales (CPR, 2003) y usos descritos en Agriliance Crop Protection Guide (2003), como ejemplos. Aquellas personas expertas en el

413

arte reconocerán además que el ejemplo anterior puede aplicarse a cualquier cultivo sensible al 2,4-D (u otro herbicida tipo fenoxi auxina) que se protegería con el gen *AAD-1* (v3) si está transformado de manera estable.

Ejemplo 19 – Uso en cultivo de Herbicidas tipo fenoxi auxinas en Soja, Algodón, y otros cultivos dicotoledóneos transformados sólo con *AAD-1 (v3)*

AAD-1 (v3) puede permitir el uso de un herbicida tipo fenoxi auxina (*por ej.*, 2,4-D, dichlorprop, MCPA, *et al.*) para el control de un amplio espectro de malezas de hoja ancha en forma directa en cultivos normalmente sensibles a 2,4-D. La aplicación de 2,4-D a 280 hasta 2240 g ae/ha controlaría la mayoría de las especies de maleza de hoja ancha presentes en ambientes agronómicos. Más normalmente, se usa 560 – 1120 g ae/ha. Para un control completo del sistema de malezas, deben controlarse las malezas gramíneas. Una variedad de herbicidas graminicidas de amplio espectro, incluyendo sin carácter limitativo haloxyfop, quizalofop, fenoxaprop, fluazifop, sethoxidim, y clethodim se encuentran registrados actualmente para usar en la mayoría de los cultivos dicotiledóneos que naturalmente son tolerantes a estos herbicidas. Una combinación de quizalofop (20 – 100 g ae/ha) más 2,4-D (420 – 840 g ae/ha) podría proveer dos modos de acción del herbicida en un cultivo dicotiledóneo transformado con *AAD-1 (v3)* (*es decir*, soja o algodón) que controlaría la mayoría de las malezas agronómicas en un modo similar al glifosato en cultivos tolerantes al glifosato (ver espectros de control de las malezas como referencia a las clasificaciones de rendimiento de Agriliance Crop Protection Guide).

Una ventaja para esta herramienta adicional es el costo extremadamente bajo del componente herbicida de hoja ancha y el potencial control residual de las malezas de corta vida útil provisto por índices más altos de 2,4-D y/o herbicidas tipo AOPP cuando se usan a índices más elevados, mientras que un

herbicida no residual como el glifosato no proveería control de las malezas que germinarían más tarde. Esta herramienta provee, además, un mecanismo para rotar los modos de acción del herbicida con la conveniencia de HTC como resistencia al herbicida integrado y estrategia de manejo cambiante de las malezas en una estrategia de rotación de HTC de un cultivo tolerante al glifosato *IAAD-1 (v3)*, se roten o no las especies de cultivos. Además, los componentes de control de malezas gramíneas y de hoja ancha de este sistema son independientes entre sí, de este modo permitiendo que una persona experta en el arte del control de las malezas determine la relación más eficaz y efectiva económicamente del herbicida con auxina y AOPP. Por ejemplo, si las malezas de hoja ancha fueran las únicas malezas significativas presentes cuando se necesitan aplicaciones herbicidas, una aplicación de herbicida de 560 a 1120 g ae/ha 2,4-D podría realizarse sin otro herbicida. Esto reduciría las aplicaciones de herbicida innecesarias, proveería flexibilidad para reducir los costros de entrada y reduciría las cargas ambientales de los plaguicidas, y reduciría la presión de selección innecesaria para el desarrollo de malezas resistentes a los herbicidas.

Los beneficios adicionales podrían incluir tolerancia al cambio de 2,4-D o volatilización como mecanismos de lesión fuera del sitio por 2,4-D a cultivos dicotiledóneos; ningún intervalo requerido antes de la plantación luego de la aplicación de 2,4-D (ver ejemplo anterior); y menos problemas a partir de la lesión por contaminación de cultivos dicotiledóneos que surgen de tanques a granel limpiados en forma incompleta que habían contenido 2,4-D. Dicamba (y otros herbicidas) pueden usarse, incluso, para el control posterior de voluntarios de cultivos dicotiledóneos transformados con *AAD-1 (v3)*.

Aquellas personas expertas en el arte reconocerán además que el ejemplo anterior puede apicarse sólo a cualquier cultivo sensible a 2,4-D (u otro

415

herbicida de fenoxi auxina) que se protegería con el gen *AAD-1* (v3) si está transformado de manera estable. Una persona con experiencia en el arte del control de las malezas reconocerá ahora que el uso de varios herbicidas de fenoxi auxina comerciales solos o combinados con cualquier herbicida tipo AOPP comercial tiene la posibilidad de transformación con *AAD-1 (v3)*. Los índices específicos de otros herbicidas representativos de estas químicas pueden determinarse mediante los rótulos de herbicidas compilados en el libro de la CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar o cualquier referencia comercial o académica sobre protección de cultivos tal como la Crop Protection Guide de Agriliance (2003). Cada herbicida alternativo útil para usar en HTCs por *AAD-1 (v3)*, ya sea si se usa solo, mezclado en tanque o en forma secuencial, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 20 - Uso en cultivo de Fenoxi auxinas y Herbicidas tipo AOPP en Maíz, Arroz, y otras especies monocotiledóneas sólo transformadas con *AAD-1 (v3)*

De un modo análogo, la transformación de especies de pastos (tales como, sin carácter limitativo, maíz, arroz, trigo, cebada, o césped y pastos) con *AAD-1 (v3)* permitiría el uso de graminicidas de AOPP altamente eficaces en cultivos normalmente sensibles a estos herbicidas. La mayoría de las especies de pastos tienen una tolerancia natural a los herbicidas auxínicos tales como las fenoxi auxinas (es decir, 2,4-D, dichlorprop, et al.). Sin embargo, un nivel relativamente bajo de selectividad del cultivo ha generado una utilidad reducida en estos cultivos debido a una ventana acortada de tiempo de aplicación y malezas de hoja ancha alternativas. Los cultivos de monocotiledóneas transformados con *AAD-1 (v3)* permitirían, por consiguiente, el uso de una combinación similar de tratamientos descritos para cultivos dicotiledóneos tales como la aplicación de 2,4-D a 280 hasta 2240 g ae/ha para controlar la mayoría

de las especies de malezas de hoja ancha. Más normalmente, se usaría 560 – 1120 g ae/ha. Una variedad de herbicidas graminicidas tipo AOPP de amplio espectro (incluyendo sin carácter limitativo haloxyfop, quizalofop, fenoxaprop, y fluazifop) podría utilizarse para controlar efectivamente una amplia selección de malezas gramíneas. Los herbicidas graminicidas con ciclohexandiona como setoxidim, cletodim, *et al.* no podrían utilizarse en este sistema como se muestra para los cultivos de dicotiledóneas dado que AAD-1 no podría protegerlos de esta química, y los cultivos de césped serán naturalmente sensibles a las químicas de la ciclohexandiona. Sin embargo, este atributo podría permitir el uso de herbicidas con ciclohexandiona para el control posterior de voluntarios de cultivo de pasto transformado con *AAD-1 (v3)*. Ahora se permiten estrategias similares de control de las malezas con el uso de AAD-1 para las especies de cultivos dicotiledóneos. Una combinación de quizalofop (20 – 100 g ae/ha) más 2,4-D (420 – 840 g ae/ha) podría proveer dos modos de acción del herbicida en un cultivo monocotiledóneo transformado con *AAD-1 (v3)* (*por ej.*, maiz y arroz) que controlaría la mayoría de las malezas agronómicas en un modo similar al glifosato en cultivos tolerantes al glifosato (ver espectros de control de las malezas como referencia a las clasificaciones de rendimiento de la Agriliance Crop Protection Guide).

Una ventaja para esta herramienta adicional es el costo extremadamente bajo del componente herbicida de hoja ancha y el control residual de corta vida útil potencial de las malezas provisto por índices más altos de 2,4-D y/o herbicidas tipo AOPP cuando se usan en índices más altos. En contraste, un herbicida no residual como el glifosato no proveería ningún control de las malezas que germinaran más tarde. Esta herramienta proveería además un mecanismo para rotar los modos de acción del herbicida con la conveniencia de HTC como estrategia de resistencia integrada al herbicida y manejo de

cambios de las malezas en una estrategia de rotación de HTC en cultivos tolerantes al glifosato *IAAD-1 (v3)*, se roten las especies de cultivos o no. Además, los componentes de control de las malezas gramíneas y de hoja ancha de este sistema son independientes entre sí, permitiendo de este modo que una persona experta en el arte del control de las malezas determine la relación más eficaz y efectiva económicamente de herbicida de auxina y AOPP. Por ejemplo, si las malezas de hoja ancha fueran las únicas malezas significativas presentes cuando se necesitan aplicaciones de herbicidas, una aplicación de herbicida de 560 a 1120 g ae/ha 2,4-D podría realizarse sin otro herbicida. Esto reduciría las aplicaciones herbicidas innecesarias, proveería flexibilidad para reducir los costos de entrada y reducirían las cargas para el medio ambiente de los plaguicidas, y reduciría la presión de selección innecesaria para el desarrollo de malezas resistentes a los herbicidas. La mayor tolerancia del maíz, y otras monocotiledóneas a las fenoxi auxinas permitiría el uso de estos herbicidas en restricciones de la etapa de cultivo sin crecimiento o el potencial de inclinación, fenómenos de despliegue como "la cola de rata", la inclinación de los cultivos, debilidad del tallo inducida por el regulador del crecimiento en el maíz, y raíces deformadas.

Aquellas personas expertas en el arte reconocerán ahora que el ejemplo anterior puede aplicarse a cualquier cultivo monocotiledóneo que podría protegerse con el gen *AAD-1* (v3) de las lesiones provocadas por cualquier herbicida tipo AOPP. Una persona con experiencia en el arte del control de las malezas reconocerá ahora que el uso de varios herbicidas de fenoxi auxina comerciales solos o combinados con cualquier herbicida tipo AOPP comercial tienen la posibilidad de transformación con *AAD-1 (v3)*. Los índices específicos de otros herbicidas representativos de estas químicas pueden determinarse mediante los rótulos de herbicidas compilados en el libro de la CPR (Crop

Protection Reference) o compilación similar, rótulos compilados por internet (*por ej.*, cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía comercial o académica referida a la protección de cultivos tales como the Crop Protection Guide from Agriliance (2003). Cada herbicida alternativo útil para usar en HTCs por *AAD-1 (v3)*, ya sea si se usa solo, mezclado en tanque o en forma secuencial, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 21 – *AAD-1 (v3)* Apilada con Rasgo de Tolerancia al Glifosato en cualquier cultivo

La amplia mayoría de los acres de algodón, canola, y soja plantados en Norteamérica contienen un rasgo de tolerancia al glifosato (TG), y la adopción del maiz TG continúa en aumento. Cultivos TG adicionales (*por ej.*, trigo, arroz, remolacha, y césped) se han encontrado en desarrollo pero no se han liberado comercialmente hasta la fecha. Muchas otras especies resistentes al glifosato se encuentran en etapa experimental para desarrollo (por ej., alfalfa, caña de azúcar, girasol, remolachas, arvejas, zanahoria, pepino, lechuga, cebolla, frutilla, Tomate, y tabaco; especies de silvicultura como álamo y liquidámbar; y especies horticolas como caléndula, petunia, y begonias; isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005 en Internet). Los TGC son herramientas valiosas para la inmensa amplitud de malezas controladas y la conveniencia y efectividad económica provistos por este sistema. Sin embargo, la utilidad del glifosato como tratamiento base ahora estándar se selecciona para malezas resistentes al glifosato. Además, las malezas sobre las cuales el glifosato es inherentemente menos eficaz cambian a las especies predominantes en los campos en los cuales se practican programas químicos sólo con glifosato. Al aplicar *AAD-1 (v3)* con un rasto TG, ya sea a través de cultivo convencional o en forma conjunta como nuevo evento de transformación, la eficacia en el control de las malezas, flexibilidad y capacidad de manejar cambios de las

malezas y el desarrollo de resistencia a los herbicidas podrían mejorarse. Como se mencionó en ejemplos anteriores, mediante la transformación de cultivos con *AAD-1 (v3)*, se pueden aplicar selectivamente los herbicidas tipo AOPP en cultivos de monocotiledóneas, cultivos de monocotiledóneas que tienen un margen más alto de seguridad contra la fenoxi auxina, y las fenoxi auxinas pueden aplicarse en forma selectiva en los cultivos dicotiledóneos. Pueden observarse varios escenarios para el control mejorado de las malezas en los cuales *AAD-1 (v3)* y un rasgo TG se adosan en cualquier especie de cultivo monocotiledónea o dicotiledónea:

a) El glifosato puede aplicarse a un índice de aplicación post-emergente estándar (420 a 2160 g ae/ha, con preferencia 560 a 840 g ae/ha) para el control de la mayoría de las especies de malezas gramíneas y de hoja ancha. Para el control de malezas de hoja ancha resistentes al glifosato como *Conyza canadensis o* malezas inherentemente difíciles de controlar con glifosato (*por ej.*, *Commelina* spp), puede aplicarse 280-2240 g ae/ha (con preferencia 560-1120 g ae/ha) de 2,4-D en forma secuencial, mezclada en tanque, o como premezcla con glifosato para proveer un control efectivo.

b) El glifosato puede aplicarse a un índice de aplicación post-emergente estándar (420 a 2160 g ae/ha, con preferencia 560 a 840 g ae/ha) para el control de la mayoría de las especies de malezas gramíneas y de hoja ancha. Para el control de especies de plantas resistentes al glifosato como *Lolium rigidum o Eleusine indica*, 10-200 g ae/ha (con preferencia 20-100 g ae/ha) puede aplicarse quizalofop en forma secuencial, mezclada en tanque, o como premezcla con glifosato para proveer un control efectivo.

c) Actualmente, los índices de glifosato aplicados en TGC varían generalmente desde 560 hasta 2240 g ae/ha por programa de aplicación. El glifosato es por mucho más eficaz sobre las especies de malezas gramíneas

que sobre las especies de hoja ancha. Los rasgos de *AAD-1 (v3)* + TG permitirían índices efectivos para gramíneas de glifosato (105-840 g ae/ha, con mayor preferencia 210-420 g ae/ha). Luego podría aplicarse 2,4-D (a 280-2240 g ae/ha, con mayor preferencia 560-1120 g ae/ha) en forma secuencial, mezclada en tanque, o como premezcla con índices efectivos para gramíneas de glifosato para proveer el control necesario de las malezas de hoja ancha. Un herbicida tipo AOPP como quizalofop a 10-200 g ae/ha (con preferencia 20-100 g ae/ha y con mayor preferencia 20-35 g ae/ha), podría usarse para el control de las malezas gramíneas más robustas y/o para demorar el desarrollo de pastos resistentes al glifosato. El bajo índice de glifosato también proveería cierto beneficio para el control de las malezas de hoja ancha; sin embargo, el control primario sería a partir del 2,4-D.

Una persona con experiencia en el arte del control de las malezas reconocerá que el uso de uno o más herbicidas tipo fenoxi auxinas comerciales solos o combinados (en forma secuencial o en forma independiente) con uno o más herbicidas tipo AOPP comerciales tiene la posibilidad de transformación con *AAD-1 (v3)* en los cultivos. Los índices específicos de otros herbicidas representativos de estas químicas pueden determinarse mediante los rótulos de herbicidas compilados en el libro de la CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, rótulos compilados por internet (*por ej.*, cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía comercial o académica referida a la protección de cultivos tales como the Crop Protection Guide from Agriliance (2003). Cada herbicida alternativo útil para usar en HTCs por *AAD-1 (v3)*, ya sea si se usa solo, mezclado en tanque o en forma secuencial, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 22 - *AAD-1 (v3)* Apilada con Rasgo de tolerancia al glufosinato en cualquier cultivo

La tolerancia al glufosinato (*PAT o bar*) está actualmente presente en una cantidad de cultivos plantados en Norteamérica ya sea como marcador seleccionable para un rasgo de entrada como proteínas de resistencia a los insectos o específicamente como un rasgo HTC. Los cultivos incluyen, sin carácter limitativo, canola, maíz, y algodón tolerante al glufosinato. Cultivos adicionales tolerantes al glufosinato (*por ej.*, arroz, remolacha, soja, y césped) se han encontrado en desarrollo pero no se han liberado comercialmente hasta la fecha. El glufosinato, como el glifosato, es un herbicida relativamente no selectivo, de amplio espectro para gramíneas y hojas anchas. El modo de acción del glufosinato difiere del glifosato. Actúa más rápido, produciendo la desecación y "quemado" de las hojas tratadas 24-48 horas después de la aplicación del herbicida. Esto resulta ventajoso para el aspecto del rápido control de las malezas. Sin embargo, esto también limita la translocación del glufosinato a regiones meristemáticas de plantas blanco que producen un escaso control de las malezas como lo evidencian las clasificaciones de rendimiento del control relativo de las malezas de los dos compuestos en muchas especies (Agriliance, 2003).

Al agregar *AAD-1 (v3)* con un rasgo de tolerancia al glufosinato, ya sea por sembrado convencional o en forma conjunta como un nuevo evento de transformación, podría mejorarse la eficacia en el control de las malezas, flexibilidad, y posibilidad de manejar los cambios de las malezas y desarrollo de resistencia al herbicida. Como se mencionó en ejemplos anteriores, al transformar los cultivos con *AAD-1 (v3)*, se puede aplicar selectivamente herbicidas tipo AOPP en cultivos de monocotiledóneas, los cultivos de monocotiledóneas tendrán un margen más elevado de seguridad a la fenoxi auxina, y pueden aplicarse fenoxi auxinas en forma selectiva en los cultivos dicotiledóneos. Pueden preverse varios escenarios para opciones

mejoradasdel control de las malezas en los cuales *AAD-1 (v3)* y un rasgo de tolerancia al glufosinato se agregan en cualquier especie de cultivo monocotiledónea o dicotiledónea:

a) El glufosinato puede aplicarse a un índice de aplicación post-emergente estándar (200 a 1700 g ae/ha, con preferencia 350 to 500 g ae/ha) para el control de muchas especies de malezas gramíneas y de hoja ancha. Hasta la fecha, no se han confirmado malezas resistentes al glufosinato; sin embargo, el glufosinato tiene un número mayor de malezas que son inherentemente más tolerantes que el glifosato.

i) Las especies de malezas del césped inherentemente tolerantes (por ej., *Echinochloa spp* o *Sorghum spp*) podrían controlarse por mezclado en tanque de 10-200 g ae/ha (con preferencia 20-100 g ae/ha) de quizalofop.

ii) Las especies de malezas de hoja ancha inherentemente tolerantes (por ej., *Cirsium arvensis* y *Apocynum cannabinum*) podrían controlarse mezclando en tanque 280-2240 g ae/ha, con mayor preferencia 560-2240 g ae/ha, 2,4-D para el control efectivo de estas especies más perennes más difíciles de controlar y para mejorar la robustez del control en las especies de maleza de hoja ancha anuales.

b) Una combinación de tres vias de glufosinato (200-500 g ae/ha) + 2,4-D (280-1120 g ae/ha) + quizalofop (10-100 g ae/ha), por ejemplo, podría proveer un control más robusto, superpuesto del espectro de las malezas. Adicionalmente, el espectro superpuesto provee un mecanismo adicional para el manejo o el retraso de las malezas resistentes a los herbicidas.

Una persona con experiencia en el arte del control de las malezas reconocerá que el uso de uno o más herbicidas tipo fenoxi auxinas comerciales solos o combinados (en forma secuencial o en forma independiente) con uno o más herbicidas tipo AOPP comerciales tiene la posibilidad de *AAD-1 (v3)*

transformación en los cultivos. Los índices específicos de otros herbicidas representativos de estas químicas pueden determinarse mediante los rótulos de herbicidas compilados en el libro de la CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, rótulos compilados por internet (*por ej.*, cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía comercial o académica referida a la protección de cultivos tales como the Crop Protection Guide from Agriliance (2003). Cada herbicida alternativo útil para usar en HTCs por *AAD-1 (v3)*, ya sea si se usa solo, mezclado en tanque o en forma secuencial, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 23 - *AAD-1 (v3)* apilada con rasgo *AHAS* en cualquier cultivo

La tolerancia a los herbicidas de imidazolinona (*AHAS, et al.*) está actualmente presente en una cantidad de cultivos plantados en Norteamérica incluyendo, sin carácter limitativo, maíz, arroz, y trigo. Cultivos adicionales tolerantes a la imidazolinona (*por ej.*, algodón y remolacha) se han encontrado en desarrollo pero no se han liberado comercialmente hasta la fecha. Muchos herbicidas de imidazolinona (*por ej.*, imazamox, imazethapyr, imazaquin, e imazapic) se usan actualmente en forma selectiva en varias cosechas convencionales. El uso de imazetapir, imazamox, y el imazapir no selectivo se ha permitido a través de rasgos de tolerancia a la imidazolinona como *AHAS et al.* Los HTC tolerantes a la imidazolinona hasta la fecha tienen la ventaja de ser no transgénicos. Esta clase química también tiene una actividad residual en el suelo significativa, siendo de este modo capaz de proveer control de las malezas extendidas 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 de glifosato (Agriliance, 2003). Adicionalmente, los herbicidas de imidazolinona tienen un modo de acción (inhibición de acetolactato sintasa,

ALS) al cual muchas malezas han desarrollado resistencia (Heap, 2004). Al apilar *AAD-1 (v3)* con un rasgo de tolerancia a la imidazolinona, ya sea por sembrado convencional o en forma conjunta como un nuevo evento de transformación, eficacia en el control de las malezas, flexibilidad, y posibilidad de manejar los cambios de las malezas y desarrollo de resistencia al herbicida podría mejorarse. Como se mencionó en ejemplos anteriores, al transformar los cultivos con *AAD-1 (v3)*, se pueden aplicar selectivamente herbicidas tipo AOPP en cultivos de monocotiledóneas, los cultivos de monocotiledóneas tendrán un margen más elevado de seguridad a la fenoxi auxina, y pueden aplicarse fenoxi auxinas en forma selectiva en los cultivos dicotiledóneos. Pueden preverse varios escenarios para opciones mejoradas del control de las malezas en los cuales *AAD-1 (v3)* y un rasgo de tolerancia a la imidazolinona se agregan en cualquier especie de cultivo monocotiledónea o dicotiledónea:

a) Puede aplicarse imazetapir a un índice de aplicación post-emergente estándar de (35 a 280 g ae/ha, con preferencia 70-140 g ae/ha) para el control de muchas especies de malezas gramíneas y de hoja ancha.

i) Las malezas de hoja ancha resistentes al inhibidor de ALS como *Amaranthus rudis, Ambrosia trifida, Chenopodium album* (entre otras, Heap, 2004) podrían controlarse mezclando en tanque 280-2240 g ae/ha, con mayor preferencia 560-1120 g ae/ha, de 2,4-D.

ii) Las especies de hoja ancha inherentemente más tolerantes a los herbicidas de imidazolinona como *Ipomoea spp.* pueden controlarse, también, mezclando en tanque 280-2240 g ae/ha, con mayor preferencia 560-1120 g ae/ha, de 2,4-D.

iii) Las malezas de pastos resistentes al inhibidor de ALS como *Sorghum halepense* y *Lolium* spp. pueden controlarse mezclando en tanque 10-200 g ae/ha (con preferencia 20-100 g ae/ha) de quizalofop.

425

iv) Las especies de malezas gramíneas inherentemente más tolerantes (por ej., *Agropyron repens*) podrían controlarse también mezclando en tanque 10-200 g ae/ha (con preferencia 20-100 g ae/ha) de quizalofop.

b) Una combinación triple de imazetapir (35 to 280 g ae/ha, con preferencia 70-140 g ae/ha) + 2,4-D (280-1120 g ae/ha) + quizalofop (10-100 g ae/ha), por ejemplo, podría proveer un control más robusto, superpuesto del espectro de las malezas. Adicionalmente, el espectro superpuesto provee un mecanismo adicional para el manejo o el retraso de malezas resistentes a los herbicidas.

Una persona con experiencia en el arte del control de las malezas reconocerá que el uso de cualquiera de varios herbicidas de imidazolinona, herbicidas de fenoxi auxina, o herbicidas tipo AOPP comerciales, solos o en combinaciones múltiples, tiene la posibilidad de transformación con *AAD-1 (v3)* y apilamiento con cualquier rasgo de tolerancia a la imidazolinona ya sea por mejoramiento convencional o por manipulación genética. Los índices específicos de otros herbicidas representativos de estos tipos químicos pueden determinarse mediante los rótulos de herbicidas compilados en el libro de la CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, rótulos compilados por internet (*por ej.*, cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía comercial o académica referida a la protección de cultivos tales como la Crop Protection Guide de Agriliance (2003). Cada herbicida alternativo útil para usar en HTCs por *AAD-1 (v3)*, ya sea si se usa solo, mezclado en tanque o en forma secuencial, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 24 – *AAD-1 (v3)* en Arroz

24.1 – Descripción de los Medios.

Los medios de cultivo empleados se ajustaron a un pH 5,8 con KOH 1 M y se solidificaron con 2,5 g/l de Phytagel (Sigma). Se cultivaron callos

embriogénicos en cápsulas de Petri de 100 x 20 mm que contenían 40 ml de medio semisólido. Se cultivaron plantines de arroz en 50 ml de medio en cajas Magenta. Se mantuvieron las suspensiones celulares en matraces cónicos de 125 ml que contenían 35 ml de medio líquido y se rotaron a 125 rpm. La inducción y el manteniminto de los cultivos embriogénicos tuvo lugar en la oscuridad a 25–26°C, y la regeneración de la planta y la planta completa tuvo lugar en un periodo de luz de 16 h (Zhang *et al.* 1996).

La inducción y el mantenimiento del callo embriogénico tuvo lugar en medio basal de NB como se describió con anterioridad (Li *et al.* 1993), pero adaptado para contener 500 mg/l de glutamina. Los cultivos de suspensión se iniciaron y se mantuvieron en medio SZ líquido (Zhang *et al.* 1998) con la inclusión de 30 g/l de sacarosa en lugar de maltosa. El medio osmótico (NBO) consistía en medio NB con el agregado de 0,256 M, cada uno, de manitol y sorbitol. Se seleccionó el callo resistente a higromicina-B en medio NB suplementado con 50 mg/l de higromicina B durante 3–4 semanas. La pre-regeneración tuvo lugar en medio (PRH50) formado por medio NB sin ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), pero con el agregado de 2 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP), 1 mg/l de ácido α-naftalenacético (NAA), 5 mg/l de ácido abscísico (ABA) y 50 mg/l de higromicina B durante 1 semana. A la regeneración de los plantines le siguió el cultivo en medio de regeneración (RNH50) que comprendía medio NB sin 2,4-D, y suplementado con 3 mg/l de BAP, 0,5 mg/l de NAA, y 50 mg/l de higromicina B hasta que se regeneraron los brotes. Los brotes se transfirieron a medio de formación de raíces con la mitad de la concentración y sales basales de Murashige y Skoog y vitamina B5 de Gamborg, suplementado con 1% de sacarosa y 50 mg/l de higromicina B (1/2MSH50).

24.2 – Desarrollo del cultivo de tejido.

Se esterilizaron semillas desecadas maduras de *Oryza sativa* L. japonica cv. Taipei 309 como se describe en Zhang et al. 1996. Se indujeron tejidos embriogénicos por cultivo de semillas de arroz maduras estériles en medio NB en la oscuridad. El callo primario de aproximadamente 1 mm de diámetro, se retiró de la escútula y se usó para iniciar la suspensión celular en medio líquido SZ. Luego se mantuvieron las suspensiones como se describe en Zhang 1995. Se retiraron los tejidos embriogénicos derivados de la suspensión del cultivo líquido 3–5 días después del sub-cultivo anterior y se colocaron en medio osmótico de NBO para formar un círculo de aproximadamente 2,5 cm a lo ancho de una cápsula de petri y se cultivó durante 4 h antes del bombardeo. De dieciséis a 20 h después del bombardeo, se transfirieron los tejidos de medio NBO sobre medio de selección NBH50 de higromicina B, asegurando que la superficie bombardeada estuviera hacia arriba, y se incubaron en la oscuridad durante 14–17 días. Luego se separó el callo recién formado de los explantos bombardeadas originales y se colocaron cerca en el mismo medio. Luego de un adicional de 8–12 días, se identificó visualmente un callo opaco relativamente compacto, y se transfirió a medio de pre-regeneración PRH50 durante 7 días en la oscuridad. El callo en crecimiento, que se tornó más compacto y opaco, fue sub-cultivado luego sobre medio de regeneración de RNH50 durante un período de 14–21 días bajo un período de luz de 16 h. Los brotes de la regeneración se transfirieron a cajas Magenta que contenían ½ medio MSH50. Múltiples plantas regeneradas de un único explanto se consideran pares y se trataron como una línea de planta independiente. Una planta se clasificó como positiva respecto del gen hph si producía raíces blancas y gruesas y crecía vigorosamente en ½ medio MSH50. Una vez que los plantines habían alcanzado la parte alta de las cajas Magenta, se transfirieron al suelo en un pote de 6 cm con 100% de humedad durante una

semana, luego se movieron a una cámara de cultivo con un período de luz de 14 h luz a 30°C y en la oscuridad a 21°C durante 2–3 semanas antes de transplantarlos a potes de 13 cm en el invernadero. Se recolectaron las semillas y se secaron a 37°C durante una semana antes de almacenar a 4°C.

24.3 – Bombardeo de microproyectiles.

Todos los bombardeos se condujeron con el sistema Biolistic PDS-1000/He™ (Bio-Rad, Laboratories, Inc.). Se lavaron tres miligramos de partículas de oro de 1,0 micrón de diámetro una vez con etanol 100%, dos veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en 50 µl de agua en un tubo Eppendorf siliconado. Se agregaron cinco miligramos del ADN del plásmido que representaba una relación molar 1:6 de pDOW3303 (vector que contenía Hpt) a pDAB3403, 20 µl de espermidina (0,1 M) y 50 µl de cloruro de calcio (2,5 M) a la suspensión de oro. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min, se formaron pellets a 10000 rpm durante 10 s, se resuspendieron en 60 µl de etanol 100% frío y se distribuyeron 8–9 µl sobre cada microvehículo. Se bombardearon las muestras de tejido a 1100 psi y 27 pulgadas de Hg de vacío como se describe en el texto escrito por Zhang *et al.* (1996).

24.4 – Evaluación de la tolerancia.

Se asperjaron plantines de arroz en la etapa de 3-5 hojas con una solución al 0,3% (v/v) de Assure® II de DuPont™ que contenía concentrado de aceite para cultivo al 1% (v/v) Agridex usando un aspersor de bulbo DeVilbiss (atomizador de vidrio modelo 15-RD). Esta concentración corresponde a aproximadamente 140 g ae/ha. Se asperjó cada planta en una capucha de humo a una distancia de 8-12 pulgadas con 6 chorros llenos de aspersor dirigido de modo tal que se cubiera la planta entera con una porción igual de herbicida. Cada chorro aplicó aproximadamente 100 µl de solución al plantín.

Una vez asperjados, los plantines se dejaron secar durante una hora antes de sacarlos de la capucha de humo. La clasificación de severidad o resistencia se realizó a los 10-14 días luego del tratamiento (DLT) y se muestra en la **Tabla 35** a continuación.

Tabla 35.

Nombre de la muestra	140 g ae/ha de quizalofop
Control	Muerta
63-1A	Sin lesión
63-1F	Sin lesión
63-4B	Sin lesión
63-4D	Sin lesión
63-6C	Muerta

24.5 – Cosecha de tejido, aislamiento de ADN y cuantificación.

Se colocó tejido nuevo en tubos y se liofilizó a 4°C durante 2 días. Luego de que el tejido estuvo completamente seco, se colocó una perla de tungsteno (Valenite) en el tubo y se sometieron las muestras a 1 minuto de molienda en seco usando un molino de perlas Kelco. Luego se realizó el procedimiento de aislamiento de ADN estándar con DNeasy (Qiagen, Dneasy 69109). Luego se tiñó una alícuota de ADN extraído con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se realizó un barrido en el fluorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/µl.

24.6 – Análisis por transferencia Southern.

El análisis Southern se realizó con ADN total obtenido del kit Qiagen DNeasy. Se sometió un total de 2 µg de ADN a una digestión hasta la mañana siguiente de HindIII para pDAB3403 para obtener datos de integración. Del mismo modo se sometió un total de 2 ug de ADN a una digestión hasta la mañana siguiente de MfeI para obtener los datos de PTU. Luego de la digestión hasta la mañana siguiente se corrió una alícuota de ~100 ng sobre un

gel al 1% para asegurar la digestión completa. Luego de este aseguramiento, se corrieron las muestras sobre un gel de agarosa extenso al 0,85% hasta la mañana siguiente a 40 voltios. Luego se desnaturalizó el gel en NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. Luego se neutralizó el gel en Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M pH de 7,5 durante 30 minutos. Luego se configuró un aparato para gel que contenía 20 x SSC para obtener una transferencia del gel por gravedad a la membrana de nylon (Millipore INYC00010) hasta la mañana siguiente. Luego de la transferencia hasta la mañana siguiente se sometió la membrana a luz UV a través de un dispositivo de entrecruzamiento (Stratagene UV stratalinker 1800) a 1200 X100 microjoules. Luego se lavó la membrana en SDS 0,1%, 0,1 SSC durante 45 minutos. Luego del lavado de 45 minutos, se horneó la membrana durante 3 horas a 80°C y luego se almacenó a 4°C hasta la hibridación. El fragmento patrón para hibridación se preparó usando PCR de la región codificadora usando plásmido pDAB3404. Se usó un total de 100 ng de ADN total como patrón. Se usó 20mM de cada cebador con el kit Takara Ex Taq PCR Polymerase (Mirus TAKRR001A). Los cebadores para el fragmento Southern PCR AAD-1 fueron (Delantero - ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEC ID NO: 31) e (Inverso - GGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEC ID NO: 32). La reacción por PCR se llevó a cabo en el termociclizador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 45 segundos seguido de 72°C durante 10 minutos.

El producto se corrió sobre gel de agarosa al 1% y se separó, luego el gel se extrajo usando el procedimiento de extracción de gel Qiagen (28706). Luego se sometió la membrana a un paso de pre-hibridación a 60°C durante 1 hora en buffer Perfect Hyb (Sigma H7033). Se usó el procedimiento de reacción para rotulación con dCTP Prime it RmT (Stratagene 300392) para

431

desarrollar la sonda con 32 pb (Perkin Elmer). Se limpió la sonda usando las columnas Probe Quant. G50 (Amersham 27-5335-01). Se usaron recuentos de dos millones de CPM para hibridar los Southern blots hasta la mañana siguiente. Luego de la hibridación hasta la mañana siguiente se sometieron los blots a dos lavados de 20 minutos a 65°C en SDS 0,1%, 0,1 SSC. Luego se expusieron los blots a una pantalla de imagen fosforescente hasta la mañana siguiente y se realizó un barrido usando un escáner storm (MOLECULAR DEVICES). En la **Tabla 36** se presenta un resumen de los resultados.

Tabla 36. Resultados del Southern.

Evento	Datos de integración de Southern	Datos de PTU Southern
	Número de bandas	Tamaño esperado 3049 pb
63-1 A	8	sí, 7 bandas distintas
63-1 F	5	sí, 9 bandas distintas
63-4 A	20	sí, 20 bandas distintas
63-4 D	20	sí, 19 bandas distintas
63-6 C	2	Rendimiento de ADN insuficiente para ambos cortes

- Las plantas 63-1 A y 63-1 F no son el mismo evento; las plantas 63-4 A y 63-4 D son el mismo evento. Estos eventos tienen los PTU de tamaño esperado, pero son muy complejos. Estos datos de PTU de la transferencia Southern se correlacionan con los datos de expresión y los datos de aspersión. La muestra 63-6 C no tuvo suficiente ADN presente para realizar la integración y las transferencias southern PTU.

24.7 – Datos del análisis Western

La preparación de las muestras y las condiciones de análisis fueron como se describió con anterioridad. Se analizaron cinco líneas de arroz transgénico y 1 control no transgénico para determinar la expresión de AAD-1 usando ELISA y transferencia Western. Se detectó AAD-1 en cuatro líneas (63-1A, 63-1F, 63-4B y 63-4D) pero no en la línea 63-1C o la planta de control. Los

niveles de expresión variaron desde 15,6 hasta 183 ppm de proteína total soluble. Se presenta un resumen de los resultados en la **Tabla 37.**

Tabla 37.

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

Ejemplo 25 – Procedimientos de Transformación de Césped

La transformación genética, con *AAD-1 (v3)* sustituido para el gen "bar" como se describe a continuación, de pasto rastrero mediado por Agrobacterium tumefaciens pudo lograrse a través del callo embriogénico iniciado de semillas (cv. Penn-A-4), como se describe a continuación en un sentido general. Ver "Efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated grass (*Agrostis stolonifera* L) transformation" (Luo *et. al.*, 2004).

Se infecta el callo con una cepa de *A. tumefaciens* (LBA4404) que lleva un vector súper binario que contenía un gen bar resistente a los herbicidas conducido tanto por un promotor de ubiquitina del arroz. La eficiencia de la transformación estable general varió desde 18% hasta 45%. El análisis por transferencia Southern y genético confirmaron la integración transgénica en el genoma del pasto rastrero y la transmisión normal y la expresión estable del transgen en la generación T_1. Todos los eventos de transformación independientes llevaron una a tres copias del transgen, y una mayoría (60–65%) contenía sólo una copia del gen extraño sin reordenamientos aparentes.

25.1 – Preparación de las semillas para inducción del callo embriogénico.

Se retiró la cáscara a semillas maduras con papel de lija y se esterilizó la superficie en blanqueador Clorox al 10% (v/v) (hipoclorito de sodio al 6%) más 0,2% (v/v) de Tween 20 (Polysorbate 20) con agitación vigorosa durante 90 min. Luego de enjuagar cinco ceces en agua destilada estéril, se colocaron las semillas sobre medio de inducción del callo (sales basales MS y vitaminas, 30 g/l de sacarosa, 500 mg/l de hidrolisato de caseína, 6,6 mg/l de ácido 3,6-dicloro-o-anísico (dicamba), 0,5 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP) y 2 g/l de Phytagel. El pH del medio se ajustó hasta 5,7 antes de someter a autoclave a 120°C durante 20 min).

25.2 – Inducción embriogénica del callo.

Se mantuvieron en la oscuridad las placas de cultivo que contenían explantos de semillas preparadas a temperatura ambiente durante 6 semanas. Se seleccionaro visualmente los callos embriogénicos y se sub-cultivaron en medio de inducción de callo fresco en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 semanas antes del co-cultivo.

25.3 – Infección con *Agrobacterium* y co-cultivo.

Un día antes de la agro-infección, el callo embriogénico se dividió en trozos de 1 a 2 mm y se colocó en medio de inducción del callo que contenía acetosiringona 100 µM. Una alícuota de 10 ul de suspensión de Agrobacterium (LBA4404) (OD=1,0 a 660 nm) se aplicó luego a cada trozo de callo, seguido de 3 días de co-cultivo en la oscuridad a 25°C.

25.4 – Etapa de reposo y control de *Agrobacterium*.

Para el paso de tratamiento antibiótico, luego se transfirió el callo y se cultivó durante 2 semanas en medio de inducción del callo más 125 mg/l de cefotaxima y 250 mg/l carbenicilina para suprimir el crecimiento de bacterias.

25.5 – Selección e identificación de potenciales colonias transgénicas.

Posteriormente, para selección, se movió el callo a medio de inducción del callo que contenía 250 mg/l de cefotaxima y 10 mg/l de fosfinotricina (PPT) durante 8 semanas. El tratamiento con antibiótico y el proceso completo de selección se realizaron a temperatura ambiente en la oscuridad. El intervalo de sub-cultivo durante la selección fue normalmente de 3 semanas.

25.6 – Regeneración de plantas transgénicas.

Para regeneración de la planta, primero se mueven los eventos del callo proliferativos resistentes a PPT a medio de regeneración (medio basal de MS, 30 g/l de sacarosa, 100 mg/l de mio-inositol, 1 mg/l de BAP y 2 g/l de Phytagel) suplementado con cefotaxima, PPT o higromicina. Estos callos se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 semanas y luego se movieron a la luz durante 2–3 semanas para desarrollar los brotes. No se observaron plantas albinas con selección de PPT (si se usa higromicina como agente de selección, produce un alto nivel de plantas albinas).

25.7 – Inducción de las raíces y transferencia al invernadero.

Luego se separaron los pequeños brotes y se transfirieron a medio de regeneración libre de hormonas que contenía PPT y cefotaxima para promover el crecimiento de las raíces mientras se mantenía la presión de la selección y la supersión de cualquier célula restante de *Agrobacterium*. Luego se transfirieron los plantines con raíces bien desarrolladas (3–5 semanas) al suelo y se cultivaron tanto en el invernadero como en el campo.

25.8 – Vernalización y entrecruzamiento externo de plantas transgénicas.

Se mantuvieron las plantas transgénicas en el exterior en un criadero de contención (3-6 meses) hasta el solsticio de invierno en Diciembre. Las plantas vernalizadas se transfirieron luego al invernadero y se mantuvieron a 25°C bajo un período de luz de 16/8 h rodeadas por plantas no transgénicas de tipo salvaje que las aislaron físicamente de otras fuentes de polen. Las plantas

comenzaron a florecer 3-4 semanas después de moverlas nuevamente al invernadero. Se realizó la cruza con el polen de las plantas de tipo salvaje que las rodeaban. Las semillas recolectadas de cada planta transgénica individual se germinaron en el suelo a 25°C, y las plantas T1 se cultivaron en el invernadero para posterior análisis.

25.9 – Otras hierbas blanco

Otras hierbas a las que se puede dirigirse la transformación con AAD-1 de acuerdo con la presente invención incluyen Poa anual (Poa annua), Pasto de Bahía, Bentgrass, Pasto Bermuda, Pasto Blue, Bluestems, Bromegrass, Browntop bent (Agrostis capillaries), Pasto Buffalo, Pasto Canario, Pasto alfombra, Pasto ciempiés, Cañuela roja (Festuca rubra commutate), Crabgrass, Agróstide rastrera (Agrostis stolonifera), Crested hairgrass (Koeleria macrantha), Dallisgrass, Fescue, Festolium, Cañuela de oveja (Festuca ovina), Gramagrass, Indiangrass, Johnsongrass, Pasto llorón, mixtos (equino, para pastura, etc.), Céspedes nativos, Pasto Orchard, Rye-grass inglés (Lolium perenne), Redtop, Cebadilla, Rye-grass anual y perenne, Festuca roja tricofila (Festuca rubra trichophylla), Poa de los Prados (Poa pratensis), St. Augustine, Festuca roja (Festuca rubra rubra), pasto de Sudán, switchgrass, Festuca alta (Festuca arundinacea), Timothy, Tufted hairgrass (Deschampsia caespitosa), Céspedes, Wheatgrass y Pasto Zoisia.

Ejemplo 26 – *AAD-1 (v3)* en Canola

26.1 – Transformación de la Canola.

El gen *AAD-1* (v3) que confiere resistencia al 2,4-D se usó para transformar *Brassica napus* var. Nexera* 710 con transformación mediada por *Agrobacterium*. La construcción contenía gen *AAD-1* (v3) transportado por el promotor CsVMV y el gen Pat transportado por el promotor AtUbi10.

Se esterilizó la superficie de las semillas con blanqueador comercial al 10% durante 10 minutos y se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas luego se colocaron en media concentración de medio basal de MS (Murashige y Skoog, 1962) y se mantuvieron a régimen de crecimiento configurado a 25°C, y con un período de luz de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad.

Se cortaron segmentos de hipocotiledones (3-5 mm) de plántulas de 5 - 7 día y se colocaron en medio de inducción del callo K1D1 (medio MS con 1 mg/l de cinetina y 1 mg/l de 2,4-D) durante 3 días como pre-tratamiento. Luego se transfirieron los segmentos en una cápsula de petri, se trataron con *Agrobacterium* cepa Z707S o LBA4404 cepa que contenía pDAB721. El *Agrobacterium* se cultivó hasta la mañana siguiente a 28°C en la oscuridad en un agitador 150 rpm y posteriormente se re-suspendió en medio de cultivo.

Luego de 30 min de tratamiento de los segmentos de hipocotiledones *Agrobacterium*, se los colocó nuevamente en el medio de inducción del callo durante 3 días. Luego del co-cultivo, los segmentos se colocaron en K1D1TC (medio de inducción del callo que contenía 250 mg/l de Carbenicilina y 300 mg/l de timentina) durante una semana de recuperación. Alternativamente, los segmentos se colocaron en forma directa sobre medio de selección K1D1H1 (medio anterior con 1 mg/l de Herbiace). La Carbenicilaina y la Timentina fueron los antibióticos usados para matar el *Agrobacterium*. El agente de selección Herbiace permitió el crecimiento de las células transformadas.

Las muestras de callo de 35 eventos independentes se evaluaron por PCR. La totalidad de las 35 muestras evaluadas fueron positivas para la presencia de *AAD-1 (v3)*, mientras que los controles no transformados fueron negativos (sección en ensayo de PCR). Se confirmó que diez muestras de callos expresaban la proteína AAD-1 según la determinación realizada por ELISA (sección sobre análisis de proteínas).

Luego se colocaron los segmentos de hipocotiledones con callo en medio de regeneración de brote B3Z1H1 (Medio de MS, 3 mg/l de bencilamino purina, 1 mg/l de Zeatina, 0,5 gm/l de MES [ácido 2-(N-morfolin)etan sulfónico], 5 mg/l de nitrato de plata, 1 mg/l de Herbiace, Carbenicilina y Timentina). Luego de 3 semanas los brotes comenzaron a regenerarse. Los segmentos de hipocotiledones junto con los brotes se transfieren a medio B3Z1H3 (Medio de MS, 3 mg/l de bencilamino purina, 1 mg/l de Zeatina, 0,5 gm/l de MES [ácido 2-(N-morfolin)etan sulfónico], 5 mg/l de nitrato de plata, 3 mg/l de Herbiace, Carbenicilina y Timentina) durante otras 3 semanas.

Se cortaron los brotes de los segmentos de hipocotiledones y se transfirieron a medio de elongación de brotes MESH10 (MS, 0,5 gm/l de MES, 10 mg/l de Herbiace, Carbenicilina, Timentina) durante 2-4 semanas. Los brotes alongados se cultivan para inducción de las raíces en MSI.1 (MS con 0,1 mg/l de ácido indolbutírico). Una vez que las plantas tenían un sistema de raíces bien establecido, se las transplantó al suelo. Se aclimataron las plantas en condiciones de ambiente controlado en el Conviron durante 1-2 semanas antes de transferir al invernadero.

Las plantas T0 transformadas se auto-polinizaron en el invernadero para obtener semillas T1. Las plantas T0 y la progenie T1 se asperjaron con un rango de concentraciones de herbicida para establecer el nivel de protection realizado por el gen *AAD-1* (v3).

<u>26.2 – "Análisis molecular": materiales y métodos de la canola</u>

<u>26.2.1 – Aislamiento y cuantificación de ADN de recolección de tejido</u>. Se colocó tejido fresco en tubos y se liofilizó a 4°C durante 2 días. Luego de que el tejido estuvo completamente seco, se colocó una perla de tungsteno (Valenite) en el tubo y se sometió a las muestras a 1 minuto de molienda por secado usando un molino de perlas Kelco. Luego se siguió el procedimiento

estándar DNeasy de aislamiento de ADN (Qiagen, DNeasy 69109). Una alícuota del ADN extraído se tiñó luego con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se leyó en el florómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/ul.

26.2.2 - Reacción en cadena de la polimerasa. Se usó un total de 100 ng de ADN total como patrón. Se usó 20mM de cada cebador con el kit Takara Ex Taq PCR Polymerase (Mirus TAKRR001A). Los cebadores para PCR de la región codificadora *AAD-1 (v3)* fueron (Delantero – ATGGCTCATG CTGCCCTCAGCC) (SEC ID NO: 27) y (Inverso - CGGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEC ID NO: 28). La reacción por PCR se llevó a cabo en el termociclizador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, y 72°C durante 2 minutos seguido de 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con EtBr. 35 muestras de 35 plants con eventos *AAD-1 (v3)* arrojaron resultados positivos. Tres muestras de control Negativo dieron resultado negativo.

26.3 – ELISA.

Usando ELISA establecido descrito en la sección anterior, se detectó la proteína AAD-1 en 10 eventos de transformación de canola diferentes. Los niveles de expresión variaron desde 150 hasta más de 1000 ppm de proteína soluble total (TSP). Se evaluaron tres muestras de callo no transformados diferentes en paralelo con escasa señal detectada, indicando que los anticuerpos usados en el ensayo tienen reactividad cruzada mínima con la matriz celular de la canola. En la **Tabla 38** se presenta un resumen de los resultados.

Tabla 38. Expresión de AAD1 en callos de Canola.

Muestra #	Peso (mg)	[TSP] (µg/ml)	[AAD1] (ng/mL)	Expresión (ppm TSP)	PCR para AAD1
1	114	757,02	119,36	157,67	+
2	55	839,79	131,84	156,99	+
3	53	724,41	202,12	279,01	+
4	52	629,01	284,89	452,92	+
5	55	521,75	175,88	337,08	+
6	61	707,69	74,24	153,71	+
7	51	642,02	559,11	1026,73	+
8	65	707,69	270,73	382,56	+
9	51	642,02	197,90	308,25	+
10	51	1417,42	220,63	156,66	+
Control 1	53	2424,67	18,67	7,70	-
Control 2	61	2549,60	35,00	13,73	-
Control 3	59	2374,41	22,79	9,60	-

Referencias

Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker, y D.V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein de *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. Gene 36:289-300.

Agriliance Crop Protection Guide. 2003. Agriliance, LLC. St Paul, MN. 588 p.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D.J. Lipman. 1990. Basic local alighment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.

Altschul, S. F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z, Zhang, W. Miller y D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein databasesearch programs. Nucl. Acids Res. 25:3389-3402.

An, G., B.D. Watson, S. Stachel, M.P. Gordon, E. W. Nester. 1985. New cloning vehicles for transformation of higher plants. EMBO J. 4:277-284.

Armstrong C.L., C.E. Green, R.L. Phillips. 1991. Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. Maize Genet Coop News Lett 65:92-93.

Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbas y F.C. Kafatos. 1983 Methods of Enzymology, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100:266-285

Birch R.G. y T. Franks. 1991. Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. Aust. J. Plant Physiol. 18:453-469.

CDMS. Crop Data Management Systems Labels and MSDS. Online. Internet. March 13, 2004. Available at net/manuf/manuf.asp.

Chee P.P., K.A. Fober, J.L. Slightom. 1989. Transformation of soybean (Glycine max) by infecting germinating seeds with Agrobacterium tumefaciens. Plant Physiol. 91:1212-1218.

Cheng M., J.E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, T.W. Conner y Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol 115: 971-980.

Chu C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu, F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sinica 18:659-668.

Clemente T.E., B.J. LaVallee, A.R. Howe, D. Conner-Ward, R.J. Rozman, P.E. Hunter, D.L. Broyles, D.S. Kasten, M.A. Hinchee. 2000. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. Crop Sci 40: 797-803.

CPR: Crop Protection Reference. 2003 Chemical and Pharmaceutical Press, New York, NY. 2429 p.

Devine, M. D. 2005. Why are there not more herbicide-tolerant crops? Pest Manag. Sci. 61:312-317.

Dietrich, Gabriele Elfriede (1998) Imidazolinone resistant AHAS mutants. U.S. Patent 5,731,180.

Didierjean L, L. Gondet, R. Perkins, S.M. Lau, H. Schaller, D.P. O'Keefe, D. Werck-Reichhart. 2002. Engineering Herbicide Metabolism in Tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a Cytochrome P450 Enzyme from Jerusalem Artichoke. Plant Physiol 2002, 130:179-189.

Ditta, G. S. Stranfield, D. Corbin, y D.R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium leliloti.* PNAS 77:7347-7351.

Edwards, R. A., L. H. Keller, y D. M. Schifferli. 1998. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. Gene 207:149-157.

Falco S.C., T. Guida, M. Locke, J. Mauvais, C. Sanders, R.T. Ward, P. Webber. 1995. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. Bio/Technology 13:577-582.

Finer J. y M. McMullen. 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. In Vitro Cell. Dev. Biol. 27P:175-182.

Fraley, R.T., D.G. Rogers, y R. B. Horsch. 1986. Genetic transformation in higher plants. Crit. Rev. Plant Sci. 4:1-46.

Frame B.R., P.R. Drayton, S.V. Bagnall, C.J. Lewnau, W.P. Bullock, H.M. Wilson, J.M. Dunwell, J.A. Thompson, y K. Wang. 1994. Production of fertile maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. Plant J. 6:941-948.

Fukumori, F., y R.P. Hausinger. 1993. Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase. J. Biol. Chem. 268: 24311-24317.

Gamborg, O.L., R. A. Miller, y K. Ojima. 1968. Nutirent requirements of suspensions of cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.

Gay, P., D. Le Coq , M. Steinmetz, E. Ferrari, y J. A. Hoch. 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Eschericia coli.* J. Bacteriol. 153:1424-1431.

Gianessi, L. R. 2005 Economic and herbicide use impacts of glyphosate-resistant crops. Pest. Manag. Sci. 61:241-245.

Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. March 18, 2005 . Available at weedscience.com.

Hiei Y., T. Komari, y T. Kubo. 1997. Tranformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Mol. Biol. 35:205-218.

Hiei, Y., T. Komari (1997) Method for Transforming Monocotyledons. U.S. Patent 5,591,616.

Hinchee M.A.W., D.V. Conner-Ward, C.A. Newell, R.E. McDonnell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley, R.B. Horsch. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Bio/Technology 6:915-922.

Höfte, H. y H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal cristal proteins of *Bacillus thuringiensis*. 1989. Microbiol. Rev. 53:242-255.

Hoekema, A. 1985. In: *The Binary Plant Vector System*, Offset-durkkerij Kanters B.V., Alblasserdam, Chapter 5.

Hogan, D.A.; S.R. Smith, E.A. Saari, J. McCracken, R.P.Hausinger. 2000. Site-directed mutagenesis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/a-

ketoglutarate dioxygenase. Identification of residues involved in metallocenter formation and substrate binding. J. Biol. Chem. 275:12400-12409.

Holsters, M., D. De Waele, A. Depicker, E. Messens, M. Van Montagu, y J. Schell. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens.* Mol Gen. Genet. 163:181-187.

Horsch, R., J. Fry, N. Hoffman, J. Neidermeyer, S. Rogers, y R. Fraley. 1988. In Plant Molecular Biology Manual, S. Gelvin *et al.*, eds., Kluwer Academic Publishers, Boston

Horvath, M., G. Ditzelmüller, M. Lodl, y F. Streichsbier. 1990. Isolation and characterization of a 2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid-degrading soil bacterium. Appl. Microbiol Biotechnol. 33:213-216.

Jefferson, R. A. M. Bevan, y T. Kavanagh. 1987. The use of *Escherichia coli* ß-glucuronidase gene as a gene fustion marker for studies of gene expression in higher plants. Biochem. Soc. Trans. 15: 17-19.

Karlin, S. y S.F. Altschul. 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. PNAS 87:2264-2268.

Karlin, S. y S.F. Altschul. 1993. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. PNAS 90:5873-5877

Keller, G.H., y M.M. Manak. 1987. DNA Probes. Stockton Press, New York, NY, pp. 169-170.

Kohler, H.P.E. 1999. *Sphingobium herbicidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. J. Ind Microbiol and Biotech. 23:336-340.

Li L, Qu R, Kochko A de, Fauquet CM, Beachy RN (1993) An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Rep 12:250–255

Linsmaier, E.M. y F. Skoog (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18:100-127.

Lorraine-Colwill, D. F., S. B. Powles, T. R. Hoawkes, P.H. Hollingshead, S.A.J. Arner, y C. Preston. 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. Pestic. Biochem. Physiol. 74:62-73.

Luo , H., Q. Hu, K. Nelson, C. Longo, A. P. Kausch, J. M. Chandlee, J. K. Wipff y C. R. Fricker. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. Plant Cell Reports 22: 645-652.

Lyon, B.R., D. J. Llewellyn, J. L. Huppatz, E. S. Dennis, y W. J. Peacock. 1989. Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Plant Mol. Bio. 13:533-540.

Lyon, B.R., Y. L. Cousins, D. J. Llewellyn, y E. S. Dennis. 1993. Cotton plants transformed with a bacterial degradation gene are protected from accidental spray drift damage by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Transgenic Res. 2: 166-169.

Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Martin, J.R. y W.W. Witt. 2002. Response of glyphosate tolerant and susceptible biotypes of horseweed (Conyza canadensis) to foliar applied herbicides. Proc.North Cent.Weed Sci.Soc. 57:185.

Martinell B.J., L.S. Julson, C.A. Emler, H. Yong, D.E. McCabe, E.J. Williams. 2002. Soybean Agrobacterium transformation method. U.S. Patent Application No. 6384301

McCabe D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell, P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (Glycine max) by particle acceleration. Bio/Technology 6:923-926.

Miller S.D., P.W. Stahlman, P. Westra, G.W. Wicks, R.G. Wilson, J.M. Tichota. 2003. Risks of weed spectrum shifts and herbicide resistance in glyphosate-resistant cropping systems. Proc.West.Soc.Weed Sci. 56:61-62.

Muller R, S. Jorks, S. Kleinsteuber, W. Babel. 1999. *Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. Microbiol. Res. 154:241-246.

Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Murphy G.P., T.E. Dutt, R.F. Montgomery, T.S. Willard, G.A. Elmore. 2002. Control of horseweed with glyphosate. Proc.North Cent.Weed Sci.Soc. 57:194.

Ng, C.H., R. Wickneswari, S. Salmigah, Y.T. Teng, y B.S. Ismail. 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and –susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. Weed Res. 43:108-115.

Olhoft P.M. y D.A. Somers. 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 706-711

Olhoft, P.M., L.E. Flagel, C.M. Donovan, y D.A. Somers. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. Planta 216:723-735

Padgette S.R., K.H. Kolacz, X. Delannay, D.B. Re, B.J. LaVallee, C.N. Tinius, W.K. Rhodes, Y.I. Otero, G.F. Barry, D.A. Eichholtz, V.M. Peschke, D.L. Nida, N.B. Taylor, y G.M. Kishore. 1995. Development, identification,

and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Sci. 1995;35:1451-1461.

Parrott W.A., J. N. All, M.J. Adang, M.A. Bailey, H.R. Boerma, y C.N. Stewart, Jr. 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki insecticidal gene. In Vitro Cell. Dev. Biol. 30P:144-149.

Popelka, J. C. y F. Altpeter 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereale* L) Mol. Breed 11:203-211

Saari, R.E., D.A. Hogan, y R.P. Hausinger. 1999. Stereospecific degradation of the pheonxypropionate herbicide dichlorprop. J. Mol. Catal. B: Enz. 6:421-428.

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, y N. Arnheim. 1985. Enzymatic Amplification of β-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230:1350-1354.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press.

Sambrook, J. y D.W. Russell. 2000. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schenk, R.U. y A.C. Hildebrandt (1972) Methods and techniques for induction and growth of monocotyledenous and dicotyledenous plant cell cultures. Can. J. Bot.. 50:199-204.

Sfiligoj, E. 2004. Spreading resistance. Crop Life. March issue.

Simarmata, M., J.E. Kaufmann, y D. Penner. 2003. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium* rigidum). Weed Sci. 51:678-682.

Singh R.J., T.M. Klein, C.J. Mauvais, S. Knowlton, T. Hymowitz, C.M. Kostow. Cytological characterization of transgenic soybean. Theor. Appl. Genet. 1998; 96:319-324.

Smejkal, C.W., T. Vallaeys, S.K. Burton, y H.M. Lappin-Scott. 2001. Substrate specificity of chlorophenoxyalkanoic acid-degrading bacteria is not dependent upon phylogenetically related tfdA gene types. Biol. Fertil. Sols 33:507-513.

Streber, W. y L. Willmitzer. 1989. Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. Bio/Technology 7:811-816.

Streber, W.R., K.N. Timmis, y M. H. Zenk. 2000. Microorganisms and plasmids for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) monooxygenase formation and process for the production of these plasmids and strains. US Pat. 6,153,401.

Streber, W.R., K.N. Timmis, y M.H. Zenk. 1987. Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenixyacetic monooxygenase gene tfdA of Alcaligenes eutrophus JMP134. J. Bacteriol. 169:2950-2955.

Suggs, S.V., T. Miyake, E.H. Kawashime, M.J. Johnson, K. Itakura, y R.B. Wallace. 1981. *ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes*, D.D. Brown [ed.], Academic Press, New York, 23:683-693.

Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, W. Mingbo, S. Thornton, y R. Bretell. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. Plant J. 11:1369-1376.

Weigel, D. y J. Glazebrook. 2002. *Arabidopsis*: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, N. Y.. 358 pp.

Weising, K., J. Schell, y G. Kahl. 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. Ann. Rev. Genet. 22:421-477.

Welter, M.E., D.S. Clayton, M.A. miler, y J.F. Petolino. 1995. Morphotypes of friable embryogenic maize callus. Plant Cell Rep. 14:725-729.

Westendorf A., D. Benndorf, R. Muller, W. Babel. 2002. The two enantiospecific dichlorprop/α-ketoglutarate-dioxygenases from Delftia acidovorans MC1-protein and sequence data of *RdpA* and *SdpA*. Microbiol. Res. 157:317-22.

Westendorf, A., R.H. Muller, y W. Babel. 2003. Purification and characterization of the enantiospecific dioxygenases from Delftia acidovorans MC1 initiating the degradation of phenoxypropionates and phenoxyacetate herbicides. Acta Biotechnol. 23: 3-17.

WSSA. 2002. Herbicide Handbook (8th ed). Weed Science Society of America. Lawrence, KS 492 pp.

Zeng P, D. Vadnais, Z. Zhang, y J. Polacco. 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [Glycine max (L.) Merr.]. Plant Cell Rep. 22: 478 – 482.

Zhang S (1995) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. Plant Cell Rep 15:68–71

Zhang S, Chen L, Qu R, Marmey P, Beachy RN, Fauquet CM (1996) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. Plant Cell Rep15:465–469.

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

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

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

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

450

REIVINDICACI NES

1. Una célula de planta transgénica que comprende un polinucleótido que codifica una proteína AAD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 9 o una variante de la SEC ID NO: 9, donde dicha variante tiene actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa, por lo menos una supresión o sustitución conservada de aminoácido, y por lo menos 95% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 9.

2. La célula de la reivindicación 1, donde dicha célula de planta se selecciona del grupo formado por células dicotiledóneas y células monocotiledóneas.

3. La célula de la reivindicación 2, donde dicha célula de planta es dicotiledónea y se selecciona del grupo formado por una célula de algodón, una célula de tabaco, una célula de canola, una célula de soja y una célula de *Arabidopsis*.

4. La célula de la reivindicación 2, donde dicha célula de planta es una célula monocotiledónea seleccionada del grupo formado por una célula de arroz y una célula de maíz.

5. Una planta transgénica que comprende una pluralidad de células de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual la expresión de dicho polinucleótido toma dichas células tolerantes a un herbicida de ariloxialcanoato.

6. La planta de la reivindicación 5, en la cual dicho herbicida es un herbicida fenoxi auxínico.

7. La planta de la reivindicación 5, en la cual dicho herbicida se selecciona del grupo formado por ácido 2,4-diclorofenoxiacético, MCPA, diclorprop y mecoprop.

8. La planta de la reivindicación 5, en la cual dicho herbicida es un ariloxi-fenoxipropionato.

9. La planta de la reivindicación 5, en la cual dicho herbicida se selecciona del grupo formado por fluazifop, haloxifop, diclofop, quizalofop, fenoxaprop, metamifop, cihalofop y clodinofop.

10. La planta de la reivindicación 5, en la cual la expresión de dicho polinucleótido torna dicha planta resistente tanto a un herbicida fenoxi auxínico como a un herbicida de ariloxifenoxipropionato.

11. La planta de la reivindicación 5, en la cual dicha planta comprende además un segundo gen de resistencia a los herbicidas.

12. La planta de la reivindicación 11, en la cual dicho segundo gen de resistencia a los herbicidas torna dicha planta resistente a un herbicida seleccionado del grupo formado por glifosato, glufosinato, inhibidores de ALS, inhibidores de 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (HPPD) e inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa (PPO).

13. Un método para controlar al menos una maleza en un campo, en el cual dicho campo contiene una planta de la reivindicación 5, donde dicho método comprende aplicar a al menos una porción de dicho campo un primer herbicida seleccionado del grupo formado por un herbicida fenoxi auxínico y un herbicida tipo ariloxifenoxipropionato.

14. El método de la reivindicación 13, en el cual dicho herbicida es un enantiómero R de una fenoxi auxina quiral.

15. El método de la reivindicación 14, en el cual dicho herbicida se selecciona de R-diclorprop y mecoprop.

16. El método de la reivindicación 13, en el cual dicho herbicida es una fenoxi auxina aquiral.

17. El método de la reivindicación 16, en el cual dicho herbicida se selecciona del grupo formado por 2,4-D y MCPA.

18. El método de la reivindicación 13, en el cual dicho primer herbicida es un ariloxifenoxipropionato y dicha planta es una monocotiledónea.

19. El método de la reivindicación 18, en el cual dicha monocotiledónea se selecciona del grupo formado por maíz, arroz, trigo, cebada, centeno, césped, avena, sorgo y pastos.

20. El método de la reivindicación 13, en el cual dicho primer herbicida es una fenoxi auxina y dicha planta es una dicotiledónea.

21. El método de la reivindicación 20, en el cual dicha dicotiledónea se selecciona del grupo formado por algodón, tabaco, canola y soja.

22. El método de la reivindicación 13, en el cual dicho método comprende aplicar un segundo herbicida

23. El método de la reivindicación 22, en el cual dicho primer herbicida y dicho segundo herbicida se aplican en forma secuencial.

24. El método de la reivindicación 22, en el cual dicho primer herbicida y dicho segundo herbicida se aplican en forma simultánea.

25. El método de la reivindicación 22, en el cual dicho primer herbicida es una fenoxi auxina y el segundo herbicida es un ariloxifenoxipropionato.

26. El método de la reivindicación 13, en el cual dicha planta es resistente al glifosato.

27. El método de la reivindicación 14, en el cual dicho enantiómero R es un componente de una mezcla racémica.

28. El método de la reivindicación 22, en el cual dicha planta comprende además un segundo gen de resistencia a los herbicidas que torna dicha planta resistente a dicho segundo herbicida.

29. El método de la reivindicación 28, en el cual dicho segundo herbicida se selecciona del grupo formado por una AHAS (acetoxihidroxiácido sintasa) modificada, SurA, SurB, Csr1, Csr1-1, Csr1-2, una EPSPS (5-

enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa) modificada, GOX, GAT, PAT (fosfinotricin-N-acetiltransferasa), bar y una enzima que degrada un dicamba.

30. El método de la reivindicación 28, en el cual dicho segundo herbicida se selecciona del grupo formado por glifosato, glufosinato, dicamba, inhibidores de acetolactato sintasa, inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa e inhibidores de hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa.

31. El método de la reivindicación 30, en el cual dicho segundo herbicida es un inhibidor de acetolactato sintasa seleccionado del grupo formado por herbicidas de tipo imidazilinonas, sulfonil ureas y triazolopirimidinas.

32. El método de la reivindicación 31, en el cual dicho segundo herbicida es una imidazilinona seleccionada del grupo formado por imazamox, imazetapir, imazaquin e imazapic.

33. El método de la reivindicación 28, en el cual dicho primer herbicida es una fenoxi auxina y dicho segundo herbicida se selecciona del grupo formado por glifosato y glufosinato.

34. El método de la reivindicación 33, en el cual dicha fenoxi auxina es 2,4-D y dicho segundo herbicida es glifosato.

35. El método de la reivindicación 28, en el cual dicho primer herbicida es un ariloxifenoxipropionato y dicho segundo herbicida es glifosato.

36. El método de la reivindicación 35, en el cual dicho primer herbicida se selecciona del grupo formado por quizalofop, haloxifop y cihalofop.

37. El método de la reivindicación 31, en el cual dicho segundo herbicida es una sulfonil urea seleccionada del grupo formado por amidosulfuron, bensulfuron, clorimuron, clorsulfuron, cinosulfuron, flupirsulfuron, foramsulfuron, halosulfuron, nicosulfuron, primisulfuron, prosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, tifensulfuron, triasulfuron, trifloxisulfuron y triflusulfuron.

38. El método de la reivindicación 28, donde dicho método comprende además aplicar un tercer herbicida.

39. El método de la reivindicación 38, en el cual dichos herbicidas son 2,4-D, quizalofop y glufosinato.

40. Un método para controlar malezas en un campo, donde dicho método comprende aplicar un primer herbicida a dicho campo y plantar una semilla en dicho campo dentro de los 14 días de aplicar dicho primer herbicida, donde dicha semilla comprende una célula de la reivindicación 1, y donde dicho primer herbicida se selecciona del grupo formado por una fenoxi auxina y un ariloxifenoxipropionato.

41. El método de la reivindicación 40, en el cual dicho primer herbicida es un ácido, una sal inorgánica, una sal orgánica, un éster, un isómero R-enantioespecífico o un componente de una mezcla racémica.

42. El método de la reivindicación 40, en el cual dicha semilla comprende un segundo gen que torna dicha planta resistente a un segundo herbicida, y dicho método comprende además aplicar dicho segundo herbicida a dicho campo antes de dicha plantación.

43. El método de la reivindicación 42, en el cual dicho segundo herbicida se selecciona del grupo formado por glifosato, gramoxona y glufosinato

44. Un polinucleótido optimizado para la expresión en una planta, donde dicho polinucleótido codifica una proteína que tiene actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa, donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo formado por la SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4 y SEC ID NO: 5.

45. El polinucleótido de la reivindicación 44, donde dicho polinucleótido está optimizado para la expresión en una planta dicotiledónea o una planta monocotiledónea.

46. El polinucleótido de la reivindicación 44, donde dicho polinucleótido comprende la SEC ID NO: 5.

47. Un polinucleótido aislado que codifica una proteína que degrada enzimáticamente un herbicida seleccionado del grupo formado por una fenoxi auxina y un ariloxifenoxipropionato, donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo formado por la SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4 y SEC ID NO: 5, donde dicho polinucleótido está operativamente unido a un promotor que es funcional en una célula de planta.

48. El polinucleótido de la reivindicación 47, donde dicho promotor es un promotor de planta.

49. El polinucleótido de la reivindicación 47, donde dicho promotor es un promotor del virus del mosaico de la yuca.

50. Un método para seleccionar una célula de planta transformada, donde dicho método comprende someter a una pluralidad de células de planta a transformación con un polinucleótido de la reivindicación 44 o 47 y cultivar dichas células en una concentración de un herbicida que permita que las células transformadas que expresan dicho polinucleótido crezcan mientras matan o inhiben el crecimiento de células no transformadas, donde dicho herbicida se selecciona del grupo formado por una fenoxi auxina y un ariloxifenoxialcanoato.

51. El método de la reivindicación 50, en el cual dichas células son células de una planta y dicho método se usa para seleccionar una planta transformada.

52. Un polinucleótido de la reivindicación 47 o 50, donde dicho polinucleótido se usa como marcador seleccionable en el método de la reivindicación 50.

53. Un método para detectar si una planta comprende un polinucleótido de la reivindicación 47 o 50, donde dicho método comprende recolectar una muestra de dicha planta y analizar dicha muestra para determinar la presencia de dicho polinucleótido.

54. El método de la reivindicación 53, donde dicho método comprende analizar dicha muestra para determinar la presencia de una proteína codificada por dicho polinucleótido.

55. El método de la reivindicación 53, donde dicho método comprende usar un cebador o sonda de PCR para detectar la presencia de dicho polinucleótido.

56. El método de la reivindicación 54, donde dicho método comprende usar un anticuerpo para detectar la presencia de dicha proteína.

57. Una semilla que comprende una célula de planta de la reivindicación 1.

58. Una planta desarrollada a partir de la semilla de la reivindicación 57.

59. Una parte, progenie o propagado asexual de la planta de la reivindicación 5.

60. El método de la reivindicación 13, donde dicho método se usa para tratar o prevenir malezas resistentes a los herbicidas.

61. La planta de la reivindicación 5, donde dicha planta comprende además un gen de resistencia a los insectos derivado de un organismo seleccionado del grupo formado por *Bacillus thuringiensis, Photorhabdus* y *Xenorhabdus.*

62. La planta de la reivindicación 5, donde dicha planta comprende además un gen para un rasgo agronómico seleccionado del grupo formado por resistencia a los hongos, tolerancia al estrés, mayor rendimiento, perfil mejorado de aceite, mejor calidad de fibra, resistencia viral, maduración tardía, tolerancia al frío y tolerancia a las sales.

63. Un método para conferir resistencia a un herbicida de tipo 2,4-D a un cultivo, donde dicho método comprende introducir en al menos una célula de planta de dicho cultivo una enzima codificadora de ácido nucleico que tenga actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa R-específica respecto de un herbicida de tipo 2,4-D.

64. Un método para controlar malezas resistentes al glifosato en un campo de plantas de cultivo tolerantes al glifosato, donde dichas plantas comprenden un polinucleótido de la reivindicación 47, y dicho método comprende aplicar un herbicida ariloxialcanoato a al menos una porción de dicho campo.

65. El método de la reivindicación 64, donde dicho herbicida es una fenoxi auxina.

66. El método de la reivindicación 64, donde dicho herbicida es un ariloxi fenoxipropionato.

67. El método de la reivindicación 64, donde dichas plantas son dicotiledóneas.

68. El método de la reivindicación 64, donde dichas plantas son monocotiledóneas.

458

RESUMEN

La presente invención provee nuevas plantas que son no sólo resistentes al 2,4-D y otros herbicidas fenoxi auxínicos, sino también a los herbicidas de ariloxifenoxipropionato. Hasta ahora, no habla expectativas o sugerencia de que una planta con ambas propiedades ventajosas pudiera producirse por la introducción de un gen único. La presente invención incluye, también, plantas que producen una o más enzimas de la presente invención solas o "apiladas" junto con otro gen de resistencia a los herbicidas, con preferencia un gen de resistencia al glifosato, para proveer un control más amplio y más robusto de las malezas, mayor flexibilidad al tratamiento, y mejores opciones de manejo de la resistencia a los herbicidas. Más específicamente, las enzimas y los genes preferidos para usar de acuerdo con la presente invención se denominan aquí genes y proteínas *AAD* (ariloxialcanoato dioxigenasa). No se ha informado anteriormente ninguna enzima dioxigenasa dependiente de α-cetoglutarato que tenga la capacidad de degradar los herbicidas de diferentes clases químicas y modos de acción. Este descubrimiento altamente novedoso es la base de significativas oportunidades de rasgos de los cultivos tolerantes a los herbicidas como así también el desarrollo de una tecnología de marcadores seleccionables. La presente invención también incluye métodos relacionados para controlar malezas. La presente invención permite nuevas combinaciones de herbicidas para usar de nuevas maneras. Además, la presente invención provee nuevos métodos para prevenir la formación de, y controlar, malezas que son resistentes (o naturalmente más tolerantes) a uno o más herbicidas tales como el glifosato.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Dow AgroSciences LLC

<120> Nuevos Genes Con Resistencia a los Herbicidas

<130> DAS-115XC1

<150> US 60/567.052
<151> 2004-04-30

<160> 32

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador delantero usado para amplificar el gen rdpA/AAD-1 (v1)

<400> 1
tctagaagga gatataccat gcatgctgca ctgtcccccc tctcccagcg 50

<210> 2
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso usado para amplificar el gen rdpA/AAD-1 (v1)

<400> 2
ctcgagttac tagcgcgccg ggcgcacgcc accgaccg 38

<210> 3
<211> 915
<212> ADN
<213> Sphingobium herbicidovorans

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (907)..(915)
<223> Conector cebador

<400> 3
tctagaagga gatataccat gcatgctgca ctgtcccccc tctcccagcg ctttgagcgc 60

atcgcggtcc agccgctgac cggcgtcctg ggcgccgaga tcaccggcgt cgacctgcgc 120

gagccgctcg acgacagcac ctggaacgaa atcctcgacg cgttccacac ttaccaggtc 180

atctattttc ccggccaggc gatcaccaac gaacagcaca tcgccttcag ccggcgcttc 240

ggccccgtcg atcccgtgcc cctgctcaag agcatcgaag ggtatccaga ggtgcagatg 300

atccgccgcg aagccaacga aagcgggcgt gtgatcggtg aygactggca caccgacagc 360

accttcctgg acgcaccgcc ggccgccgtg gtgatgcgcg cgatcgacgt gcccgagcat 420

ggcggcgaca ccggttttct gagcatgtac accgcgtggg agacgctgtc gcccaccatg 480

caggccacca tcgaagggtt gaacgtagtg cacagcgcca cgcgtgtgtt cggctcgctc 540

taccaggccc agaaccggcg cttcagcaac accagcgtca aggtgatgga cgtcgacgcg 600

ggcgaccgtg aaaccgtgca ccccctggtg gtgacccatc cgggcagcgg ccgcaagggc 660

ctgtacgtga accaggtcta ttgccagcgc atcgagggca tgaccgatgc cgaaagcaaa 720

ccgctgctgc agttcctgta cgagcatgcg acacggttcg atttcacctg ccgcgtgcgc 780

tggaagaagg accaggtcct ggtctgggac aacctgtgca cgatgcaccg ggccgtaccc 840

gactacgcgg gcaagttccg ctacctgacg cgcaccacgg tcggtggcgt gcgcccggcg 900

cgctagtaac tcgag 915

<210> 4
<211> 897
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia primaria de AAD-1 (v2)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Conector cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (891)..(897)
<223> Conector cebador

<400> 4
ccatggctgc tgcactgtcc cccctctccc agcgctttga gcgcatcgcg gtccagccgc 60

tgaccggcgt cctgggcgcc gagatcaccg gcgtcgacct gcgcgagccg ctcgacgaca 120

gcacctggaa cgaaatcctc gacgcgttcc acacttacca ggtcatctat tttcccggcc 180

aggcgatcac caacgaacag cacatcgcct tcagccggcg cttcggcccc gtcgatcccg 240

tgcccctgct caagagcatc gaagggtatc cagaggtgca gatgatccgc cgcgaagcca 300

acgaaagcgg gcgtgtgatc ggtgatgact ggcacaccga cagcaccttc ctggacgcac 360

cgccggccgc cgtggtgatg cgcgcgatcg acgtgcccga gcatggcggc gacaccggtt 420

ttctgagcat gtacaccgcg tgggagacgc tgtcgcccac catgcaggcc accatcgaag 480

ggttgaacgt agtgcacagc gccacgcgtg tgttcggctc gctctaccag gcccagaacc 540

ggcgcttcag caacaccagc gtcaaggtga tggacgtcga cgcgggcgac cgtgaaaccg 600

tgcacccccct ggtggtgacc catccgggca gcggctgcaa gggcctgtac gtgaaccagg 660

tctattgcca gcgcatcgag ggcatgaccg atgccgaaag caaaccgctg ctgcagttcc 720

tgtacgagca tgcgacacgg ttcgatttca cctgccgcgt gcgctggaag aaggaccagg 780

tcctggtctg ggacaacctg tgcacgatgc accgggccgt acccgactac gcgggcaagt 840

tccgctacct gacgcgcacc acggtcggtg gcgtgcgccc ggcgcgctag tgagctc 897

<210> 5
<211> 919
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia primaria de AAD-1 (v3)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Conector cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(8)
<223> codón adicional de alanina (GCT)

<220>
<221> misc_feature
<222> (894)..(919)
<223> Conector cebador

<400> 5
ccatggctca tgctgccctc agccctctct cccaacgctt tgagagaata gctgtccagc 60

cactcactgg tgtccttggt gctgagatca ctggagtgga cttgagggaa ccacttgatg 120

acagcacctg gaatgagata ttggatgcct tccacactta ccaagtcatc tactttcctg 180

gccaagcaat caccaatgag cagcacattg cattctcaag aaggtttgga ccagttgatc 240

cagtgcctct tctcaagagc attgaaggct atccagaggt tcagatgatc cgcagagaag 300

ccaatgagtc tggaagggtg attggtgatg actggcacac agactccact ttccttgatg 360

cacctccagc tgctgttgtg atgagggcca tagatgttcc tgagcatggc ggagacactg 420

ggttcctttc aatgtacaca gcttgggaga ccttgtctcc aaccatgcaa gccaccatcg 480

aagggctcaa cgttgtgcac tctgccacac gtgtgttcgg ttccctctac caagcacaga 540

accgtcgctt cagcaacacc tcagtcaagg tgatggatgt tgatgctggt gacagagaga 600

cagtccatcc cttggttgtg actcatcctg gctctggaag gaaaggcctt tatgtgaatc 660

aagtctactg tcagagaatt gagggcatga cagatgcaga atcaaagcca ttgcttcagt 720

tcctctatga gcatgccacc agatttgact tcacttgccg tgtgaggtgg aagaaagacc 780

aagtccttgt ctgggacaac ttgtgcacca tgcaccgtgc tgttcctgac tatgctggca 840

agttcagata cttgactcgc accacagttg gtggagttag gcctgcccgc tgagtagtta 900

gcttaatcac ctagagctc 919

<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador rdpA(ncoI) 5'

<400> 6
cccatggctg ctgcactgtc ccccctctcc 30

<210> 7
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador 3'saci

<400> 7
gagctcacta gcgcgccggg cgcacgccac cga 33

<210> 8
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador BstEII/ Del NotI 5'

<400> 8
tggtggtgac ccatccgggc agcggctgca agggcc 36

<210> 9
<211> 295

<212> PRT
<213> Sphingobium herbicidovorans

<400> 9

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

Val Gln Pro Leu Thr Gly Val Leu Gly Ala Glu Ile Thr Gly Val Asp
20 25 30

Leu Arg Glu Pro Leu Asp Asp Ser Thr Trp Asn Glu Ile Leu Asp Ala
35 40 45

Phe His Thr Tyr Gln Val Ile Tyr Phe Pro Gly Gln Ala Ile Thr Asn
50 55 60

Glu Gln His Ile Ala Phe Ser Arg Arg Phe Gly Pro Val Asp Pro Val
65 70 75 80

Pro Leu Leu Lys Ser Ile Glu Gly Tyr Pro Glu Val Gln Met Ile Arg
85 90 95

Arg Glu Ala Asn Glu Ser Gly Arg Val Ile Gly Asp Asp Trp His Thr
100 105 110

Asp Ser Thr Phe Leu Asp Ala Pro Pro Ala Ala Val Val Met Arg Ala
115 120 125

Ile Asp Val Pro Glu His Gly Gly Asp Thr Gly Phe Leu Ser Met Tyr
130 135 140

Thr Ala Trp Glu Thr Leu Ser Pro Thr Met Gln Ala Thr Ile Glu Gly
145 150 155 160

Leu Asn Val Val His Ser Ala Thr Arg Val Phe Gly Ser Leu Tyr Gln
165 170 175

Ala Gln Asn Arg Arg Phe Ser Asn Thr Ser Val Lys Val Met Asp Val
180 185 190

Asp Ala Gly Asp Arg Glu Thr Val His Pro Leu Val Val Thr His Pro
195 200 205

Gly Ser Gly Arg Lys Gly Leu Tyr Val Asn Gln Val Tyr Cys Gln Arg
210 215 220

Ile Glu Gly Met Thr Asp Ala Glu Ser Lys Pro Leu Leu Gln Phe Leu
225 230 235 240

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

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

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

Gly Gly Val Arg Pro Ala Arg
290 295

<210> 10
<211> 295
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Traducción de AAD-1 v2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Diferente de v1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (212)..(212)
<223> Diferente de v1

<400> 10

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

Val Gln Pro Leu Thr Gly Val Leu Gly Ala Glu Ile Thr Gly Val Asp
20 25 30

Leu Arg Glu Pro Leu Asp Asp Ser Thr Trp Asn Glu Ile Leu Asp Ala
35 40 45

Phe His Thr Tyr Gln Val Ile Tyr Phe Pro Gly Gln Ala Ile Thr Asn
50 55 60

```
Glu Gln His Ile Ala Phe Ser Arg Arg Phe Gly Pro Val Asp Pro Val
65                  70                  75                  80

Pro Leu Leu Lys Ser Ile Glu Gly Tyr Pro Glu Val Gln Met Ile Arg
                85                  90                  95

Arg Glu Ala Asn Glu Ser Gly Arg Val Ile Gly Asp Asp Trp His Thr
            100                 105                 110

Asp Ser Thr Phe Leu Asp Ala Pro Pro Ala Ala Val Val Met Arg Ala
        115                 120                 125

Ile Asp Val Pro Glu His Gly Gly Asp Thr Gly Phe Leu Ser Met Tyr
    130                 135                 140

Thr Ala Trp Glu Thr Leu Ser Pro Thr Met Gln Ala Thr Ile Glu Gly
145                 150                 155                 160

Leu Asn Val Val His Ser Ala Thr Arg Val Phe Gly Ser Leu Tyr Gln
                165                 170                 175

Ala Gln Asn Arg Arg Phe Ser Asn Thr Ser Val Lys Val Met Asp Val
            180                 185                 190

Asp Ala Gly Asp Arg Glu Thr Val His Pro Leu Val Val Thr His Pro
        195                 200                 205

Gly Ser Gly Cys Lys Gly Leu Tyr Val Asn Gln Val Tyr Cys Gln Arg
    210                 215                 220

Ile Glu Gly Met Thr Asp Ala Glu Ser Lys Pro Leu Leu Gln Phe Leu
225                 230                 235                 240

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

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

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

Gly Gly Val Arg Pro Ala Arg
    290                 295
```

<210> 11
<211> 296
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Traducción de AAD-1 v3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Diferente de V1

<400> 11

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

Ala Val Gln Pro Leu Thr Gly Val Leu Gly Ala Glu Ile Thr Gly Val
20 25 30

Asp Leu Arg Glu Pro Leu Asp Asp Ser Thr Trp Asn Glu Ile Leu Asp
35 40 45

Ala Phe His Thr Tyr Gln Val Ile Tyr Phe Pro Gly Gln Ala Ile Thr
50 55 60

Asn Glu Gln His Ile Ala Phe Ser Arg Arg Phe Gly Pro Val Asp Pro
65 70 75 80

Val Pro Leu Leu Lys Ser Ile Glu Gly Tyr Pro Glu Val Gln Met Ile
85 90 95

Arg Arg Glu Ala Asn Glu Ser Gly Arg Val Ile Gly Asp Asp Trp His
100 105 110

Thr Asp Ser Thr Phe Leu Asp Ala Pro Pro Ala Ala Val Val Met Arg
115 120 125

Ala Ile Asp Val Pro Glu His Gly Gly Asp Thr Gly Phe Leu Ser Met
130 135 140

Tyr Thr Ala Trp Glu Thr Leu Ser Pro Thr Met Gln Ala Thr Ile Glu
145 150 155 160

Gly Leu Asn Val Val His Ser Ala Thr Arg Val Phe Gly Ser Leu Tyr
165 170 175

Gln Ala Gln Asn Arg Arg Phe Ser Asn Thr Ser Val Lys Val Met Asp
180 185 190

Val Asp Ala Gly Asp Arg Glu Thr Val His Pro Leu Val Val Thr His
195 200 205

Pro Gly Ser Gly Arg Lys Gly Leu Tyr Val Asn Gln Val Tyr Cys Gln
210 215 220

Arg Ile Glu Gly Met Thr Asp Ala Glu Ser Lys Pro Leu Leu Gln Phe
225 230 235 240

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

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

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

Val Gly Gly Val Arg Pro Ala Arg
290 295

<210> 12
<211> 888
<212> ADN
<213> Bradyrhizobium japonicum USDA 110

<400> 12
atgacgatcg ccatccggca gcttcagacg cattttgtcg gccaggtttc cggcctcgat 60

ttgcgaaagc cgctcacgcc gggcgaggcc cgcgaggtcg agtccgccat ggacaaatac 120

gcggtgctcg ttttccacga ccaggacatc accgacgagc agcagatggc tttcgcgctg 180

aacttcggcc agcgcgagga cgcgcgcggc ggcacggtca ccaaggagaa ggactaccgg 240

ctgcaatccg gcctgaacga cgtctccaat ctcggcaagg acggcaagcc gctggccaag 300

gacagccgca cgcacctgtt caatctcggc aactgcctct ggcactccga cagctcgttc 360

cgtcccattc ccgcaaaatt ctcgctgctg tcggcgcgcg tggtgaaccc gacgggcggc 420

aacaccgaat tcgcggacat gcgcgccgcc tatgacgcgc tcgacgacga gaccaaggcc 480

gaaatcgagg acctcgtctg cgagcactcg ctgatgtatt cgcgcggctc gctcggcttc 540

accgagtaca ccgacgaaga gaagcagatg ttcaagccgg tcctgcaacg cctcgtgcgc 600

acccatccgg tccaccgccg caagtcgctg tatctctcgt cgcatgccgg caagatcgcc 660

agcatgagcg tgccggaggg gcggctgctg ttgcgcgatc tcaacgagca cgcgacgcag 720

ccggaattcg tctacgtcca caaatggaag ctgcatgacc tcgtgatgtg ggacaaccgc 780

cagaccatgc accgcgtccg ccgctacgac cagtcccagc cccgcgacat gcgccgcgcg 840

acggtggcgg ggacggagcc gacggtgcag cagcaggcgg cggagtag 888

<210> 13
<211> 289
<212> PRT
<213> Bradyrhizobium japonicum USDA 110

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val

<210> 14
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> brjap 5'(speI)

<400> 14
actagtaaca aagaaggaga tataccatga cgat 34

<210> 15
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> br jap 3' (xhoI)

<400> 15
ttctcgagct atcactccgc cgcctgctgc tgc 33

<210> 16
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador delantero M13

<400> 16
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 17
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador inverso M13

<400> 17
caggaaacag ctatgac 17

<210> 18
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> NcoI de Brady

<400> 18
tataccacat gtcgatcgcc atccggcagc tt 32

<210> 19
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SacI de Brady

<400> 19
gagctcctat cactccgccg cctgctgctg cac 33

<210> 20
<211> 525
<212> PRT
<213> Glycine max

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Gly

485 490 495

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

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

<210> 21
<211> 525
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Proteína EPSPS de soja doblemente mutada: treonina 183 convertida en isoleucina; prolina 187 convertida en serina

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Val Glu Asp Asp Lys Thr Thr Lys Gln Ala Ile Val Glu Gly Cys

145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22
<211> 1604
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN con sesgo de soja que codifica la EPSPS doblemente mutada revelada en la SEC ID NO: 21, con secuencia agregada

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1575)
<223> Secuencia codificadora de la secuencia de ADN con sesgo de soja que codifica la proteína EPSPS de la SEC ID NO: 21

<220>
<221> misc_feature
<222> (1576)..(1578)
<223> Terminador de traducción tga

<220>
<221> misc_feature

<222> (1579)..(1604)
<223> Secuencia incluida para introducir codones de detención de traducción en los seis marcos de lectura abierta, y para introducir un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SacI con propósitos de clonación

<400> 22
atggctcaag tctcccgtgt tcacaatctt gctcagtcaa cccaaatctt tggacattca 60

agcaactcaa acaaactgaa gtctgtgaat tctgtctcac ttcgcccacg cctttgggga 120

gcatccaaga gtcgcatacc aatgcacaag aatgggagtt tcatgggcaa cttcaatgtt 180

gggaaaggca attctggtgt cttcaaagtt tcagcttctg ttgcagccgc agagaaaccc 240

agcacttccc ctgagattgt tcttgaaccc attaaggact tcagtggaac aatcactctg 300

cctggatcaa agagtctttc aaacagaata cttctcttgg cagctctgag tgaaggaacc 360

actgtagttg acaacctttt gtactctgaa gatattcatt acatgttggg tgctctcaga 420

actcttgggt tgagagttga agatgacaag accacaaaac aagccatagt tgaaggatgt 480

ggtgggttgt ttccaacaag caaagaatcc aaagatgaga tcaacttgtt tcttggcaat 540

gctggaattg caatgagaag cctcactgct gcagtagttg cagctggtgg gaatgcaagt 600

tatgtccttg atggtgtccc cagaatgagg gaaaggccca tcggtgacct tgtggctggc 660

ctgaaacagc ttggagcaga tgttgattgc ttcttgggca caaactgccc tccagtgaga 720

gtgaatggga agggaggttt gcctggtgga aaggtcaaac tgagtggatc agtctcttcc 780

cagtatctga ctgccttgct catggctgcc cctctggctt tgggtgatgt ggagattgaa 840

atagtggaca agttgatttc tgttccatat gtggaaatga ccctcaaact catggagagg 900

tttggagttt ctgttgaaca ttctggcaac tgggatcgtt tccttgtaca tggaggtcag 960

aagtacaaaa gccctggcaa tgcctttgtt gaaggggatg caagctctgc ttcctatctc 1020

ttggctgggg ctgccatcac tggtgggacc atcactgtga atggctgtgg cacctcatcc 1080

cttcaaggtg atgtaaagtt tgcagaggtc ttggagaaaa tgggtgccaa ggtcacctgg 1140

tctgagaaca gtgtaactgt gtctggacct cccagagact tcagtggcag aaaggttctc 1200

cgtggaattg atgtgaacat gaacaagatg ccagatgtgg ccatgaccct cgctgttgta 1260

gccctgtttg caaatggacc aactgcaatc cgtgatgttg cttcatggag ggtgaaggag 1320

acagagagga tgattgccat ttgcacagaa ctccgcaaac ttggtgcaac agttgaagag 1380

ggaccagatt actgtgtgat aaccccacct gagaagctca atgtgacagc cattgacacc 1440

tatgatgacc acagaatggc aatggctttc tcccttgctg cctgtggtga tgtgcctgtg 1500

actatcaaag accctgggtg cacaaggaag acatttccag actactttga agttttggag 1560

aggttgacaa agcactgagt agttagctta atcacctaga gctc 1604

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Pat 5-3

<400> 23
agataccctt ggttggttgc 20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Pat 3-3

<400> 24
cagatggatc gtttggaagg 20

<210> 25
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador delantero AAD-1 PTU

<400> 25
ataatgccag cctgttaaac gcc 23

<210> 26
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador inverso AAD-1 PTU

<400> 26
ctcaagcata tgaatgacct cga 23

<210> 27
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador con sentido para la Región Codificadora de PCR AAD-1 (RdpAcodF)

<400> 27
atggctcatg ctgccctcag cc 22

<210> 28
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para la Región Codificadora de PCR AAD-1 (RdpAcodF)

<400> 28
cgggcaggcc taactccacc aa 22

<210> 29
<211> 932
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nucleótido optimizado en planta con AAD-2 v2

<400> 29
ccatggctac catagcaatc agacagctcc agacccactt tgtgggtcaa gtttctggat 60

tggacctcag aaagccactc actcctggag aagccagaga agttgaatca gctatggaca 120

agtacgcagt tcttgtcttc catgaccaag acatcacaga tgagcaacag atggcctttg 180

ccctcaactt tggtcagagg gaggatgcac gtggtggcac tgtcaccaaa gagaaggatt 240

accgtcttca gtctggcctc aatgatgttt ccaacttggg caaagatgga aagccacttg 300

ccaaggacag ccgcacccat ttgttcaacc ttggaaactg cttgtggcat tctgactcca 360

gcttcagacc aatcccagcc aagttcagcc tcctttctgc tcgtgttgtg aacccaactg 420

gtgggaacac tgagtttgct gacatgagag ctgcctatga tgctcttgac gatgaaacca 480

aagctgagat tgaggacctt gtgtgtgagc actctctcat gtactcaagg ggctcacttg 540

gcttcactga gtacacagat gaagagaagc aaatgttcaa gcccgtcttg cagcgcttgg 600

tccgcacaca ccctgtgcac cgtcgcaaat cactctacct ctccagccat gccggaaaga 660

ttgccagcat gtccgtccct gaagggaggc tccttttgag ggatttgaat gaacatgcta 720

ctcagcctga gttcgtctat gttcacaaat ggaagttgca tgatcttgtg atgtgggaca 780

ataggcaaac catgcacaga gtgaggagat atgaccagtc ccaacccaga gacatgcgcc 840

gtgcaacagt tgctgggacc gagcccacag tgcaacagca agcagcagag tgagtagtta 900

gcttaatcac ctagagctcg gtcaccagat ct 932

<210> 30
<211> 296
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Proteína AAD-2 v2 traducida

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Gln Gln Gln Ala Ala Glu
290 295

<210> 31
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

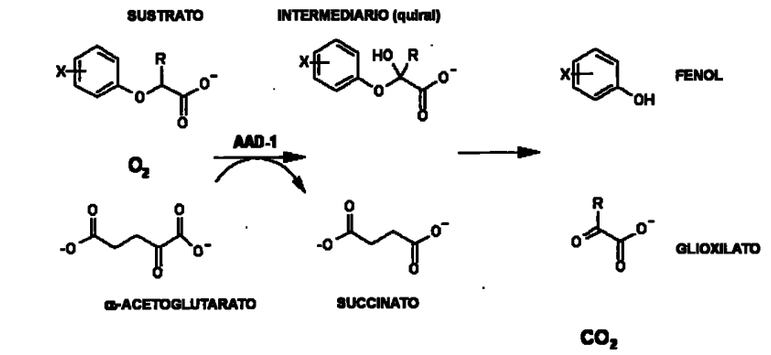
<220>
<223> Cebador delantero PCR AAD-1 de Fragmento Southern

<400> 31
atggctcatg ctgccctcag cc 22

<210> 32
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso PCR AAD-1 de Fragmento Southern

<400> 32
gggcaggcct aactccacca a 21



- EL AGREGADO DE O_2 ES ESTEREOESPECIFICO
- LA RUPTURA DEL INTERMEDIARIO A FENOL+GLIOXILATO ES ESPONTANEA

Fig. 1

481

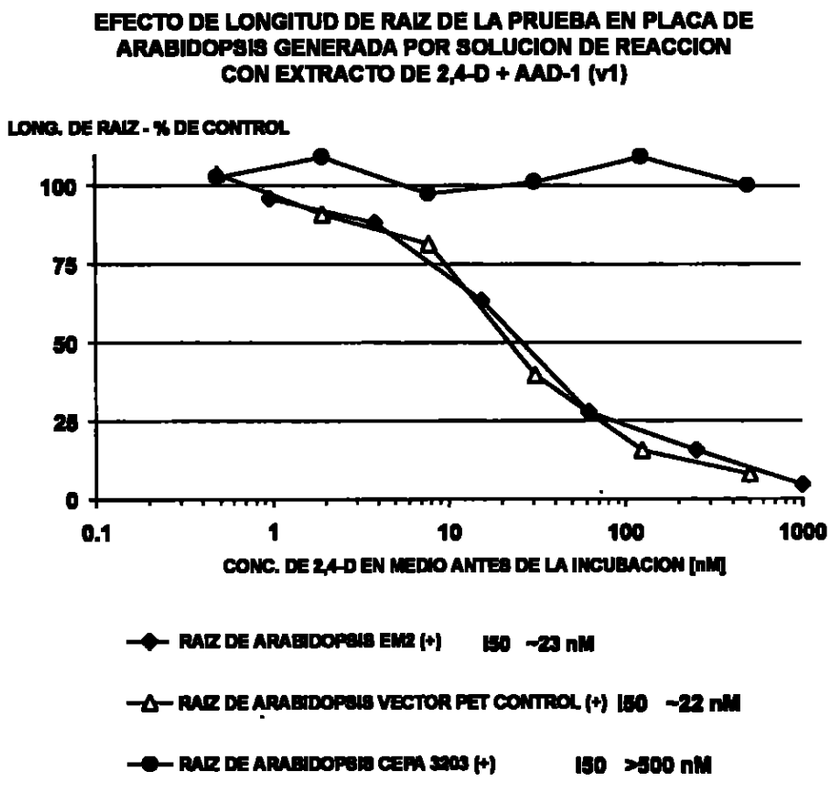

EFECTO DE LONGITUD DE RAIZ DE LA PRUEBA EN PLACA DE ARABIDOPSIS GENERADA POR SOLUCION DE REACCION CON EXTRACTO DE 2,4-D + AAD-1 (v1)
LONG. DE RAIZ - % DE CONTROL
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
CONC. DE 2,4-D EN MEDIO ANTES DE LA INCUBACION [nM]
RAIZ DE ARABIDOPSIS EM2 (+) I50 ~23 nM
RAIZ DE ARABIDOPSIS VECTOR PET CONTROL (+) I50 ~22 nM
RAIZ DE ARABIDOPSIS CEPA 3303 (+) I50 >500 nM

Fig. 2

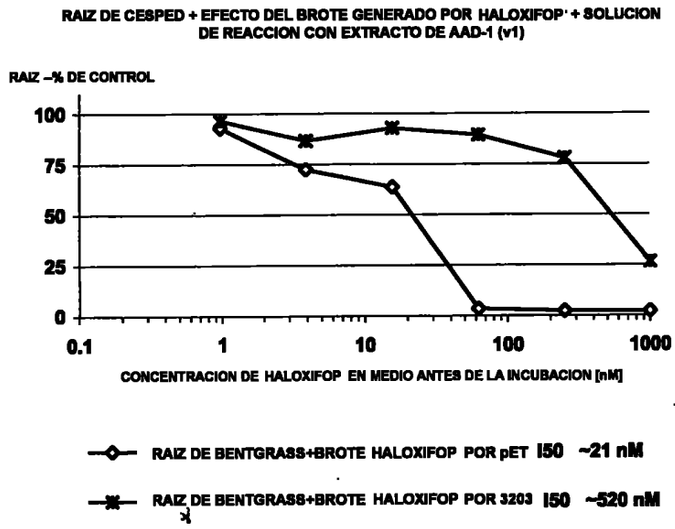

RAIZ DE CESPED + EFECTO DEL BROTE GENERADO POR HALOXIFOP + SOLUCION DE REACCION CON EXTRACTO DE AAD-1 (v1)
RAIZ –% DE CONTROL
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
CONCENTRACION DE HALOXIFOP EN MEDIO ANTES DE LA INCUBACION [nM]
RAIZ DE BENTGRASS+BROTE HALOXIFOP POR pET I50 ~21 nM
RAIZ DE BENTGRASS+BROTE HALOXIFOP POR 3203 I50 ~520 nM

Fig. 3

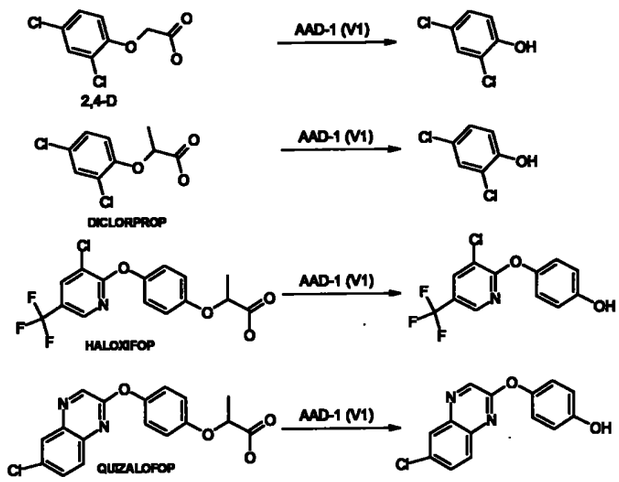


Fig. 4

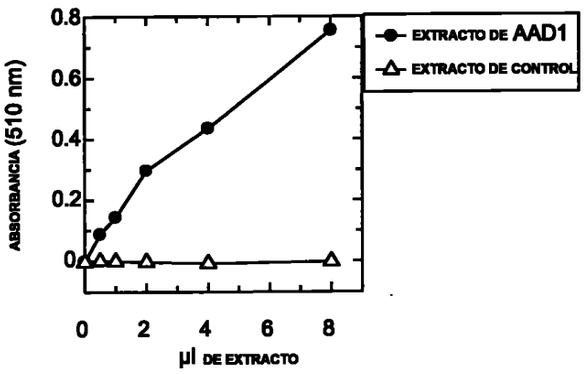

0.8
0.6
0.4
0.2
0
ABSORBANCIA (510 nm)
0
2
4
6
8
µl DE EXTRACTO
EXTRACTO DE AAD1
EXTRACTO DE CONTROL

Fig. 5

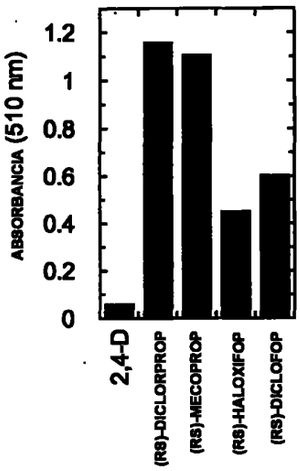

ABSORBANCIA (510 nm)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2,4-D
(RS)-DICLORPROP
(RS)-MECOPROP
(RS)-HALOXIFOP
(RS)-DICLOFOP

Fig. 6A

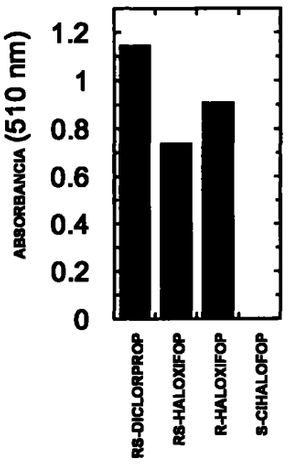

ABSORBANCIA (510 nm)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
RS-DICLORPROP
RS-HALOXIFOP
R-HALOXIFOP
S-CIHALOFOP

Fig. 6B

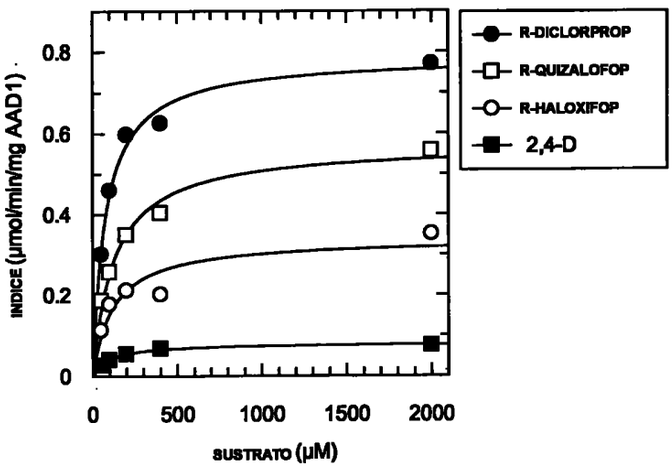

R-DICLORPROP
R-QUIZALOFOP
R-HALOXIFOP
2,4-D
INDICE (µmol/min/mg AAD1)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
0
500
1000
1500
2000
SUSTRATO (µM)

Fig. 7

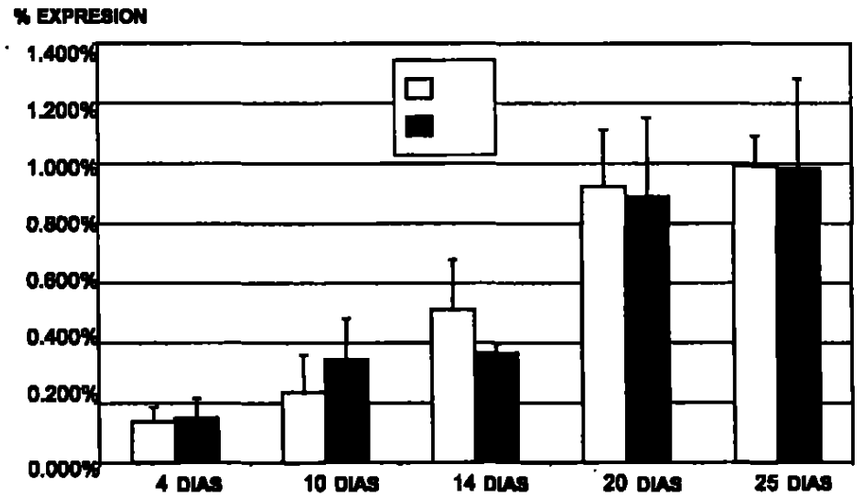

% EXPRESION
1.400%
1.200%
1.000%
0.800%
0.600%
0.400%
0.200%
0.000%
4 DIAS
10 DIAS
14 DIAS
20 DIAS
25 DIAS

Fig. 8A

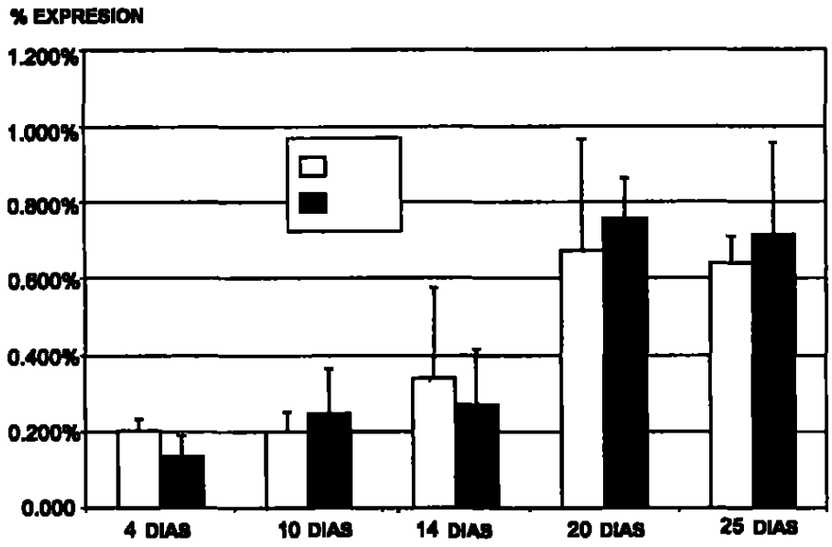

% EXPRESION
1.200%
1.000%
0.800%
0.600%
0.400%
0.200%
0.000
4 DIAS
10 DIAS
14 DIAS
20 DIAS
25 DIAS

Fig. 8B

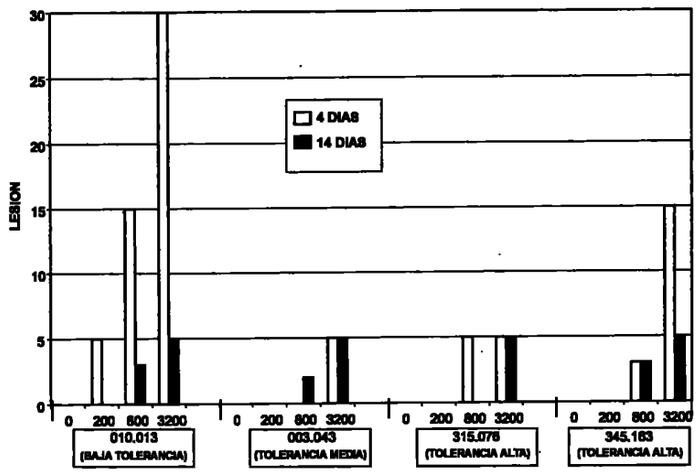

LESION
30
25
20
15
10
5
0
4 DIAS
14 DIAS
0 200 800 3200
010.013
(BAJA TOLERANCIA)
0 200 800 3200
003.043
(TOLERANCIA MEDIA)
0 200 800 3200
315.076
(TOLERANCIA ALTA)
0 200 800 3200
345.163
(TOLERANCIA ALTA)

Fig. 9A

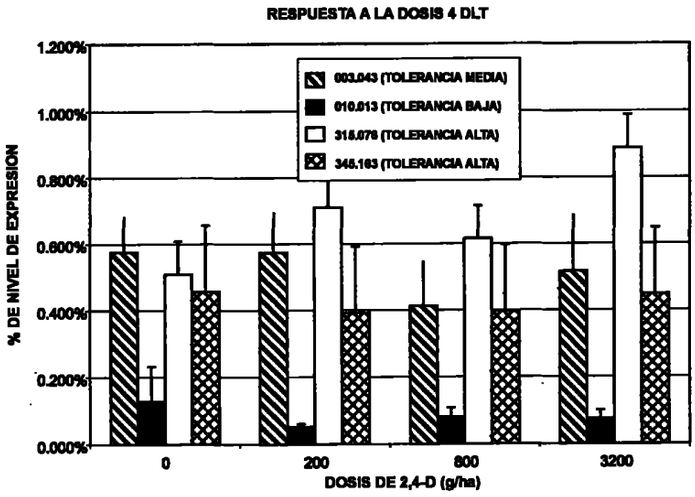

RESPUESTA A LA DOSIS 4 DLT
1.200%
1.000%
0.800%
0.600%
0.400%
0.200%
0.000%
% DE NIVEL DE EXPRESION
003.043 (TOLERANCIA MEDIA)
010.013 (TOLERANCIA BAJA)
315.076 (TOLERANCIA ALTA)
345.163 (TOLERANCIA ALTA)
0
200
800
3200
DOSIS DE 2,4-D (g/ha)

Fig. 9B

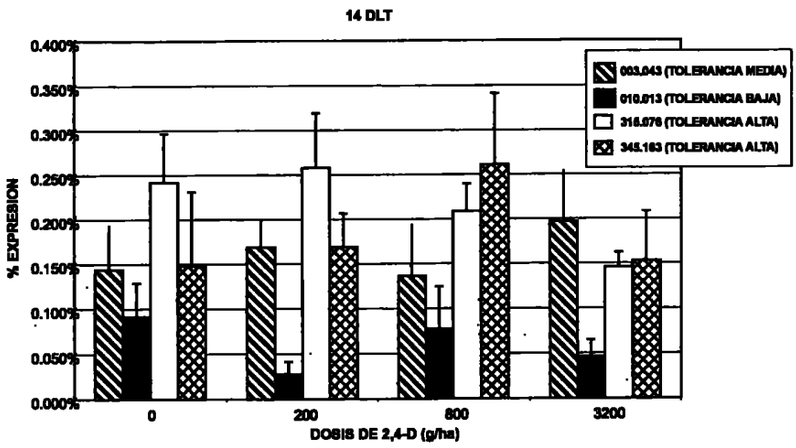

14 DLT
0.400%
0.350%
0.300%
0.250%
0.200%
0.150%
0.100%
0.050%
0.000%
% EXPRESION
003.043 (TOLERANCIA MEDIA)
010.013 (TOLERANCIA BAJA)
316.076 (TOLERANCIA ALTA)
345.163 (TOLERANCIA ALTA)
0
200
800
3200
DOSIS DE 2,4-D (g/ha)

Fig. 9C

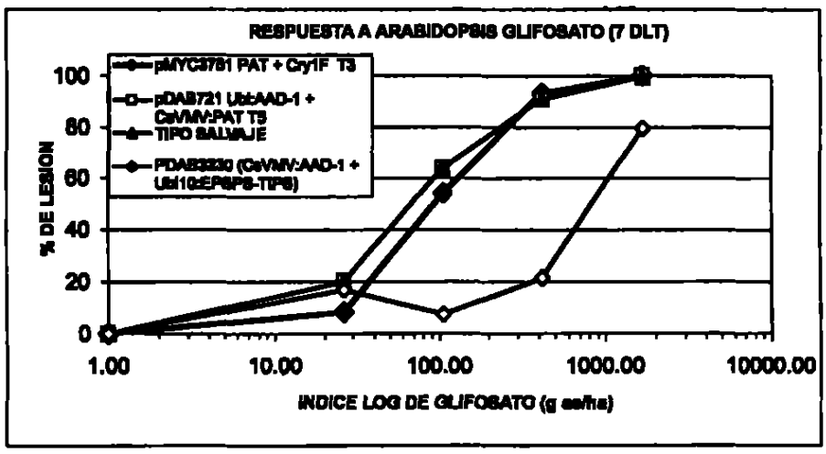

RESPUESTA A ARABIDOPSIS GLIFOSATO (7 DLT)
pMYC3781 PAT + Cry1F T3
pDAB721 Ubi:AAD-1 + CsVMV:PAT T3
TIPO SALVAJE
PDAB9330 (CsVMV:AAD-1 + Ubi10:EPSPS-TIPS)
% DE LESION
100
80
60
40
20
0
1.00
10.00
100.00
1000.00
10000.00
INDICE LOG DE GLIFOSATO (g ae/ha)

Fig. 10

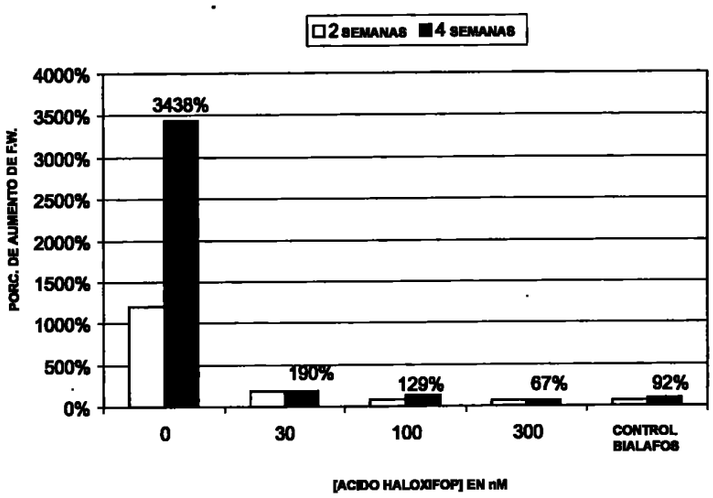

2 SEMANAS
4 SEMANAS
4000%
3500%
3000%
2500%
2000%
1500%
1000%
500%
0%
PORC. DE AUMENTO DE F.W.
3438%
190%
129%
67%
92%
0
30
100
300
CONTROL BIALAFOS
[ACIDO HALOXIFOP] EN nM

Fig. 11

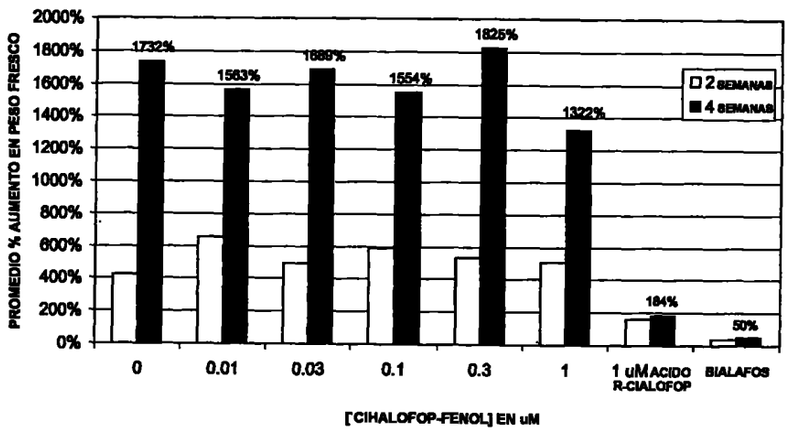

2000%
1800%
1600%
1400%
1200%
1000%
800%
600%
400%
200%
0%
PROMEDIO % AUMENTO EN PESO FRESCO
1732%
1563%
1688%
1554%
1825%
1322%
184%
50%
2 SEMANAS
4 SEMANAS
0
0.01
0.03
0.1
0.3
1
1 uM ACIDO R-CIALOFOP
BIALAFOS
[CIHALOFOP-FENOL] EN uM

Fig. 12

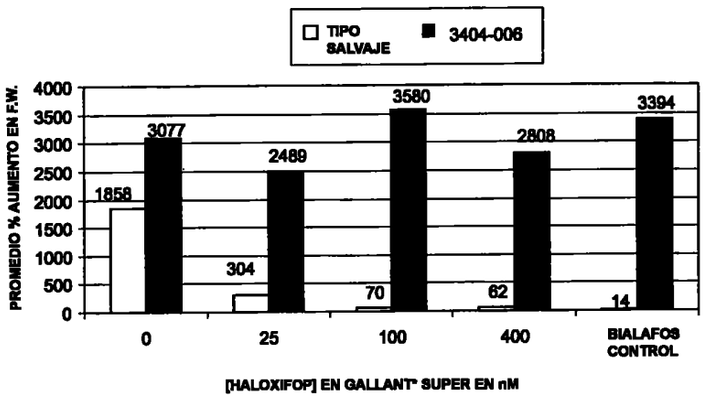

TIPO SALVAJE
3404-006
PROMEDIO % AUMENTO EN F.W.
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1858
3077
304
2489
70
3580
62
2808
14
3394
0
25
100
400
BIALAFOS CONTROL
[HALOXIFOP] EN GALLANT® SUPER EN nM

Fig. 13

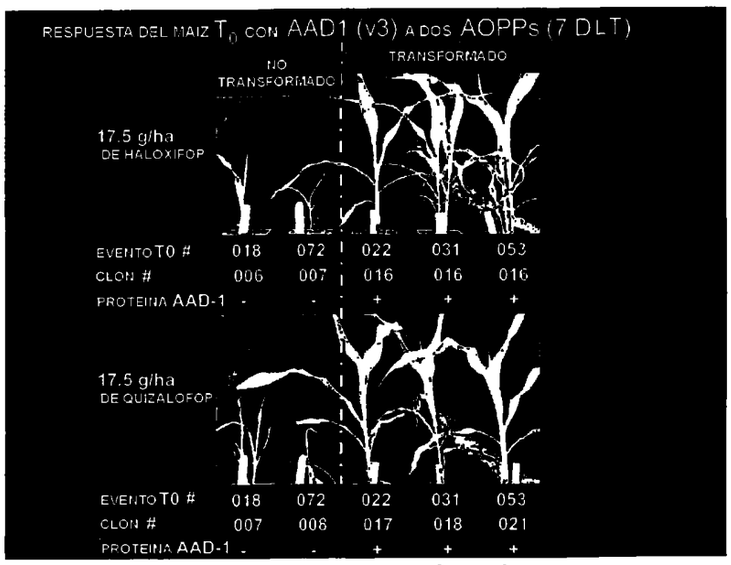

RESPUESTA DEL MAIZ T_0 CON AAD1 (v3) A DOS AOPPs (7 DLT)
NO TRANSFORMADO
TRANSFORMADO
17.5 g/ha DE HALOXIFOP
EVENTO T0 # 018 072 022 031 053
CLON # 006 007 016 016 016
PROTEINA AAD-1 - - + + +
17.5 g/ha DE QUIZALOFOP
EVENTO T0 # 018 072 022 031 053
CLON # 007 006 017 018 021
PROTEINA AAD-1 - - + + +

Fig. 14

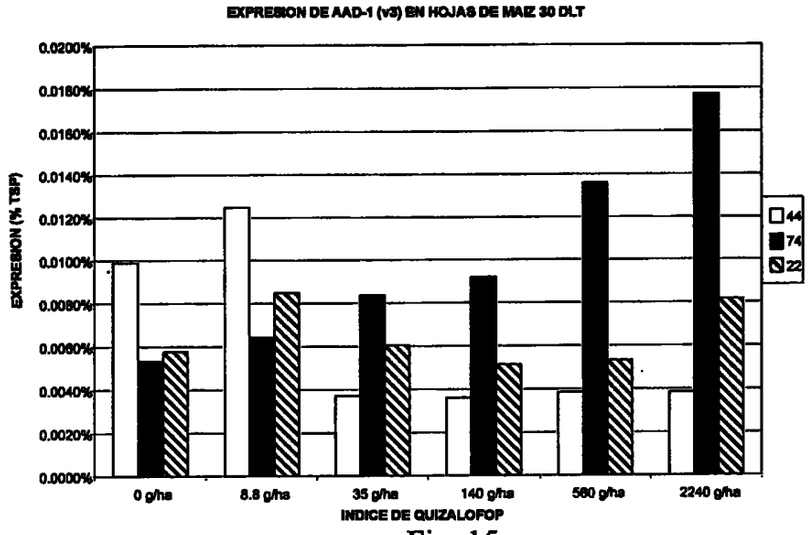

EXPRESION DE AAD-1 (v3) EN HOJAS DE MAIZ 30 DLT
EXPRESION (% TSP)
0.0200%
0.0180%
0.0160%
0.0140%
0.0120%
0.0100%
0.0080%
0.0060%
0.0040%
0.0020%
0.0000%
0 g/ha
8.8 g/ha
35 g/ha
140 g/ha
560 g/ha
2240 g/ha
INDICE DE QUIZALOFOP
44
74
22

Fig. 15

497



8X INDICE DE CAMPO, MAS COC 1%, APLICADO EN LA ETAPA DE CRECIMIENTO V3, FOTO: FOWLER IN, 9 DE JULIO DE 2004

Fig. 16

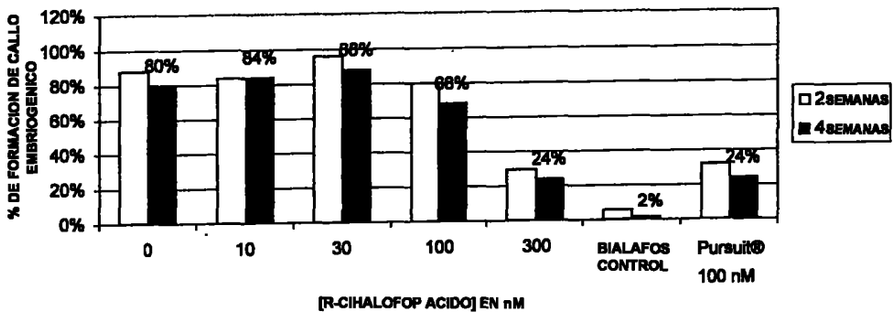
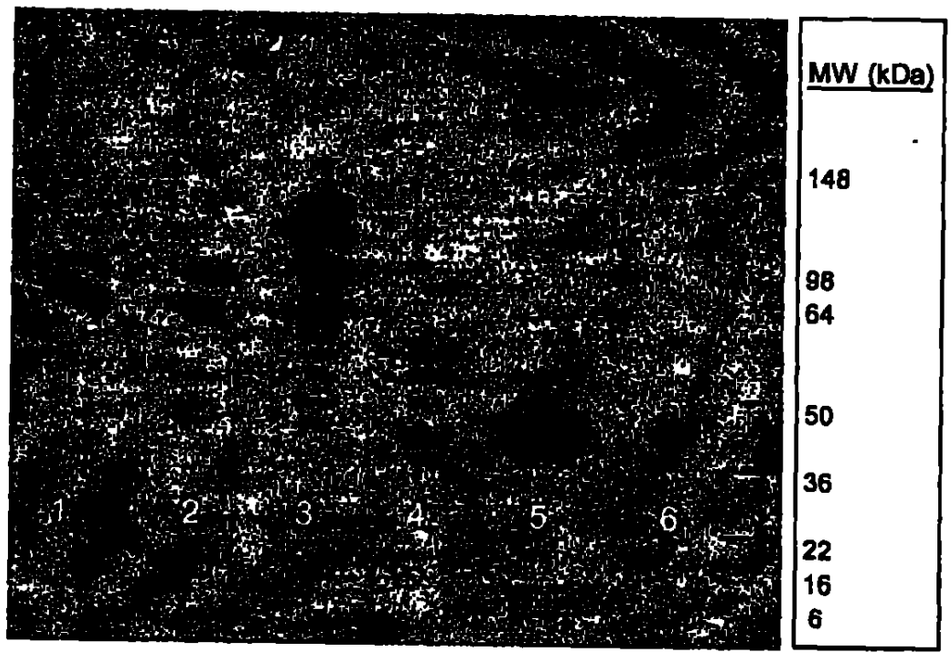

% DE FORMACION DE CALLO EMBRIOGENICO
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
80%
84%
88%
66%
24%
2%
24%
0
10
30
100
300
BIALAFOS CONTROL
Pursuit® 100 nM
[R-CIHALOFOP ACIDO] EN nM
2 SEMANAS
4 SEMANAS

Fig. 17



Western

LINEA	
1	CALLO #1
2	CALLO #2
3	NEGATIVO
4	MAIZ CON AAD1
5	ESTANDAR 5 ug/mL
6	ESTANDAR 0.5 ug/mL

Fig. 18

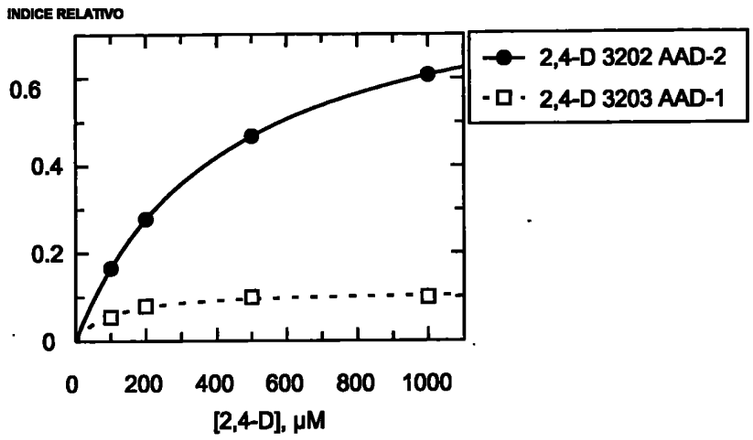

INDICE RELATIVO
0.6
0.4
0.2
0
0
200
400
600
800
1000
[2,4-D], µM
2,4-D 3202 AAD-2
2,4-D 3203 AAD-1

Fig. 19

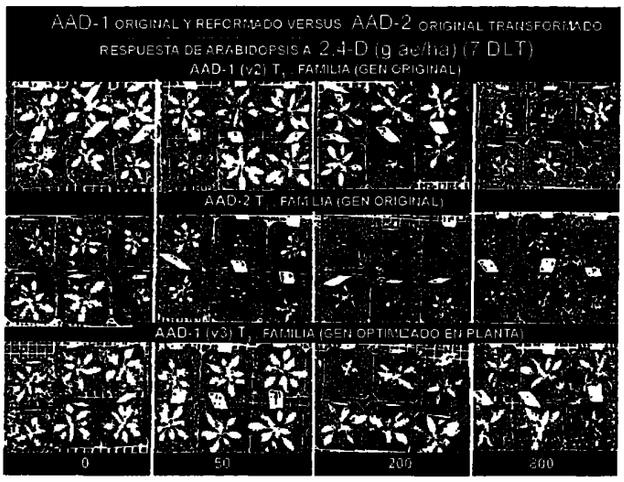

AAD-1 ORIGINAL Y REFORMADO VERSUS AAD-2 ORIGINAL TRANSFORMADO
RESPUESTA DE ARABIDOPSIS A 2,4-D (g ae/ha) (7 DLT)
AAD-1 (v2) T1 FAMILIA (GEN ORIGINAL)
AAD-2 T1 FAMILIA (GEN ORIGINAL)
AAD-1 (v3) T1 FAMILIA (GEN OPTIMIZADO EN PLANTA)
0
50
200
800

Fig. 20

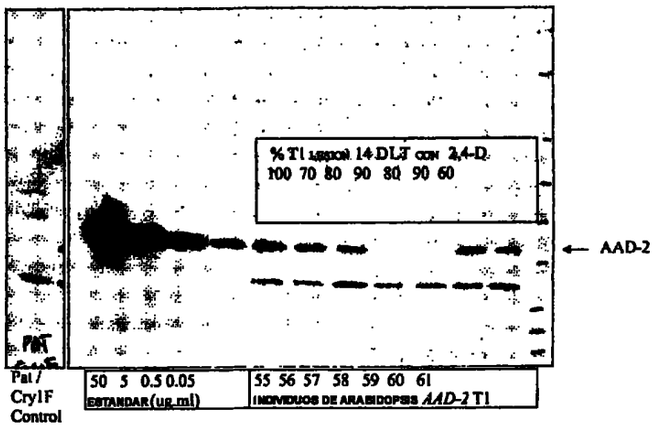

% T1 lineas 14 DLT con 2,4-D
100 70 80 90 80 90 60
AAD-2
Pat /
Cry1F
Control
50 5 0.5 0.05
ESTANDAR (ug/ml)
55 56 57 58 59 60 61
INDIVIDUOS DE ARABIDOPSIS AAD-2 T1

Fig. 21

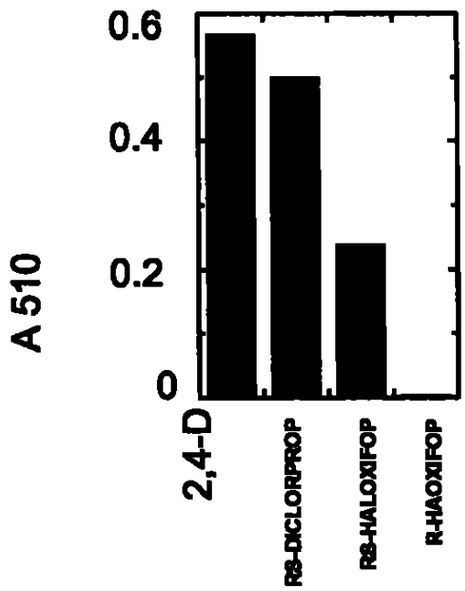


Fig. 22

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) No. de solicitud: 06 - 110106	(51) Int Cl.: A01 H 5/00
22) Fecha de solicitud: 30/10/06	(71)Solicitante(s) DOW AGROSCIENCES LLC
(30) Prioridad (31) No. Prioridad 32) Fecha (33) País 60/567.052 30/04/2004 US	(72) Inventor(es) TERRY R. WRIGHT; JUSTIN M. LIRA; DONALD J. MERLO; NICOLE HOPKINS
	(74) Apoderado: DRA. MARGARITA CASTELLANOS A.
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 30/11/06 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 02/05/2005 No. de solicitud PCT/US2005/014737	(87) Publicación Internacional Fecha: 17/11/2005 No. publicación: WO2005/107437 A2

(54) Título: **NUEVOS GENES CON RESISTENCIA A LOS HERBICIDAS**

Reivindicación(es):

Una célula de planta transgénica que comprende un polinucleótido que codifica una proteína AAD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 9 o una variante de la SEC ID NO: 9, donde dicha variante tiene actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa, por lo menos una supresión o sustitución conservada de aminoácido, y por lo menos 95% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 9.

Un polinucleótido optimizado para la expresión en una planta, donde dicho polinucleótido codifica una proteína que tiene actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa, donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína se híbrida en condiciones rigurosas con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo formado por la SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4 y SEC ID NO: 5.

Un polinucleótido aislado que codifica una proteína que degrada enzimáticamente un herbicida seleccionado del grupo formado por una fenoxi auxina y un ariloxifenoxipropionato, donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína se híbrida en condiciones rigurosas con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo formado por la SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4 y SEC ID NO: 5, donde dicho polinucleótido está operativamente unido a un promotor que es funcional en una célula de planta.

Un método para conferir resistencia a un herbicida de tipo 2,4-D a un cultivo, donde dicho método comprende introducir en al menos una célula de planta de dicho cultivo una enzima codificadora de ácido nucleico que tenga actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa R-específica respecto de un herbicida de tipo 2,4-D.

5088

506

Rad: 06-110105- -00000-0000
Fec: 2006-10-30 14:24:11 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYII
Eve: 379 FASENACIONALII

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRÁMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ( )	(X)	( )
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	(X)	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	( )
- Descripción de la invención	(X)	( )
- Dibujos de ser estos pertinentes	( )	( )
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	(X)	( )

C MPLETA ( ) INCOMPLETA (X)

DISEÑO INDUSTRIAL ( )		
- Indicación de que se solicita el registro de 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 ( )

EZQUEMA DE TRAZADO ( )		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	( )	( )
- Representación gráfica del Esquema de Trazado	( )	( )
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )

COMPLETA ( ) INCOMPLETA ( )

Firma responsable: _____

Fecha: 30 OCT. 2006

509
507

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTELLANOS ABONDANO MARGARITA
Apoderado(a) y/o Representante de
DOW AGROSCIENCES LLC

REFERENCIA	Radicación No.	6 110105
	Solicitud internacional	PCT/US2005/014737
	Fecha inicio fase nacional	30/11/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	14633

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 de los inventores al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

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
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 22 DIC. 2006
aalvarado