

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN**



No. 09-070159-A-00000-0000

Fecha: 2013-03-01 11:18:51

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 93

21. EXPEDIENTE No.

09-70159A

54. TÍTULO

NOVEDOSOS GENES MARCADORES SELECCIONABLES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

DOW AGROSCIENCES LLC

DOMICILIO

INDIANAPOLIS, INDIANA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35'456.344 de Usaquen

22. BOGOTÁ, D.C.,

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente : 09.070.159 De: _____ A: _____	Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No 13-0012405 Fecha 2013/02/07
Comprobante de Pago No 13-0012931 Fecha 2013/02/08

6. Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por \$450.000.
- ☒ Comprobante de pago por 22 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$ 660.000
- ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	<i>Lu2 Clemencia DePaez</i>
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 09.070.159. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 17252 notificado por fijación en lista del 02 de octubre de 2012. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 07 de julio de 2009 y la prioridad que allí se reivindica el 07 de diciembre de 2006.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 09.070.159.

NOVEDOSOS GENES MARCADORES SELECCIONABLES

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Un marcador seleccionable es una característica genética detectable o un segmento de ADN que puede ser identificado y rastreado. Un gen marcador es útil típicamente como una etiqueta de afinidad para otro gen, algunas veces denominado el gen blanco. Un gen marcador se usa típicamente con un gen blanco que está siendo utilizado para transformar células blanco. Las células blanco que reciben por herencia el gen blanco se pueden identificar seleccionando las células que también expresan el gen marcador. El gen marcador está lo suficientemente cerca del gen blanco de modo que los dos genes (el gen marcador y el gen blanco) se enlazan genéticamente y usualmente se heredan juntos. El estándar corriente para los marcadores seleccionables es el gen "pat" que codifica una enzima denominada fosfinotricin acetil transferasa.

La glutamin sintetasa ("GS") es una enzima esencial para el desarrollo y la vida de las células vegetales en muchas plantas. La GS convierte el glutamato en glutamina. La GS también está involucrada en la asimilación del amoníaco y en el metabolismo del nitrógeno. En la mayoría de las plantas, la GS está involucrada en la trayectoria para la eliminación de la toxicidad del amoníaco liberado por la reducción del nitrato. Por lo tanto, los inhibidores potentes de la GS son muy tóxicos para las células vegetales. La ruptura o la modificación del herbicida dentro de la planta podrían conducir a producir resistencia.

Se ha desarrollado una clase particular de herbicidas, basados en el efecto tóxico debido a la inhibición de la GS en las plantas. El bialafos y la fosfinotricina son dos de estos inhibidores de la acción de la GS y poseen excelentes propiedades herbicidas. Estos dos herbicidas son no-selectivos; inhiben el desarrollo de todas las diferentes especies de plantas presentes en el suelo, originando en consecuencia su total destrucción.

El Bialafos también es un herbicida de amplio espectro. El Bialafos está compuesto de fosfinotricina (PPT o PTC; ácido 2-amino-4-metilfosfinobutírico), un análogo del ácido L-glutámico, y dos residuos de L-alanina. De este modo, la diferencia estructural entre la PPT y el Bialafos reside en la ausencia de dos aminoácidos alanina en el caso de la PPT. La PPT se libera al remover los residuos de L-alanina del Bialafos mediante las peptidasas intracelulares. La PPT es un potente inhibidor de la GS. La inhibición de la GS en las plantas por parte de la PPT origina la rápida acumulación de amoníaco y la muerte de las células vegetales.

En principio se descubrió que el Bialafos tiene propiedades antibióticas, lo que le permitía ser utilizado como un pesticida o un fungicida. La Patente Estadounidense No. 3.832.394 se refiere al cultivo del *Streptomyces hygroscopicus*, y a la recuperación de Bialafos de su medio de cultivo. Sin embargo, otras cepas, tales como el *Streptomyces viridochromogenes*, también producen este compuesto. También se sabe que existen en la naturaleza otros antibióticos tripeptídicos que contienen una sección específica de PPT, tal como la fosalacina. La PPT también se obtiene por síntesis química y se distribuye en el comercio.

El *Streptomyces hygroscopicus* y el *Streptomyces viridochromogenes* que producen el Bialafos están protegidos de la toxicidad de la PPT mediante una enzima con actividad de fosfinotricin acetiltransferasa. Plant Physiol, Abril 2001, Vol. 125, págs. 1585-1590 ("Expression of *bar* in the Plastid Genome Confers Herbicide Resistance, Lutz et al.). La especie *Streptomyces* la cual produce estos antibióticos se destruiría a si misma si no tuviese un mecanismo de autodefensa contra estos antibióticos. Se ha hallado en varios casos que este mecanismo de autodefensa comprende una enzima capaz de inhibir el efecto antibiótico.

La fosfinotricin acetil transferasa está codificada ya sea por el gen *bar* (resistencia al bialafos; Thompson et al., 1987) o el gen *pat* (fosfinotricin acetiltransferasa; Strauch et al., 1988), y elimina la toxicidad de la PPT por acetilación del grupo amino libre de PPT. Las enzimas codificadas por estos dos genes son funcionalmente idénticas y muestran 85% de identidad en el nivel de aminoácidos (Wohlleben et al., 1988; Wehrmann et al., 1996). Los cultivos resistentes a la PPT se han obtenido mediante la expresión de los genes quiméricos *bar* o *pat* en el citoplasma a partir de los genes nucleares. Las líneas resistentes al herbicida se han obtenido por selección directa para resistencia a la PPT en el tabaco (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havana), la papa, *Brassica napus*, *Brassica oleracea* (De Block et al., 1987; De Block et al., 1989), el maíz (Spencer et al., 1990), y el arroz (Cao et al., 1992).

Se identificó un gen (*bar*) adyacente al gen factor sigma *hrdD* en el *Streptomyces coelicolor* A3. El producto *bar* previsto mostró 32,2% y 30,4% de identidad con los genes *pat* y *bar* de los productores de bialafos, *Streptomyces viridochromogenes* y *Streptomyces hygroscopicus*, respectivamente. El gen *bar* del *S. coelicolor* confirió resistencia al bialafos cuando se clonó en el *S. coelicolor* en un vector de alto número de copias. Bedford et al., Gene, 1991 Jul 31; 104(1):39-45, "Characterization of a gene conferring bialafos resistance in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)". La expresión heteróloga de este gen en otros microbios, o la transformación de este gen en las plantas, no ha sido reportada hasta el presente.

El uso de la característica de resistencia al herbicida se menciona en la Patente DE 3642 829 A y la Patente Estadounidense No. 5.879.903 (al igual que en las patentes números. 5.637.489; 5.276.268; y 5.273.894) donde el gen *pat* se aísla del *Streptomyces viridochromogenes*. La Patente WO 87/05629 y la Patente Estadounidense No. 5.648.477 (al igual que las patentes 5.646.024 y 5.561.236) se refieren al uso del gen *bar* del *S. hygroscopicus* para proteger las células vegetales y las plantas de los inhibidores de la glutamin sintetasa (tal como la PPT) y para el desarrollo de la resistencia al herbicida en las plantas. El gen que codifica la resistencia al herbicida BASTA (fosfinotricina de Hoechst) o Herbiace (bialafos de Meiji Seika) fue introducido por la infección del *Agrobacterium* en las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havan SR1), papa (*Solanum tuberosum* cv Benotima), y tomate (*Lycopersicum esculentum*), y confirió resistencia al herbicida.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un nuevo gen denominado en adelante *DSM-2*. Este gen fue identificado en el *Streptomyces coelicolor* (A3). La proteína del *DSM-2* se relaciona remotamente con el PAT y el BAR. La presente invención también provee genes optimizados de plantas, que codifican las proteínas *DSM-2*. El *DSM-2* también se puede utilizar como característica transgénica para impartir tolerancia a las moléculas herbicidas y antibacteriales, glufosinato (fosfinotricina) y/o bialafos, en microorganismos, en células vegetales y en plantas.

La transformación en *Arabidopsis* permite la recuperación de glufosinato en grandes proporciones. Una vez introducido, el gen *DSM-2* tiene la capacidad de proveer selectividad significativa y completa resistencia a la planta.

Para estos genes existe un valor inherente elevado, simplemente como marcadores seleccionables para proyectos de biotecnología. En algunas realizaciones preferidas, los genes objeto de la invención se pueden utilizar como marcadores para seleccionar las células transformadas de manera exitosa en cultivo, y plantas completas en el invernadero y en el campo. Este gen y homólogos similares se pueden utilizar en lugar del *pat* y/o *bar*.

El uso de este gen como marcador seleccionable en un sistema de transformación bacteriana puede incrementar la eficiencia para todas las transformaciones de la planta. El uso de *DSM-2* como marcador de selección único, elimina la necesidad de un marcador adicional antibiótico medicinal (tal como en la resistencia a la ampicilina) durante la clonación.

De acuerdo con la presente invención, también son posibles otros usos. El *DSM-2* puede ser útil como una característica transgénica para impartir a las plantas tolerancia a los herbicidas glufosinato y bialafos.

Este gen también se puede utilizar como la base para un nuevo sistema de transformación en la planta en conjunto con una cepa modificada del *Agrobacterium*. Las nuevas cepas del *Pseudomonas fluorescens*, u otras cepas microbianas, empleadas para la producción de proteína y la incorporación de genes marcadores de resistencia antibiótica no medicinal también se pueden producir de acuerdo con la presente invención. La mejora en los procesos de clonación y transformación y de la eficiencia, por la eliminación de la purificación del fragmento aparte de los elementos de resistencia antibiótica medicinal, también puede ser un beneficio.

Además de las características de cultivos tolerantes al herbicida (CTH), los métodos para controlar malezas utilizando herbicidas para los cuales se crea tolerancia al herbicida por los genes mencionados, en los cultivos transgénicos, también están dentro del alcance de la presente invención. La combinación de la característica CTH presente, también es beneficiosa cuando se combina con otras características CTH (que incluyen, pero no están limitadas a, tolerancia al glifosato y tolerancia al 2,4-D), particularmente para controlar las especies con resistencia recientemente adquirida, o tolerancia inherente, al herbicida (tal como el glifosato). Además, cuando se rotan los cultivos tolerantes al glifosato (los cuales se están convirtiendo,

cada vez más, en prevalentes en todo el mundo) con otros cultivos tolerantes al glifosato, puede ser difícil el control de los contribuyentes resistentes al glifosato. De este modo, el uso de estas características transgénicas apiladas o transformadas en forma individual en los cultivos puede aportar una herramienta para el control de otros cultivos contribuyentes con CTH.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la desactivación del glufosinato por N-acetilación mediada por el DSM-2.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEC ID NO: 1 es la secuencia de *DSM-2* nativa

SEC ID NO: 2 es la secuencia de proteína nativa

SEC ID NO: 3 es la secuencia *DSM-2* (v2) Hemicot

SEC ID NO: 4 es la secuencia de proteína reconstruida

SEC ID NO: 5 es el cebador PTU de *Pat* (MAS 123).

SEC ID NO: 6 es el cebador PTU de *Pat* (Per 5-4).

SEC ID NO: 7 es el cebador de la región codificadora de *Pat*

SEC ID NO: 8 es el cebador de la región codificadora de *Pat*

SEC ID NO: 9 es el cebador de la región codificadora de *DSM-2* (v2)

SEC ID NO: 10 es el cebador de la región codificadora de *DSM-2* (v2)

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un gen novedoso que se denomina *DSM-2* en la presente. Este gen fue identificado en el *Streptomyces coelicolor* (A3). La proteína del *DSM-2* está relacionada en forma distante con el PAT y el BAR (30 y 28% de identidad de aminoácido, respectivamente). La presente invención además provee genes optimizados de plantas, que codifican las proteínas del *DSM-2*, con una tendencia hemicot, por ejemplo. El *DSM-2* se puede utilizar como característica transgénica para impartir tolerancia en plantas y células de plantas a los herbicidas glufosinato, fosfinotricin y bialafos. Existe un valor inherente elevado para estos genes simplemente como marcadores seleccionables para proyectos de biotecnología. Sin embargo, otros usos son posibles de acuerdo con la presente invención.

El *DSM-2* puede ser útil como una característica transgénica para impartir tolerancia a las plantas a los herbicidas glufosinato, fosfinotricina y bialafos.

En algunas realizaciones preferidas, (separado de o agregado a los cultivos tolerantes al herbicida - CTH) es un marcador seleccionable para escoger en forma exitosa

células transformadas, y plantas completas en el cultivo, en el invernadero y en el campo. Este gen y homólogos similares se pueden utilizar en lugar del *pat* y/o *bar*. Una realización, como ejemplo de la presente, es el uso del DSM-2 como marcador seleccionable en las células de tabaco NT-1. Los genes de la invención también se pueden utilizar como marcadores seleccionables en otros sistemas de planta tales como el maíz y el arroz.

El uso de este gen como marcador seleccionable en un sistema bacteriano puede incrementar la eficiencia para todas las transformaciones de planta. El uso de DSM-2 como el único marcador seleccionable elimina la necesidad de un marcador antibiótico medicinal adicional (tal como el de resistencia a la ampicilina) durante la clonación.

Los experimentos demostraron que la línea celular BL21 - Star (DE3) de la *Escherichia coli* (Invitrogen catalogo #C6010-03) fue inhibida con el mínimo del medio que contenía una concentración de 100 µg/ml glufosinato de amonio (Basta). La expresión del DSM-2 en la línea celular BL21 Star complementó la resistencia en el mínimo del medio que contenía 400 µg/ml de glufosinato. Estos experimentos indican que la expresión del DSM-2 se puede utilizar como un marcador seleccionable antibiótico no-medicinal para aplicaciones de clonación en bacterias que son inhibidas por el glufosinato.

Otros experimentos demostraron que los promotores PolyUbiquitin 10 (en Ubi10) de la planta *Arabidopsis thaliana* y el promotor viral del virus Cassava Vein Mosaic (CsVMV) son funcionales en la cepa BL21 Star de *E. coli* (DE3). Ambos promotores expresaron suficiente proteína del DSM-2 para proveer resistencia con el mínimo del medio que contenía 200 µg/ml de glufosinato. Estos promotores de planta se pueden utilizar para conducir la expresión de DSM-2 como marcador seleccionable antibiótico no-medicinal en la *E. coli*. La funcionalidad de un único promotor de planta tanto para las bacterias como para las plantas elimina el requerimiento de marcadores seleccionables separados para cada especie.

Este gen también se puede utilizar como la base para un nuevo sistema de transformación de plantas en conjunto con una cepa modificada de *Agrobacterium*. De acuerdo con la presente invención, también se pueden producir nuevas cepas de *Pseudomonas fluorescens*, u otras cepas microbianas, para la producción de proteína utilizando genes marcadores de resistencia antibiótica no-medicinal. La mejora en los procesos de clonación y transformación y de la eficiencia por eliminación de la purificación del fragmento, aparte de los elementos de resistencia antibiótica medicinal, también puede ser un beneficio.

Además de las características CTH, los métodos para controlar malezas utilizando herbicidas por lo cual se crea tolerancia al herbicida por los genes mencionados en los cultivos transgénicos, también están dentro del alcance de la presente invención. La combinación de la característica CTH presente también es beneficiosa cuando se combina con otras características CTH (que incluye, pero sin estar limitado a, tolerancia al glifosato y tolerancia al 2,4-D), particularmente para controlar las especies con resistencia recientemente adquirida o tolerancia inherente a un herbicida (tal como el glifosato). Además, cuando se

rotan los cultivos tolerantes al glifosato (los cuales se están convirtiendo, cada vez más, en prevalentes en todo el mundo) con otros cultivos tolerantes al glifosato, se puede dificultar el control de los contribuyentes resistentes al glifosato. De este modo, el uso de estas características transgénicas apiladas o transformadas en forma individual en los cultivos puede aportar una herramienta para el control de otros cultivos contribuyentes con CTH.

Proteínas (y aislados de fuentes de proteínas) de la presente invención. La presente invención provee proteínas funcionales. Por "actividad funcional" (o "activa") se entiende en el presente documento que las proteínas/enzimas para uso de acuerdo con la presente invención tienen la capacidad de degradar o disminuir la actividad de un herbicida (solos o en combinación con otras proteínas). Las plantas que producen proteínas de la presente invención preferentemente producirán "una cantidad efectiva" de la proteína de manera que cuando la planta sea tratada con un herbicida, el nivel de la expresión de proteína sea suficiente para dar a la planta resistencia o tolerancia completa o parcial al herbicida (a una tasa típica, a menos que se especifique otra cosa; tasas de aplicación típica pueden ser halladas en el reconocido *Herbicide Handbook* (Weed Science Society of America, Eighth Edition, 2002), por ejemplo). El herbicida puede ser aplicado a tasas que normalmente matarían la planta blanco, en las concentraciones y tasas de uso normales en el campo. (A causa de la presente invención, el nivel y/o la concentración pueden opcionalmente ser más altos que los que se usaron previamente.) Preferentemente, las células de las plantas y las plantas de la presente invención están protegidas contra la inhibición del crecimiento o los daños causados por el tratamiento del herbicida. Las plantas y las células de las plantas transformadas de la presente invención han dado preferentemente resistencia o tolerancia a un herbicida, como se comenta en el presente documento, lo que significa que la planta y las células de las plantas transformadas pueden crecer en presencia de cantidades efectivas de uno o más herbicidas, como se comenta en este documento. Las proteínas preferidas de la presente invención tienen actividad catalítica para metabolizar uno o más compuestos de ariloxialcanatos. No se puede discutir fácilmente el término "resistencia" sin usar el verbo "tolerar" o el adjetivo "tolerante". La industria ha gastado innumerables horas debatiendo los Cultivos Tolerantes a Herbicidas (CTH) contra los Cultivos Resistentes a Herbicidas (CRH). El término preferido en la industria es CTH. Sin embargo, la definición de la Weed Science Society of America es "La habilidad inherente de una planta a sobrevivir y reproducir enseguida de la exposición a una dosis de herbicida normalmente letal para el tipo silvestre. En una planta, la resistencia puede ser de ocurrencia natural o inducida por técnicas tales como ingeniería genética o selección de variantes producidas por cultivo de tejidos o mutagénesis." Como es usado en este documento a menos que se indique otra cosa, la resistencia a herbicidas es heredable y le permite a una planta crecer y reproducirse en presencia de un tratamiento de acción herbicida típicamente efectivo por un herbicida para una planta dada, como se sugiere por la edición actual de *The Herbicide Handbook* tanto como el documento de la presente divulgación. Como se reconoce por los experimentados en la técnica, una planta puede todavía ser considerada "resistente" aunque sea aparente algún grado de daño de la planta a partir de la exposición al herbicida. Como se usa en el

presente documento el término "tolerancia" es un término más amplio que el término "resistencia" e incluye la "resistencia" como se define en el presente documento, así como la capacidad incrementada de una planta particular para aguantar los varios grados de daños inducidos por acción herbicida que típicamente resultan en las plantas de tipo silvestre del mismo genotipo con la misma dosis del herbicida.

La transferencia de la actividad funcional a la planta o a los 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 para el huésped en el cual el vector residirá. Una forma de obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína con actividad funcional consiste en aislar el material genético nativo a partir de la especie bacteriana que produce la proteína de interés, utilizando la información deducida de la secuencia de aminoácidos de la proteína, según se divulga en la presente. Las secuencias nativas se pueden optimizar por la expresión en plantas, por ejemplo, según se menciona en más detalle a continuación. También puede diseñarse un polinucleótido optimizado basado en la secuencia proteínica.

Una forma de caracterizar estas clases de proteínas y los polinucleótidos que las codifican es definiendo un polinucleótido por su capacidad para generar híbridos bajo un rango de condiciones especificadas, con una secuencia ejemplificada de nucleótido (el complemento de la misma y/o una sonda o sondas derivadas de cualquier cepa) y/o por su capacidad de ser amplificado por PCR que utiliza cebadores derivados de las secuencias ejemplificadas.

Existe una cantidad de métodos para obtener proteínas para uso de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos para las proteínas divulgadas en la presente se pueden utilizar para identificar y aislar otras proteínas a partir de una mezcla de proteínas. Específicamente, se pueden aumentar los anticuerpos para las porciones de las proteínas que son más conservadas o más diferentes, en comparación con otras proteínas relacionadas. Estos anticuerpos se pueden utilizar luego para identificar específicamente proteínas equivalentes con la actividad característica por inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), o inmuno-transferencia. Los anticuerpos para las proteínas divulgadas en la presente, o para las proteínas equivalentes, o para los 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 ejemplificada o sugerida.

Con los beneficios de la presente divulgación, las proteínas y los genes de la presente invención se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes, que incluyen una variedad de microorganismos tales como bacterias recombinantes y/o del tipo silvestre, por ejemplo.

Los mutantes de los aislados bacterianos se pueden producir mediante procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los mutantes asporogénicos se pueden obtener a través de la mutagénesis de un aislado en sulfonato de

etilmetano (EMS). Los mutantes se pueden producir utilizando luz ultravioleta y nitrosoguanidina mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Una proteína "de" o "que puede obtenerse a partir de" cualquiera de los aislados a los que se hace referencia o se sugieren en la presente significa que la proteína (o una proteína similar) se puede obtener a partir del aislado o de alguna otra fuente, tal como otra cepa bacteriana o una planta. El término "derivado de" también tiene su connotación, e incluye proteínas que pueden obtenerse a partir de un tipo dado de bacteria que se modifica por expresión en una planta, por ejemplo. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que dada la divulgación de un gen bacteriano y su proteína, se puede diseñar genéticamente una planta para producir la proteína. Las preparaciones de anticuerpos, las sondas de ácido nucleico (ADN, ARN, o ANP, por ejemplo), y similares se pueden preparar utilizando las secuencias de polinucleótidos/o aminoácidos divulgadas en la presente y utilizadas para rastrear y recuperar otros genes relacionados a partir de otras fuentes (naturales).

Se pueden utilizar las técnicas estándar de biología molecular para clonar y secuenciar las proteínas y los genes descritos en la presente. Se puede hallar información adicional en Sambrook *et al.*, 1989, el cual se incorpora a la presente como referencia.

Polinucleótidos y sondas. La presente invención provee además secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas para uso de acuerdo con la presente invención. La presente invención además provee métodos para identificar y caracterizar genes que codifican proteínas que tienen la actividad herbicida deseada. En una realización, la presente invención provee secuencias de nucleótidos únicas que son útiles como sondas de generación de híbridos y/o cebadores para las técnicas de PCR. Los cebadores producen fragmentos de genes característicos que se pueden utilizar para la identificación, caracterización y/o aislamiento de genes específicos de interés. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención codifican proteínas que son diferentes de las proteínas descritas previamente.

Los polinucleótidos de la presente invención se pueden utilizar para formar "genes" completos para codificar proteínas o péptidos en una célula huésped deseada. Por ejemplo, como reconocerán los expertos en la técnica, los polinucleótidos de la presente invención se pueden colocar en forma apropiada bajo el control de un promotor en un anfitrión de interés, como bien se conoce en la técnica. El nivel de la expresión genética y la expresión específica temporal/en tejido puede impactar enormemente en la utilidad de la invención. En general, mayores niveles de expresión de la proteína de un gen degradante darán por resultado una degradación más rápida y más completa de un sustrato (en este caso un herbicida blanco). Se desearía que los promotores expresen el gen blanco a niveles altos, a menos que la expresión alta tenga como consecuencia un impacto negativo sobre la salud de la planta. Típicamente, sería deseable tener el gen DSM-2 expresado constitutivamente en todos los tejidos para la completa protección de la planta en todos los estadios del crecimiento. Sin embargo, se podría utilizar en forma alternativa un gen de resistencia expresado vegetativamente; esto permitiría el uso del herbicida blanco durante el cultivo, para el control de

las malezas, y controlaría además la reproducción sexual del cultivo blanco mediante la aplicación durante la etapa de florecimiento.

Como conocen los expertos en la técnica, el ADN existe característicamente en forma bicatenaria. En esta disposición, una cadena es complementaria de la otra cadena y viceversa. A medida que el ADN se replica en una planta (por ejemplo), se producen cadenas complementarias adicionales de ADN. La "cadena codificadora" a menudo se utiliza en la técnica para referirse a la cadena que se liga a la cadena que va en sentido contrario. El ARNm se transcribe de la cadena que va en sentido contrario del ADN. La cadena "homosentido" o "codificador" tiene una serie de codones (un codón es tres nucleótidos que se pueden leer como una unidad de tres residuos para especificar un aminoácido particular) que puede leerse como un marco de lectura abierto (ORF) para formar una proteína o péptido de interés. Con el fin de producir una proteína in vivo, típicamente se transcribe una cadena de ADN en una cadena complementaria de ARNm que 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 cadenas complementarias. El ARN y el ANP (ácidos nucleicos peptídicos) que son funcionalmente equivalentes a las moléculas de ADN ejemplificadas, están incluidos en la presente invención.

En una realización de la presente invención, los aislados bacterianos se pueden cultivar en condiciones que dan por resultado una alta multiplicación del microbio. Después de tratar el microbio para dar un ácido nucleico genómico de monocatenario, el ADN se puede poner 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 de los genes de interés. Otros aspectos de la presente invención incluyen genes y aislados que se identificaron utilizando los métodos y secuencias de nucleótidos divulgadas en la presente. Los genes identificados de este modo pueden codificar las proteínas de resistencia a herbicidas de la presente invención.

Por ejemplo, las proteínas y los genes para uso de acuerdo con la presente invención se pueden identificar y obtener utilizando sondas de oligonucleótidos. Estas sondas son secuencias de nucleótidos detectables que se pueden detectar en virtud de una etiqueta apropiada o se pueden producir 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 los polinucleótidos) de la presente invención además pueden tener inosina (una base neutral capaz de aparearse con las otras cuatro bases; algunas veces utilizadas en lugar de una mezcla de las cuatro en las sondas sintéticas) y/u otras bases sintéticas (no-naturales). De este modo, donde se hace referencia a un oligonucleótido degenerado, sintético, y se utiliza "N" o "n" en forma genérica, "N" o "n" puede ser G, A, T, C, o inosina. Los códigos de ambigüedad tal como se utilizan en

la presente están de acuerdo con las convenciones IUPAC estándar vigentes a la fecha de presentación de la presente solicitud (por ejemplo, R significa A o G, Y significa C o T, etc.).

Como es bien conocido en la técnica, si una molécula de sonda forma híbrido con una muestra de ácido nucleico, puede suponerse razonablemente que la sonda y la muestra tienen homología/similitud/identidad sustancial. Con preferencia, se lleva a cabo primero la hibridación del polinucleótido seguido de lavados en condiciones de rigurosidad baja, moderada o alta mediante técnicas bien conocidas en el arte, según se describe, por ejemplo, en Keller, G.H., M.M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, NY, págs. 169-170. Por ejemplo, como se establece en la presente, las condiciones de rigurosidad baja se pueden obtener lavando primero con 2x SSC (citrato en solución salina estándar)/0,1 % de SDS (dodecil sulfato de sodio) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Típicamente se realizan dos lavados. Mayor rigurosidad se puede obtener, entonces, disminuyendo la concentración de sal y/o elevando la temperatura. Por ejemplo, el lavado descrito anteriormente puede ser seguido de dos lavados con 0,1 x SSC/0,1 % de SDS durante 15 minutos cada uno a temperatura ambiente seguido de lavados subsiguientes con 0,1x SSC/0,1% de SDS durante 30 minutos cada uno a 55°C. Estas temperaturas se pueden utilizar con otros protocolos de hibridación y lavado establecidos en la presente y serían de conocimiento de los expertos en la técnica (se puede utilizar SSPE como la 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 al 10% a 445 ml de agua. Se puede preparar 20x SSC combinando NaCl (175,3 g/0,150 M), citrato sódico (88,2 g/0,015 M), y agua, ajustando el pH hasta 7,0 con NaOH 10 N, luego ajustando el volumen hasta 1 litro. Se puede preparar SDS al 10% disolviendo 10 g de SDS en 50 ml de agua esterilizada en autoclave, luego diluyendo hasta 100 ml.

La detección de la sonda provee un medio para determinar de manera conocida si la hibridación ha sido mantenida. Dicho análisis de sonda provee un método rápido para identificar genes de la presente invención. Los segmentos de nucleótido utilizados como sondas de acuerdo con la invención se pueden sintetizar utilizando un sintetizador de ADN y procedimientos estándar. Estas secuencias de nucleótidos se pueden utilizar además como cebadores de PCR para amplificar los genes de la presente invención.

Las características de hibridación de una molécula se pueden utilizar para definir los polinucleótidos de la presente invención. De este modo la presente invención incluye polinucleótidos (y/o sus complementos, preferentemente sus complementos completos) que forman híbridos con un polinucleótido ejemplificado en la presente. Es decir, una forma de definir un gen (y la proteína que éste codifica), por ejemplo, es mediante su capacidad de formar híbridos (en cualquiera de las condiciones específicamente divulgadas 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 las condiciones que obtienen el mismo, o casi el mismo, grado de especificidad de hibridación como con las condiciones empleadas por los actuales solicitantes. Específicamente, la hibridación de ADN inmovilizado en transferencias Southern con sondas

genéticas específicas marcadas con P^{32} , se pueden realizar mediante métodos estándar (ver, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1982). En general, la hibridación y los lavados posteriores se pueden llevar a cabo en condiciones que permiten la detección de secuencias blanco. Para las sondas genéticas de ADN bicatenario, la hibridación se puede llevar a cabo durante toda la noche a 20-25° C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido de ADN en 6x SSPE, 5x solución de Denhardt, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturalizado. La temperatura de fusión se describe mediante la siguiente fórmula (Beltz *et al.* 1983):

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \text{ Log}[\text{Na}^+] + 0,41(\%G+C) - 0,61(\%$$

formamida) - 600/longitud del doble de pares de base.

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

Para sondas de oligonucleótidos, la hibridación se puede llevar a cabo durante toda la noche a 10-20°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido en 6x SSPE, 5x solución de Denhardt, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturalizado. La T_m para las sondas de oligonucleótidos se puede determinar mediante la siguiente fórmula: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(\text{número T/A de pares de base}) + 4(\text{número G/C de pares de base})$

(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% 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 rigurosidad moderada).

En general, la sal y/o la temperatura se pueden modificar para cambiar la rigurosidad. Con un fragmento de ADN etiquetado > a 70 pares de bases poco más o menos de longitud, se pueden utilizar las siguientes condiciones:

Baja: 1 o 2x SSPE, temperatura ambiente

Baja: 1 o 2x SSPE, 42° C

Moderada: 0,2x o 1 x SSPE, 65° C

Alta: 0,1xSSPE, 65° C.

La formación doble y la estabilidad dependen de la complementariedad sustancial entre las dos cadenas de un híbrido, y, según se mencionó anteriormente, un cierto grado de apareamiento erróneo se puede tolerar. Por lo tanto, las secuencias de sonda de la presente invención incluyen mutaciones (tanto simples como múltiples), supresiones, inserciones de las secuencias descritas, 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 dada de polinucleótidos en muchas formas, y estos métodos son conocidos por un experto en la técnica. En el futuro se podrán conocer otros métodos.

Tecnología PCR. La reacción en cadena de polimerasa es una síntesis repetitiva, enzimática, cebada de una secuencia de ácido nucleico. Este procedimiento es bien conocido y normalmente utilizado por 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 flanqueado por dos cebadores oligonucleótidos que hibridan a cadenas opuestas de la secuencia blanco. Los cebadores se orientan preferentemente con los extremos 3' que apuntan uno con otro. Los ciclos repetidos de la desnaturalización por calor del molde, la fijación por calor de los cebadores a sus secuencias complementarias y la extensión de los cebadores fijados con una polimerasa de ADN da por resultado la amplificación del segmento definido por los extremos 5' de los cebadores de PCR. El producto de la extensión de cada cebador puede ser útil como molde para el otro cebador, de modo que cada ciclo esencialmente dobla la cantidad del fragmento de ADN producido en el ciclo previo. Esto da por resultado la acumulación exponencial del fragmento blanco específico, hasta varios millones de veces en pocas horas. Al utilizar una polimerasa de ADN tal como polimerasa *Taq*, aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, el proceso de amplificación puede ser completamente automatizado. Otras enzimas que pueden usarse son conocidas por los expertos en la técnica.

Las secuencias de ADN ejemplificadas, o sus segmentos, se pueden utilizar como cebadores para la amplificación por PCR. Al realizar la amplificación por PCR, se puede tolerar un cierto grado de apareamiento erróneo entre el cebador y el molde. Por lo tanto, las mutaciones, supresiones e inserciones (especialmente las adiciones de nucleótidos en el 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 con otros genes y proteínas para producir proteínas quiméricas y de fusión. Los genes y las proteínas utilizables de acuerdo con la presente invención incluyen no sólo las secuencias de longitud completa específicamente ejemplificadas, sino además porciones, segmentos y/o fragmentos (que incluyen fragmentos contiguos y supresiones internas y/o terminales en comparación con las moléculas de longitud completa) de estas secuencias, variantes, mutantes, quiméricos, y fusiones de las mismas. Las proteínas de la

presente invención pueden tener aminoácidos sustituidos en la medida que retengan la actividad funcional deseada. Los genes "variantes" tienen secuencias de nucleótidos 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 los sustratos blanco y secuencias equivalentes como las proteínas ejemplificadas. Tal como se utiliza en la presente, la referencia a una secuencia "equivalente" se refiere a secuencias que tienen sustituciones, supresiones, agregados 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 que un fragmento correspondiente de una proteína ejemplificada están dentro del alcance de la presente invención. Los cambios, tales como sustituciones o adiciones de aminoácidos, se pueden llevar a cabo para una variedad de fines, tales como aumento (o disminución) de la estabilidad de la proteasa de la proteína (sin disminuir en forma material/sustancial la actividad funcional de la proteína), eliminando o agregando un sitio de restricción, y similar. Las variantes de genes se pueden construir fácilmente utilizando técnicas estándar para realizar mutaciones puntuales, por ejemplo.

Además, la Patente Estadounidense No. 5.605.793, por ejemplo, describe métodos para generar la diversidad molecular adicional utilizando el reensamblaje de ADN después de la fragmentación aleatoria o focalizada. Esto puede denominarse "entremezclar" un gen, lo cual 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 del sustrato alterada, estabilidad enzimática aumentada, estereoespecificidad alterada, u otras características.

El entremezclado (shuffling) se puede diseñar y especificar después de obtener y examinar las coordenadas atómicas 3D (en tres dimensiones) y la estructura cristalina de una proteína de interés. De este modo, el "entremezclado focalizado" puede estar dirigido a ciertos segmentos de una proteína que son ideales para la modificación, tal como segmentos expuestos a la superficie, y preferentemente segmentos no internos que estén involucrados con el plegamiento de la proteína y la esencial integridad estructural en 3D.

Los genes variantes se pueden utilizar para producir proteínas variantes; huéspedes recombinantes pueden ser utilizados para producir las proteínas variantes. Al utilizar el "entremezclado de genes" y otras técnicas, se pueden construir genes y proteínas equivalentes que comprenden ciertos segmentos que tienen ciertos residuos contiguos (aminoácido o nucleótido) de cualquier secuencia ejemplificada en la presente. Tales técnicas se pueden ajustar para obtener proteínas equivalentes/funcionalmente activas que tienen, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49,

50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, y 170 residuos de aminoácidos contiguos correspondientes a un segmento (del mismo tamaño) en cualquiera de las secuencias ejemplificadas o sugeridas. Los polinucleótidos que codifican tales segmentos, particularmente para regiones de interés, también se incluyen en la presente invención y se pueden utilizar como sondas y/o cebadores, especialmente para regiones conservadas.

Los fragmentos de los genes de longitud completa se pueden producir utilizando las exonucleasas o endonucleasas disponibles en el comercio de acuerdo con los procedimientos estándar. Por ejemplo, las enzimas tales como Ba/31 o mutagénesis dirigida al sitio se pueden utilizar para cortar en forma sistemática los nucleótidos de los extremos de estos genes. Además, los genes que codifican los fragmentos activos se pueden obtener utilizando una variedad de enzimas de restricción. Las proteasas se pueden utilizar para obtener en forma directa fragmentos de estas proteínas.

Está dentro del alcance de la invención según se divulga en la presente que las proteínas se pueden truncar y aún retener la actividad funcional. Por "proteína truncada" se entiende que una porción de una proteína puede escindirse mientras la proteína truncada restante retiene y exhibe la actividad deseada después de la escisión. La escisión se puede obtener por varias proteasas. Más aún, las proteínas efectivamente escindidas se pueden producir 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 truncado, dichas proteínas se pueden expresar en sistemas heterólogos tales como *E. coli*, baculovirus, sistemas virales basados en plantas, levadura, y similares y luego se colocan en ensayos de insectos según se divulga en la presente para determinar la actividad. Es bien conocido en la técnica que las proteínas truncadas se pueden producir en forma exitosa de modo que retengan la actividad funcional mientras que tienen menos del total de la secuencia de longitud completa. Por ejemplo, las proteínas *B.t.* se pueden utilizar en una forma truncada (proteína de núcleo) (ver, por ejemplo, Hófte *et al.* (1989), y Adang *et al.* (1985)). Tal como se utiliza en la presente, el término "proteína" puede incluir truncados 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 específicamente ejemplificadas en la presente. Como estas proteínas son meramente ejemplares de las proteínas de la presente invención, debe ser fácilmente evidente que la presente invención comprenda proteínas variantes o equivalentes (y secuencias de nucleótidos que codifican sus equivalentes) que tiene la misma o similar actividad de las proteínas ejemplificadas. Las proteínas equivalentes tendrán similitud de aminoácido (y/o homología) con una proteína ejemplificada. La identidad del aminoácido será típicamente al menos 60%, preferentemente al menos 75%, con mayor preferencia al menos 80%, aún con mayor preferencia al menos 90%, y puede ser por lo menos 95%. Las proteínas preferidas de la presente invención también se pueden definir en términos de rangos de similitud y/o identidad 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 puede ser utilizado para definir los límites superiores e 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 y Altschul, 1990, modificado como en Karlin & Altschul 1993. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se realizan con el programa NBLAST, puntuación = 100, largo de la palabra = 12. El programa Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul *et al.*, 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros por omisión de los respectivos programas (NBLAST y XBLAST). Ver sitio web NCBI/NIH. Para obtener los alineamientos discontinuos a los fines de comparación, la función AlignX del Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., North Bethesda, MD, USA), se utilizó empleando los parámetros por omisión. Estos eran: una penalización de la apertura Gap de 15, una penalización de extensión Gap de 6,66, y un rango de penalización de separación Gap de 8.

Varias propiedades y características tridimensionales de la proteína también se pueden cambiar sin afectar adversamente la actividad/funcionalidad de la proteína. Se pueden tolerar/producir sustituciones conservadoras de aminoácidos para no afectar adversamente la actividad y/o la configuración tridimensional de la molécula. Los aminoácidos se pueden colocar en las siguientes clases: no polar, polar sin cargar, básico, ácido. Las sustituciones conservadoras por las cuales un aminoácido de una clase se reemplaza con otro aminoácido del mismo tipo están dentro del alcance de la presente invención en la medida en que la sustitución no sea adversa a la actividad biológica del compuesto. La **Tabla 2** provee un listado de ejemplos de aminoácidos que pertenecen a cada clase.

Tabla 2	
Clase de Aminoácido	Ejemplos de aminoácidos
No polar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polar sin cargar	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácido	Asp, Glu
Básico	Lys, Arg, His

En algunos casos, también se pueden realizar sustituciones no conservadoras. Sin embargo, las sustituciones preferidas no restan mérito significativo a 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 están en un estado diferente del cual se hallarían en la naturaleza. De este modo, la referencia a "aislado" o "purificado" significa la participación 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 divulgadas en la presente. Está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica 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 describe en detalle en la sección titulada "Optimización de la secuencia para la expresión en plantas."

Optimización de la secuencia para la expresión en plantas. Para obtener una elevada expresión de los genes heterólogos en plantas, en general se prefiere someter los genes a reingeniería de modo que estén más eficientemente expresados en las células de planta (en el citoplasma de las). El maíz es una planta de este tipo donde previamente a la transformación se puede preferir rediseñar los genes heterólogos para aumentar su nivel de expresión en dicha planta. Por lo tanto, un paso adicional en el diseño de los genes que codifican una proteína bacteriana consiste en someter a reingeniería a un gene heterólogo para la expresión óptima, utilizando la predisposición del codón más íntimamente alineado con la secuencia de la planta blanco, sea una especie dicotiledónea o una monocotiledónea. Las secuencias también pueden ser optimizadas para la expresión en cualquiera de los tipos más particulares mencionados en otras partes en la presente.

Huéspedes transgénicos. Los genes que codifican la proteína 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 las células de planta) son maíz, *Arabidopsis*, tabaco, sojas, algodón, cáñola, arroz,

trigo, turba y pasturas, y similares. Otros tipos de plantas transgénicas se pueden producir de acuerdo con la presente invención, tales como frutas, vegetales, plantas ornamentales, y árboles. En forma más general, las dicotiledóneas y las monocotiledóneas se pueden utilizaren varios aspectos de la presente invención.

De este modo, la presente invención se puede adaptar para uso con plantas vasculares y no vasculares que incluyen monocotiledóneas y dicotiledóneas, coníferas, bryophyta, algas, hongos, y bacterias. Las células animales y los cultivos de células animales también son una posibilidad.

En realizaciones preferidas, la expresión del gen da por resultado, directa o indirectamente, la producción intracelular (y el mantenimiento) de las proteínas de interés. De esta manera las plantas pueden ser convertidas en resistentes al herbicida. 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 las bacterianas) se pueden producir y utilizar de acuerdo con las técnicas estándar, con el beneficio de la presente divulgación. Las células de planta transfectadas con un polinucleótido de la presente invención se pueden regenerar en plantas enteras. La presente invención incluye cultivos de células que incluyen cultivos de célula de tejidos, cultivos líquidos y cultivos en placas. Las semillas producidas y/o utilizadas para generar plantas de la presente invención también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Otros tejidos y partes de planta también se incluyen en la presente invención. La presente invención de igual modo, incluye métodos para producir plantas o células que comprenden un polinucleótido de la presente invención. Un método preferido para producir tales plantas consiste en la siembra 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 planta, y otras células huéspedes con polinucleótidos de la presente invención que expresan las proteínas de la presente invención. Las plantas transformadas de esta manera pueden ser convertidas en resistentes a una variedad de herbicidas con diferentes modos de acción.

Una amplia variedad de métodos están disponibles para introducir un gen que codifica una proteína deseada en el huésped blanco en condiciones que permitan un mantenimiento y expresión estable del gen. Estos métodos son bien conocidos por 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 *DSM-2* están incluidos en el alcance de la presente invención. Por ejemplo, un gran número 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 preparar la inserción de genes foráneos en plantas más altas. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, serie pUC, serie M13mp, pACYC184, etc. En consecuencia, la secuencia que codifica la proteína puede se inserta en el

vector de un sitio de restricción adecuado. El plásmido resultante se utiliza para la transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutriente adecuado, luego se cosechan y se someten a lisis. El plásmido se recupera por purificación a partir del ADN genómico. Como métodos de análisis, en general, se llevan a cabo el análisis de la secuencia, el análisis de restricción, la electroforesis, y otros métodos biológicos moleculares-bioquímicos. 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, luego al menos el borde derecho, pero a menudo el borde derecho y el izquierdo del ADN-T del plásmido Ti o Ri, debe unirse como la región flanqueante de los genes a ser insertos. El uso de ADN-T para la transformación de células de planta ha sido intensamente investigado y descrito en EP 120 516; Hoekema (1985); Fraley *et al.* (1986); y An *et al.* (1985).

Una gran cantidad de técnicas están disponibles para insertar ADN en una célula huésped de planta. Esas técnicas incluyen la transformación con ADN-T que utiliza *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformación, fusión, inyección, biolística (bombardeo de micropartículas), bigotes de carburo de silicio, emisión de aerosol, PEG, o electroporación como así también otros métodos posibles. Si se utilizan *Agrobacteria* para la transformación, el ADN a ser inserto debe ser clonado en plásmidos especiales, ya sea en un vector intermedio o dentro de un vector binario. Los vectores intermedios se pueden integrar en el plásmido Ti o Ri por recombinación homóloga debido a las secuencias que son homólogas a las secuencias en el ADN-T. El plásmido Ti o Ri también comprende la región vir necesaria para la transferencia del ADN-T. Los vectores intermedios no pueden replicarse a sí mismos en las *Agrobacterias*. El vector intermedio puede ser transferido en el *Agrobacterium tumefaciens* por medio de un plásmido colaborador (conjugación). Los vectores binarios pueden replicarse a sí mismos en *E. coli* y en *Agrobacterias*. Comprenden un gen marcador de selección y un conector o policonector el cual está enmarcado por las regiones fronterizas del ADN-T derecha e izquierda. Se pueden transformar directamente en *Agrobacterias* (Holsters, 1978). El *Agrobacterium* utilizado como célula huésped debe comprender un plásmido que transporte una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia de ADN-T en la célula de planta. Puede contener otro ADN-T. La bacteria así transformada se utiliza para la transformación de células de planta. Las explantas de planta se pueden cultivar en forma ventajosa con el *Agrobacterium tumefaciens* o el *Agrobacterium rhizogenes* para la transferencia del ADN en la célula de planta. Las plantas enteras luego se pueden regenerar a partir del material de planta infectado (por ejemplo, partes de hoja, segmentos de tallo, raíces pero además protoplastos o células cultivadas por suspensión) en un medio adecuado, el cual puede contener antibióticos o biocidas para la selección. Las plantas obtenidas de este modo luego se pueden ensayar para la presencia del ADN inserto. No se realizan demandas especiales de los plásmidos en el

caso de inyección y electroporación. Es posible utilizar plásmidos ordinarios, tales como por ejemplo derivados de pUC.

Las células transformadas se desarrollan dentro de las plantas en la forma usual. Pueden formar células germinales y transmitir las característica(s) transformada(s) a las plantas progenies. Tales plantas se pueden desarrollar en la forma normal y se pueden cruzar con plantas que tienen los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los híbridos resultantes individuales tienen las correspondientes propiedades fenotípicas.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, los genes que codifican la proteína bacteriana se expresan a partir de unidades de transcripción insertas en el genoma de la planta. Con preferencia, dichas unidades de transcripción son vectores recombinantes capaces de una integración estable en el genoma de 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, es relativamente estable allí (y no sale nuevamente). Normalmente contiene un marcador de selección que confiere a las células de planta transformadas, resistencia a un biocida o un antibiótico, tales como kanamicina, G418, bleomicina, higromicina, o cloramfenicol, *inter alia*. Los marcadores seleccionables de planta pueden proveer además Resistencia a varios herbicidas tales como glufosinato, (PAT), glifosato (EPSPS), imazetiapir (AHAS), y muchos otros. El marcador empleado individualmente, en consecuencia, debe permitir la selección de células transformadas más que células que no contienen el ADN inserto. El gen o genes de interés se expresan preferentemente ya sea por promotores constitutivos o inducibles en las células de planta. Una vez expresado, el ARNm se traduce en proteínas, incorporando de este modo los 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 mantienen en forma estable y expresan el gen introducido. Tales técnicas incluyen la introducción directamente en las células de material genético recubierto en micropartículas. (Patentes Estadounidenses Nos. 4.945.050 de Cornell y 5.141.131 de DowElanco, ahora Dow AgroSciences, LLC). Además, las plantas se pueden transformar utilizando la tecnología del *Agrobacterium*, ver Patentes Estadounidenses Nos. 5.177.010 de la 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 Schiiperoot; Patentes Estadounidenses Nos. 5.149.645, 5.469.976, 5.464.763 y 4.940.838 y 4.693.976 de Schiiperoot; Solicitudes de Patentes Europeas 116718, 290799, 320500, todas de Max Planck; Solicitudes de Patentes Europeas 604662 y 627752, y la Patente Estadounidense No. 5.591.616, de Japan Tobacco; Solicitudes de Patentes Europeas 0267159 y 0292435, y la Patente Estadounidense No. 5.231.019, todas de Ciba Geigy, ahora Syngenta; Patentes Estadounidenses Nos. 5.463.174 y 4,762,785, ambas de Calgene; y las

Patentes Estadounidenses Nos. 5.004.863 y 5.159.135, ambas de Agracetus. Otra tecnología de transformación incluye la tecnología de pelos. Ver las Patentes Estadounidenses Nos. 5.302.523 y 5.464.765, ambas de Zeneca, ahora Syngenta. Otra tecnología de transformación de administración de ADN directo incluye la tecnología de haces de aerosol. Ver la Patente Estadounidense No. 6.809.232. La tecnología de electroporación también ha sido usada 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 utilizando los métodos descritos en la Patente Estadounidense No. 5.569.597 de Mycogen Plant Science y Ciba-Geigy (ahora Syngenta), así como también las Patentes Estadounidenses Nos. 5.589.367 y 5.316.931, ambas de Biosource, ahora Large Scale Biology.

Como se mencionó previamente, el modo en el cual la construcción de ADN se introduce en el huésped de la planta no es crítico para la invención. Cualquier método que provea una transformación eficiente se puede emplear. Por ejemplo, varios métodos para la transformación de la célula de planta se describen en la presente e incluyen el uso de plásmidos de Ti o Ri y similares para realizar la transformación mediada por el *Agrobacterium*. En muchos casos, será deseable tener la construcción para la transformación confinada en uno o en ambos lados por los bordes del ADN-T, más específicamente por el borde derecho. Esto es particularmente útil cuando la construcción utiliza el *Agrobacterium tumefaciens* o el *Agrobacterium rhizogenes* como modo para la transformación, si bien los bordes del ADN-T pueden encontrar su uso con otros modos de transformación. Donde se utiliza el *Agrobacterium* para la transformación de la célula de planta, se puede utilizar un vector el cual puede ser introducido en el huésped para la recombinación homologa con ADN-T o el plásmido Ti o Ri presente en el huésped. La introducción del vector se puede realizar mediante electroporación, conjugación triparental y otras técnicas para la transformación de las bacterias gram-negativas las cuales son conocidas por los expertos en la técnica. La manera de la transformación del vector en el huésped *Agrobacterium* no es crítica para la invención. El plásmido Ti o Ri que contiene el ADN-T para la recombinación puede ser capaz o incapaz de originar la formación de la agalla, y no es crítica para dicha invención en la medida que los genes vir estén presentes en dicho huésped.

En algunos casos en donde se utiliza el *Agrobacterium* para la transformación, la construcción de la expresión que está dentro de los bordes del ADN-T se insertará en un vector de amplio espectro tal como el pRK2 o sus derivados como se describe en Ditta *et al.* (1980) y en la EPO 0 120 515. Se incluyen dentro de la construcción de la expresión y el ADN-T uno o más marcadores según se describe en la presente los cuales permitirán la selección del *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*, las explantadas se pueden combinar e incubar con el *Agrobacterium* transformado durante el tiempo suficiente para permitir su transformación. Después de la transformación, las *Agrobacterias* se asesinan por selección con el antibiótico apropiado y las células de planta se cultivan con el medio selectivo apropiado. Una vez que se formaron los callos, la formación del brote se puede estimular empleando las hormonas de planta apropiadas de acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica del cultivo de tejido de planta y la regeneración de la planta. Sin embargo, un estadio intermedio del callo no siempre es necesario. Después de la formación del brote, dichas células de planta se pueden transferir a un medio el cual estimule la formación de la raíz completando de este modo la regeneración de la planta. Las plantas luego se pueden desarrollar hasta la semilla y dicha semilla se puede utilizar para establecer las futuras generaciones. Sin considerar la técnica de transformación, el gen que codifica una proteína bacteriana se incorpora preferentemente en un vector de transferencia genética adaptado para expresar dicho gen en una célula de planta incluyendo en el vector un elemento regulador del promotor de planta, así como también regiones de terminación de transcripción no-traducidas de 3' tal como Nos y similares.

Además de numerosas tecnologías para transformar las plantas, el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes foráneos puede variar también. Dicho tejido incluiría pero no estaría limitado a tejido embriogénico, tipos de tejido de callo I, II, y III, hipocótilo, meristema, tejido de la raíz, tejidos para la expresión en floema, y similares. Casi todos los tejidos de planta se pueden transformar durante la supresión de la diferenciación utilizando técnicas apropiadas descritas en la presente.

Además de un marcador seleccionable, puede ser deseable utilizar un gen indicador. En algunos casos un gen indicador puede ser utilizado con o sin un marcador seleccionable. Los genes indicadores son genes que típicamente no están presentes en el organismo o tejido receptor y típicamente codifican las proteínas que resultan de algún cambio fenotípico o propiedad enzimática. Ejemplos de tales genes se proveen en Weising *et al.*, 1988. Los genes indicadores preferidos incluyen la beta-glucuronidasa (GUS) del locus *uidA* de *E. coli*, el gen cloramfenicol acetil transferasa de Tn9 de *E. coli*, la proteína fluorescente verde de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*, y los genes de luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*. Un ensayo para detectar la expresión genética indicadora puede realizarse entonces en un tiempo adecuado después de que dicho gen ha sido introducido en las células receptoras. Un ensayo de este tipo abarca el uso del gen que codifica la beta-glucuronidasa (GUS) del locus *uidA* de *E. coli* como lo describió Jefferson *et al.*, (1987) para identificar las células transformadas.

Además de los elementos reguladores del promotor de planta, los elementos reguladores del promotor de una variedad de fuentes se pueden utilizar en forma eficiente en las células de planta para expresar los genes foráneos. Por ejemplo, se pueden utilizar los elementos reguladores del promotor de origen bacteriano, tal como el promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de manopina sintasa; los promotores de

75
43

origen viral, tal como el virus de mosaico de coliflor (35S y 19S), 35T (el cual es un promotor 35S sometido a reingeniería, ver la Patente Estadounidense No. 6.166.302, especialmente el Ejemplo 7E) y similares. Los elementos reguladores del promotor de planta incluyen, pero no están limitados a la subunidad pequeña (ssu) de ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP) carboxilasa, el promotor beta-conglicina, el promotor beta-faseolina, el promotor ADH, los promotores de choque térmico, y los promotores específicos para tejido. Otros elementos tales como las regiones de enlace con la matriz, las regiones de enlace con el andamiaje, intrones, intensificadores, secuencias de poliadenilación y similares pueden estar presentes y de este modo mejorar la eficiencia de transcripción o la 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. Dichos elementos se pueden incluir en el ADN según se desee para obtener un desempeño óptimo del ADN transformado en la planta. Los elementos típicos incluyen, pero sin estar limitados a Adh-intrón 1, Adh-intrón 6, la secuencia líder de la proteína de la envoltura del virus del mosaico de la alfalfa, las secuencias UTR de la osmotina, la secuencia líder de la proteína de envoltura del virus de la lista del maíz, como así también otros disponibles para los expertos en la técnica. Los elementos constitutivos reguladores del promotor también se pueden utilizar, por lo tanto, dirigiendo la expresión genética continua en todos los tipos de células y en todo momento (por ej., actin, ubiquitin, CaMV 35S, y similares). Los elementos reguladores del promotor específico de tejido (por ej., zeina, oleosina, napina, ACP, globulina y similares) y éstos también pueden ser utilizados.

Los elementos reguladores del promotor también pueden ser activos (o inactivos) durante una cierta etapa de desarrollo de la planta así como también activos en los tejidos y órganos de la planta. Ejemplos de éstos incluyen pero no están limitados a los elementos reguladores del promotor específicos del polen, específicos de embrión, específicos del cabello del maíz (corn-silk), específicos de la fibra de algodón, específicos de la raíz, específicos del endospermo de la semilla, o específicos de la fase vegetativa y similares. En ciertas circunstancias puede ser deseable utilizar un elemento regulador del promotor inducible, el cual es responsable de la expresión de los genes en respuesta a una señal específica, tal como: estímulo físico (genes de choque térmico), luz (RUBP carboxilasa), hormona (Em), metabolitos, químicos (respuesta a la tetraciclina), y tensión. Se pueden utilizar también otros elementos deseables para la síntesis de proteínas (traducción) y la transcripción, que funcionan en las plantas. Numerosos vectores de transferencia genética específicos para plantas son conocidos en la técnica.

Los sistemas virales basados en el ARN de la planta también se pueden utilizar para expresar la proteína bacteriana. Al hacer así, el gen que codifica una proteína puede insertarse en la región promotora de la envoltura de un virus de planta adecuado el cual infectará la planta huésped de interés. La proteína puede expresarse luego dando así protección a la planta del daño del herbicida. Los sistemas virales basados en el ARN de plantas se describen en la Patente Estadounidense No. 5.500.360 de Mycogen Plant Sciences, Inc. y

las Patentes Estadounidenses Nos. 5.316.931 y 5.589.367 de Biosource, ahora Large Scale Biology.

Agentes de Selección. Además del glufosinato y el bialafos, los agentes de selección que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen todos los análogos sintéticos y naturales que pueden ser inactivados por el mecanismo de acetiltransferasa mediada por un gen *DSM-2* de la presente invención.

Ver, por ejemplo, la figura 1

A menos que se indique específicamente o quede implícito, los términos "un" "una" y "el/la" significan "al menos uno" tal como se utiliza en la presente.

Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes provisionales, y publicaciones a las que se hace referencia o se citan en la presente se incorporan por referencia en su totalidad en la medida en que no sean inconsistentes con las instrucciones explícitas de estas especificaciones.

A continuación están los ejemplos que ilustran los procedimientos para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no deben considerarse como limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla de solventes son en volumen a menos que se indique de otra manera

.EJEMPLO 1 - MÉTODO PARA IDENTIFICAR LOS GENES QUE IMPARTEN RESISTENCIA AL GLUFOSINATO *IN PLANTA*

Como una forma de identificar los genes que poseen actividades degradantes de herbicidas *in planta*, o en cultivo celular, es posible acceder a bases públicas de datos actualizados tales como NCBI (Centro Nacional para Información de Biotecnología). Para comenzar el proceso, es necesario tener una secuencia genética funcional ya identificada que codifica una proteína con las características deseadas (es decir, fosfinotricin acetiltransferasa). Esta secuencia proteínica se utiliza luego como la entrada para el algoritmo BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico) (Altschul *et al.*, 1997) para comparar contra las depositadas secuencias proteínicas del NCBI disponibles. Al utilizar las configuraciones por omisión, esta búsqueda devuelve arriba de 100 secuencias proteínicas homologas en niveles variados. Estos varían desde las altamente idénticas (85-98%) hasta las de muy baja identidad (23-32%) en el nivel aminoácidos. Tradicionalmente se esperaría que sólo las secuencias con alta homología retengan propiedades similares a las de la secuencia de entrada. En este caso, sólo se eligieron las secuencias resultantes con $\leq$ 50% de homología. Como se ejemplificó en la presente, los homólogos de clonación y de expresión recombinante con tan poco como el 30% de conservación de aminoácidos (relativo al *pat* del *Streptomyces hygroscopicus*) se pueden utilizar para seleccionar los cultivos de células de plantas transformados de los no transformados.

El *DSM-2* se identificó en la base de datos NCBI (ver el sitio web ncbi.nlm.nih.gov; acceso #AAA26705) como un homólogo con sólo 30% de identidad de aminoácido al *pat* y

con 28% al *bar*. El porcentaje de identidad se determinó traduciendo primero las secuencias de nucleótidos, depositadas en la base de datos, a proteínas, luego utilizando ClustalW en el paquete de software VectorNTI para llevar a cabo el alineamiento de la secuencia múltiple.

EJEMPLO 2 - OPTIMIZACIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA EXPRESIÓN EN PLANTAS Y BACTERIAS.

2.1 - Antecedentes

Para obtener niveles más altos de expresión de genes heterólogos en plantas, puede ser preferible someter a reingeniería la proteína que codifica la secuencia de los genes de modo que se expresan en forma más eficiente en las células de planta. El maíz es una de tales plantas en donde se puede preferir rediseñar la región de codificación de la proteína heteróloga antes de la transformación, para aumentar el nivel de expresión del gen y el nivel de la proteína codificada en la planta. Por lo tanto, un paso adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana es el la reingeniería de un gen heterólogo para su expresión óptima.

Ver, por ejemplo, Kawabe et al. (2003), "Patterns of Codon Usage Bias in Three Dicot and Four Monocot Plant Species" *Genes Genet. Syst.*, pp 343-352; and Ikemura et al. (1993), "Plant Molecular Biology Labfax", Croy, ed., Bios Scientific Publishers Ltd., p.3748, y todas las referencias relevantes citadas en el presente documento.

Una razón para la reingeniería genética de una proteína bacteriana para la expresión en maíz, por ejemplo, se debe al contenido no óptimo de G+C en el gen nativo. Por ejemplo, el contenido de G+C muy bajo de muchos genes bacterianos nativos (y el sesgo consecuente hacia el contenido de A+T alto) da por resultado la generación de secuencias que imitan o duplican las secuencias de control de genes en plantas que son conocidas por ser muy ricas en A+T. La presencia de algunas secuencias ricas en A+T dentro del ADN de los genes introducidos en las plantas (por ej., regiones de encajado TATA halladas normalmente en los promotores de genes) pueden dar por resultado la transcripción aberrante de los genes. Por otro lado, la presencia de otras secuencias reguladoras que residen en el ARNm transcrito (por ej., secuencias de señal de poliadenilación (AAUAAA), o secuencias complementarias a los pequeños ARNm nucleares involucradas en el empalme del pre-ARNm) pueden conducir a inestabilidad del ARN. Por lo tanto, un objetivo en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana para la expresión del maíz, con mayor preferencia referido a genes optimizados de planta, consiste en generar un secuencia de ADN que tiene un contenido de G+C más alto, y preferentemente uno próximo al de los genes de maíz que codifican 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 impiden la traducción.

La **Tabla 3** ilustra cuan alto es el contenido de G+C en el maíz. Para los datos en la Tabla 3, las regiones codificadoras de los genes se extrajeron de las entradas del GenBank (Publicación 71) y las composiciones de base se calcularon utilizando el programa

28
44

MacVectorTM (Accelrys, San Diego, California). Las secuencias del intron se ignoraron en los cálculos.

Tabla 3: Compilación del contenido G+C de las regiones codificadoras de proteína de los genes del maíz

Clase de Proteína ^a	Rango G+C,%	Promedio G+C ^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) ^c

^a Los números de genes por clase se dan entre paréntesis

^b Las desviaciones estándar se dan entre paréntesis

^c El promedio de los grupos combinados se ignoró en el cálculo del promedio

Debido a la plasticidad otorgada por la redundancia/degeneración del código genético (es decir, algunos aminoácidos se especifican por más de un codón), la evolución de los genomas en diferentes organismos o clases de organismos ha dado por resultado el uso diferencial de codones redundantes. Esta "tendencia del codón" se refleja en la composición básica promedio de las regiones codificadoras de proteína. Por ejemplo, los organismos con contenido de G+C relativamente bajo tienen A o T en la tercera posición de codones redundantes, por lo que aquellos que tienen contenido de G+C más altos utilizan codones que tienen G o C en la tercera posición. Se cree que la presencia de codones "menores" dentro de un ARNm puede reducir la velocidad 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 velocidad de traducción por codones menores individuales sería al menos aditiva para múltiples codones menores. Por lo tanto, los ARNm que tienen contenido relativo alto de codones menores tendrían velocidades de traducción correspondientemente bajas. Esta velocidad se vería reflejada en niveles bajos subsiguientes de proteína codificada.

Al someter a ingeniería los genes que codifican una proteína bacteriana para la expresión en maíz (u otra planta, tal como algodón, soja, trigo, Brassica/canola, arroz; o más generalmente para cultivos oleaginosos, y plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas, hemicotiledóneas en general), se ha determinado la tendencia del codón de la planta. La tendencia del codón para el maíz es la distribución estadística del codón que la planta utiliza para codificar sus proteínas y el uso del codón preferido se muestra en la **Tabla 4**. Después de determinar la tendencia, se determina la frecuencia porcentual de los codones en los genes de interés. Los codones primarios preferidos por la planta deben ser determinados, así como también la segunda, tercera, y cuarta elección de codones preferidos cuando existen múltiples selecciones. Entonces se puede diseñar una nueva secuencia de ADN la

29

cual codifica la secuencia amino de la proteína bacteriana, pero la nueva secuencia de ADN difiere de la secuencia del ADN bacteriano nativo (que codifica la proteína) por la sustitución de los codones de la planta (primera preferencia, segunda preferencia, tercera preferencia, o cuarta preferencia) para especificar el aminoácido en cada posición dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína. La nueva secuencia se analiza luego para los sitios de enzima de restricción que podrían haber sido creados por la modificación. Los sitios identificados son modificados adicionalmente reemplazando los codones con los codones preferidos de la primera, segunda, tercera o cuarta selección. Otros sitios en la secuencia que podrían afectar la transcripción o traducción del gen de interés son los empalmes exón:intrón (5' o 3'), señales de adición poli A, o señales de terminación de la ARN polimerasa. La secuencia además se analiza y se modifica para reducir la frecuencia de los dobletes TA o GC. Además de los dobletes, los bloques de la secuencia G o C que tienen más de aproximadamente cuatro residuos que son iguales pueden afectar la transcripción de la secuencia. Por lo tanto, estos bloques también se modifican reemplazando los codones de primera o segunda selección, etc. con la siguiente selección preferida de codón.

Tabla 4.

Tabla 4. Codones de amino ácidos preferidos para las proteínas expresadas en el maíz	
Aminoácido	Codón*
Alanina	GCC/GCG
Cisteína	TGC/TGT
Ácido aspártico	GAC/GAT
Ácido glutámico	GAG/GAA
Fenilalanina	TTC/TTT
Glicina	GGC/GGG
Histidina	CAC/CAT
Isoleucina	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

70
98

Tabla 4. Codones de amino ácidos preferidos para las proteínas expresadas en el maíz	
Aminoácido	Codón*
Tirosina	TAC/TAT
Stop	TGA/TAG

Se prefiere que los genes optimizados de planta que codifican una proteína bacteriana contengan aproximadamente 63% de los codones de la primera selección, entre aproximadamente 22% hasta aproximadamente 37% de los codones de segunda selección, y entre aproximadamente 15% hasta aproximadamente 0% de los codones de tercera o cuarta selección, donde el porcentaje total es 100%. Los genes optimizados de planta, de mayor preferencia, contienen aproximadamente 63% de los codones de primera selección, al menos aproximadamente 22% de los codones de segunda selección, aproximadamente 7,5% de los codones de tercera selección, y aproximadamente 7,5% de los codones de cuarta selección, donde el porcentaje total es 100%. El método descrito anteriormente le permite a un experto en la técnica modificar los genes que son foráneos a una planta particular de modo que los genes se expresen óptimamente en plantas. El método además se ilustra en la solicitud PCTWO 97/13402.

De este modo, para designar 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 que utiliza un código genético redundante establecido a partir de una tabla de tendencia de codón compilada a partir de las secuencias genéticas para la planta o plantas particulares. La secuencia de ADN resultante tiene un grado mayor de diversidad de codones, una composición base deseable, puede contener sitios de reconocimiento de la enzima de restricción colocados estratégicamente, y carece de secuencias que podrían interferir con la transcripción del gen, o la traducción del ARNm del producto. De este modo, los genes sintéticos que son funcionalmente equivalentes a las proteínas/genes de la presente invención se pueden utilizar para transformar huéspedes, incluyendo plantas. La guía adicional que considera la producción de genes sintéticos se puede hallar por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5.380.831.

2.2- *Análisis de reconstrucción de la planta con DSM-2.*

El análisis extensivo de los 513 pares base (pb) de la secuencia de ADN de la región codificadora de DSM-2 nativa (SEC ID NO:1) reveló la presencia de varios patrones de secuencias que se creen son perjudiciales a la expresión de planta óptima, así como también una composición de codón no-óptima. La proteína codificada por la SEC ID NO:1 se presenta como SEC ID NO:2. Para mejorar la producción de la proteína recombinante en monocotiledóneas como así también en las dicotiledóneas, se desarrolló una secuencia de ADN "optimizada de planta" *DSM-2 v1* (SEC ID NO: 3) que codifica una proteína la cual es idéntica a la secuencia nativa revelada como SEC ID NO:2. En contraste, las secuencias de ADN, nativas y optimizadas de plantas, de las regiones codificadoras son sólo 78,3% idénticas. La

31
99

Tabla 5 muestra las diferencias en las composiciones de codón de las secuencias nativas (Columnas A y D) y las secuencias optimizadas de planta (Columnas B y E), y permite la comparación con una secuencia optimizada de planta teórica (Columnas CyF).

Tabla 4. Comparaciones de composición del codón de regiones codificadoras de <i>DSM-2</i> nativa, versión optimizada de planta (v1) y una versión optimizada de planta teórica									
		A	B	C			D	E	F
Amino Ácido	Codon	Nativa #	Opt. de Planta v1#	Opt. de Planta Teor. #	Amino Ácido	Codon	Nativa #	Opt. de Planta v1#	Opt. de Planta Teor. #
ALA(A)	GCA	0	5	5	LEU(L)	CTA	0	0	0
	GCC	14	7	7		CTC	8	5	5
	GCG	6	0	0		CTG	6	0	0
	GCT	0	8	8		CTT	0	5	5
ARG(R)	AGA	2	4	4		TTA	0	0	0
	AGG	1	5	5		TTG	0	4	4
	CGA	1	0	0	LYS(K)	AAA	0	1	1
	CGC	8	3	3		AAG	3	2	2
	CGG	3	0	0	MET(M)	ATG	1	1	1
	CGT	1	4	4	PHE(F)	TTC	6	2	4
ASN(N)	AAC	2	1	1		TTT	0	4	2
	AAT	0	1	1	PRO(P)	CCA	1	6	6
ASP(D)	GAC	7	4	4		CCC	4	3	3
	GAT	1	4	4		CCG	8	0	0
CYS(C)	TGC	0	0	0		CCT	1	5	5
	TGT	0	0	0	SER(S)	AGC	1	2	2
END	TAA	0	0	0		AGT	0	0	0
	TAG	1	0	0		TCA	1	2	2
	TGA	0	1	1		TCC	4	2	2
GLN(Q)	CAA	0	2	1		TCG	2	0	0
	CAG	3	1	2		TCT	0	2	2
GLU(E)	GAA	1	6	6	THR(T)	ACA	1	2	3
	GAG	14	9	9		ACC	5	5	5
GLY(G)	GGA	2	4	4		ACG	4	0	0
	GGC	9	4	4		ACT	2	5	4
	GGG	2	2	2	TRP(W)	TGC	3	3	3
	GGT	1	4	4	TYR(Y)	TAC	12	7	8

32
40

Tabla 4. Comparaciones de composición del codón de regiones codificadoras de <i>DSM-2</i> nativa, versión optimizada de planta (v1) y una versión optimizada de planta teórica									
HIS(H)	CAC	5	3	3		TAT	0	5	4
	CAT	0	2	2	VAL(V)	GTA	1	0	0
ILE(I)	ATA	0	1	1		GTC	5	3	3
	ATC	4	2	2		GTG	4	4	4
	ATT	0	1	1		GTT	1	4	4
	Totales	88	88	88		Totales	84	84	84

Queda claro a partir del examen de la Tabla 5 que las regiones codificadoras nativas y optimizadas de planta, mientras codifican las proteínas idénticas, son sustancialmente diferentes una de otra. La versión optimizada de planta (v1) imita de cerca la composición de codón de una región que codifica la planta optimizada teóricamente que codifica la proteína DSM-2.

EJEMPLO 3 - CLONACIÓN DE LOS VECTORES DE TRANSFORMACIÓN

3.1 - Construcción de plásmidos binarios que contienen *DSM-2* (v2)

La secuencia optimizada (DASPIC045) para codificar el gen del codón de *DSM-2* (v2) se recortó con las enzimas de restricción BbsI (New England Biolabs, Inc., Beverly MA, cat #R0539s) y Sad (New England Biolabs, Inc., cat#R0156s). El fragmento resultante se ligó en pDAB773 en los sitios de restricción correspondientes, NcoI (New England Biolabs, cat #R0193s) y SacI. Las colonias positivas se identificaron mediante la digestión de la enzima de restricción. Los clones resultantes contenían el Rb7 MAR v3 // At UbMO promotor v2 // gen de interés // Atu Orf 1 3'UTR v3. El plásmido que contenía *DSM-2* (v2) como el gen de interés se rotuló como pDAB3774.

La casete Rb7 MAR v3 // AtUbiLO promotor v2 // gen de interés // Atu Orf1 3'UTR v3 se clonó en el vector binario pDAB3736 como un fragmento de restricción AgeI (New England Biolabs, Inc., cat #R0552s). Esta casete se clonó entre los Bordes de la Mano Derecha y de la Mano Izquierda del plásmido binario. Las colonias positivas se identificaron mediante la digestión de la enzima de restricción. Las construcciones que contienen Rb7 MAR v3 // AtUbH 0 promotor v2 // *DSM-2* v2 // Atu Orf1 3'UTR v3 se rotularon como pDAB3778.

Una construcción control que contenía la casete Rb7 MAR v3 // AtUbiLO promotor v2 // *PAT* v3 // Atu Orf1 3' UTR v3 se completó eliminando la casete de destino GateWay attR del pDAB3736. El pDAB3736 se digirió con la enzima de restricción Pad (New England Biolabs, Inc., cat #R0547s). El PacI flanquea la casete de destino GateWay attR en pDAB3736. El plásmido digerido PacI se autiligó y se transformó en las células Top10 de Escherichia (Invitrogen, Carlsbad CA, cat# C4040-10). Las colonias positivas se identificaron mediante la digestión de la enzima de restricción y las reacciones de secuenciamiento. La construcción resultante se rotuló como pDAB3779.

3.2 - Clonación de construcciones de transformación adicional.

Todas las otras construcciones creadas para transformación en especies apropiadas de plantas se construyeron utilizando procedimientos similares según se describió previamente en la presente, y otros métodos estándar de clonación molecular (Maniatis et al., 1982). La **Tabla 6** enumera todas las construcciones de transformación utilizadas con los promotores apropiados y las características definidas, como así también el cultivo transformado.

Tabla 6 Constructores usados en la transformación de varias especies de plantas													
pDAS #	Pdas #	Especies transformadas en*	Gen de interés (GOL)	Promotor	Característica 1	Característica 2	GOL 2	Promotor	Gen de selección bacteriana	Gen de selección bacteriana 2	Gen de selección de planta	promotor	Método Trxn
3247		A	DSM2(v2)	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	AAD12(v1)	AtUbi10	Agro binario
3250	1941	R, Cn	DSM2(v2)	ZmUbi1	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	-	-	Pelos
3251	1942	R, Cn	PAT	ZmUbi1	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	-	-	Pelos
3278	1861	T	DSM2(v2)	AtUBi10	-	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	-	-	Agro binario
3279	1862	T	PAT	AtUBi10	-	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	-	-	Agro binario

*A *Arabidopsis*

T = Tabaco

R = Arroz

Cn = Maiz

CsVMV = Promotor del Virus del Mosaico de las Venas de la Yuca

AtUbi 10 = Promotor de la *Arabidopsis thaliana* Ubiquitin 10

RB7 Mar v2 = *Nicotiana tabacum* Osmotin región asociada a la matriz (MAR)

NtOsm = *Nicotiana tabacum* Osmotin Regiones sin traducir 5' y 3'

ZmUbi1 = Promotor de Zea mays Ubiquitin 1

5/28

EJEMPLO 4 - COMPLEMENTACIÓN DE E. COLI SENSIBLE (BL-21) CON DSM-2 (V2) UTILIZANDO PROMOTORES PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS.

4.1 Construcción del plásmido de expresión de Escherichia coli que contiene DSM-2 (v2)

La secuencia optimizada del codón de *DSM-2* (v2) se digirió con las enzimas de restricción BbsI y SacI. El fragmento resultante se clonó en pDAB779 en los sitios de restricción correspondientes de NcoI y SacI. El pDAB779 es un vector de expresión pET28a(+) (Novagen, Madison WI, cat# 69864-3). Las colonias positivas que contenían la secuencia que codifica el gen *DSM-2* (v2) se identificaron mediante la digestión de la enzima de restricción. Las construcciones de *DSM-2* // pET28a(+) se etiquetaron como pDAB4412.

Los plásmidos de expresión pET (control de vector vacío), y pDAB4412 se transformaron en la cepa de expresión BL21-star (DE3) de *E. coli* T7 (Invitrogen, Carlsbad CA, cat# C6010-03) utilizando métodos estándar. Los cultivos de expresión se iniciaron con 10-200 colonias recientemente transformadas en 250 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de antibiótico y 75 µM de IPTG (isopropil- α -D-tiogalactopiranosida). Los cultivos se desarrollaron a 28°C durante 24 horas a 180-200 rpm. Las células se recolectaron por centrifugación en botellas Nalgene de 250 ml a 3.400 x g durante 10 minutos a 4°C. Los pellets se suspendieron en 4-4,5 ml de solución de fosfato de Butterfield (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA; fosfato de potasio 0,3 mM pH 7.2). Las células suspendidas se transfirieron a tubos de centrifuga con cierre de rosca con 1 ml de perlas de vidrio de 0,1 mm de diámetro (Biospec, Bartlesville, OK, número de catálogo 1107901). La mezcla de perlas de vidrio-células se enfrió en hielo, luego las células se sometieron a lisis por sonicación con dos ráfagas de 45 segundos utilizando una sonda de 2 mm con un Sonificador Branson 250 (Danbury CT) en una salida de -20, refrigerando completamente entre ráfagas. Los productos de la lisis se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 ml y se centrifugaron 5 minutos a 16.000 x g. Los sobrenadantes se recolectaron y se midió la concentración de proteína. El reactivo Bio-Rad para el Ensayo de Tinción de la Proteína se diluyó 1:5 con H₂O y se agregó 1 ml a 10 µl de una dilución 1:10 de cada muestra y a albúmina de suero bovino (BSA) a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 µg/ml. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro, midiendo la densidad óptica a la longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV160U (Kyoto, JP). La cantidad de proteína contenida en cada muestra se calculó contra la curva estándar de BSA con ajuste entre 3 a 6 mg/ml con buffer de fosfato. Los productos de la lisis se corrieron sobre un gel de proteína SDS para visualizar la proteína expresada.

4.2 Evaluación de las cepas de clonación comunes para sensibilidad al BASTA

Las líneas celulares seleccionadas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* se inocularon en medios mínimos que contenían concentraciones en aumento de glufosinato (BASTA). Las líneas celulares; BL21 - star (DE3), Top10, DH5 α , C58 de

Agrobacterium tumefaciens, y LBA4404s de *Agrobacterium tumefaciens* se desarrollaron inicialmente en medios complejos. Las cepas de *Escherichia coli* se desarrollaron en LB y las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* se desarrollaron en YEP. Se inocularon cinco microlitros de cultivo bacteriano y se dispersaron en forma uniforme sobre placas de medios mínimos que contenían varias concentraciones de glufosinato. Las concentraciones consistían en 0 µg/ml, 250 Mg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml, y 4000 µg/ml de BASTA. Además, las cepas bacterianas se inocularon sobre una placa de un medio complejo como control - las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* se inocularon en placas agar YEP, y las cepas de *Escherichia coli* se inocularon sobre placas agar LB. Las placas que contenían las cepas de *Escherichia coli* se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las placas que contienen las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* se incubaron a 25 °C durante 48 horas. Después del tiempo de incubación asignado las placas se observaron para obtener el desarrollo bacteriano. La **Tabla 7** ilustra la capacidad de las diversas cepas para desarrollarse en medios mínimos que contienen glufosinato. Sólo una línea celular de la cepa BL21 -Star (DE3) fue inhibida sustancialmente por el glufosinato.

Tabla 7: Respuesta variable de cepas bacterianas al glufosinato, por crecimiento en medio							
	Control complejo	Contro l mín.	Mín. 250µg/ml	Mín. 500µg	Mín. 1000 µg	Mín. 2000 µg	Mín. 4000µg/ml
BL21 (DE3)	+++	+++	--	--	--	--	
DH5α E.coli	+++	+++	+++	+++	+++	+++	--
Top10 E.coli	+++	+++	+++	+++	+++	+	--
C58 Agrobacterium	+++	+++	+++	+++	+++	++	
LBA4404S	+++	+++	+++	++	++	+	--

La E.coli se desarrolló durante 24 hrs @ 37C. La Agrobacterium se desarrolló durante 48hrs @ 25C. +++ = Crecimiento en césped pesado// ++ = Crecimiento en césped liviano // + = Crecimiento en césped por zonas // - = Sin crecimiento

4.3 Expresión Recombinante de DSM-2 (v2) para complementar el crecimiento celular de la BL21 - star (DE3) de Escherichia coli

Se construyó un plásmido de expresión pET28a(+)que contenía PAT (v3) como control positivo. Se clonó PAT (v3) como un fragmento NcoI - SacI en los sitios de restricción correspondientes de pDAB779. Los clones positivos que contenían el fragmento del gen PAT(v3) se verificaron mediante la digestión de la enzima de restricción. Esta construcción se etiquetó como pDAB4434.

Los plásmidos, pDAB4434, pDAB4412, y un vector pET vacío (control) se transformaron en células bacterianas BL21 - star (DE3) de Escherichia coli. Los cultivos de expresión se iniciaron con 10-200 colonias transformadas recientemente en 250 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de antibiótico y 75 µM de IPTG (isopropil-a-D-tiogalatopiranosida). Los cultivos se desarrollaron a 28°C durante 24 horas a 180-200 rpm. Se inocularon cinco microlitros del cultivo en un control de medio complejo y un

37
55

medio mínimo que contenía concentraciones en aumento de glufosinato y 20 µM de IPTG. Los cultivos se dispersaron en forma uniforme sobre las placas y se incubaron a 28 °C durante 24 horas. Después del tiempo de incubación asignado las placas se observaron para obtener el crecimiento bacteriano. Estos resultados se ilustran en la **Tabla 7**.

Tabla 8:							
	Control Complejo	Mín. Cntrl	Mín. 250µg/ml	Mín. 500µg/ml	Mín. 1000µg/ml	Mín. 2000µg/ml	Mín. 4000µg/ml
Ctrol.	+++	+++	--	--	--	--	--
PAT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DSM2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

La *E.coli* se desarrolló durante 24 hrs @28C sobre un medio con 20uM de IPTG. --
= Sin crecimiento // +++ = Colonia distinta.

4.4 Uso de los promotores de planta para conducir la expresión recombinante de DSM-2 en las células BL21 - star (DE3) de *Escherichia coli*

Las construcciones de plásmido en las cuales se expresaron las secuencias codificadoras del gen *DSM-2* (v2), y el gen *PAT* bajo los promotores de planta CsVMV y AtUB110 se ensayaron para complementación sobre un medio mínimo que contenía glufosinato. Los plásmidos 3778 (Rb7 MARv3 // promotor AtUbil 0 // *DSM-2* (v2) // *Atu Orf 1* 3'UTR), 3779 (Rb7 MARv3 // promotor AtUbil 0 // *PAT* // *Atu Orf 1* 3'UTR), 3264 (promotor CsVMV // *DSM-2* // *Atu Orf 24* 3'UTR), 3037 (promotor CsVMV // *PAT* // *Atu Orf 25/26* 3'UTR), y 770 (plásmido control que contiene el promotor CsVMV // *GUS v3*// *Atu Orf 24* 3'UTR) se transformaron en la BL21- star (DE3) de *Escherichia coli* y se desarrollaron en medio complejos. Cinco microlitros de los cultivos se colocaron en placas con medios mínimos que contenían concentraciones en aumento de glufosinato y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Los resultados se ilustran en la **Tabla 9**. Estos datos indican que los promotores de planta tienen niveles moderados de funcionalidad dentro de las células bacterianas y se pueden utilizar para conducir la expresión de un marcador seleccionable.

Tabla 9							
		Mín. Cntrl	Mín. 250µg/ml BASTA	Mín. 500µg/ml BASTA	Mín. 1000µg/ml BASTA	Mín. 2000µg/ml BASTA	Mín. 4000µg/ml BASTA
Promotor AtUB110	DSM-2 - 3778	++++	++++	+++	+++	++	++
	PAT- 3779	++++	++++	+++	+++	+++	+++
	AHAS - 4433	++++	(+)	--	--	--	--

38
56

Promotor CsVMV	DSM-2 3264	++++	++	+	~	--	--
	PAT- 3037	++++	++	+	--	--	--
	GUS- 770	++++	(+)	--	--	--	--
	BL21 Cntrl	++++	(+)	--	--	--	--

La *E.coli* se desarrolló durante 48hrs @37C. ++++ = Crecimiento en césped pesado; +++ = Crecimiento del césped; ++ = Lotes de colonias distintas; + = Crecimiento de colonias disperso.

EJEMPLO 5. PURIFICACIÓN DEL DSM-2 PARA CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO PARA ANÁLISIS WESTERN

5.1. Expresión del Recombinante

Las células BL-21 (DE3) Star de *E. coli* recombinante (adquiridas de Invitrogen, Carlsbad, CA) que alojan el gen *DSM-2* (v2) optimizado por codón, en el plásmido pDAB4412 se utilizó para inocular un medio LB de 3 ml suplementado con 50 µg/ml de kanamicina a 37 °C durante toda la noche para la preparación de la semilla. Aproximadamente 2 ml de cultivo de semilla se transfirieron en un medio LB fresco de 1L que contenía Kanamicina (50 µg/ml) en un matraz Erlenmeyer alveolado de 2,8 litros. Los cultivos se incubaron a 37 °C en un agitador (New Brunswick Scientific, Modelo Innova 44) a 250 RPM durante aproximadamente 6 hrs para obtener OD₆₀₀ próximo a 0,8-1.0. Se agregó isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) hasta 75 µM finales en los cultivos y se continuó con la incubación a 18 °C durante toda la noche para la inducción. Las células se recolectaron por centrifugación a 8,000 RPM, a 4 °C, durante 15 min, y la pasta celular se almacenó a -80 °C o se procesó en forma inmediata para purificación.

Aproximadamente 5 g, en peso húmedo, de células de *E. coli* del cultivo de 1 litro se descongelaron y se suspendieron nuevamente en 300 ml de búfer de extracción que contenía 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0 y 0,3 ml de coctel inhibidor de proteasa (Sigma, cat# P8465), y se hizo disrupción por sonicación sobre hielo durante 15 minutos. El lisado se centrifugó a 4 °C, y a 24,000 RPM durante 20 min, y el sobrenadante se filtró a través de membranas de 0,8 µm y 0,45 µm. Todas las separaciones de proteína subsiguientes se realizaron utilizando Explorer 100 de Pharmacia AKTA y se ejecutaron a 4 °C. El filtrado se aplicó, a 10 ml/min, a una columna de Flujo Rápido de Sefarosa QXL (Pharmacia HiPrep 16/10, tamaño del lecho de 20 ml) equilibrada con búfer de 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0. La columna se lavó con este búfer hasta que el eluato OD₂₈₀ retornó a la línea base, las proteínas se eluyeron con 0,5 l de NaCl en gradiente lineal de 0 hasta 0,4 M, a una velocidad de flujo de 5 ml/min, mientras se recolectaron fracciones de 5 ml. Se reunieron las fracciones que contenían DSM-2 según se determinó por SDS-PAGE con banda aparente de 20 kDa (el peso molecular previsto para DSM-2 es 19,3 KDa), también correspondiente

a la actividad convertidora de glufofosinato. La muestra se diluyó con 4 volúmenes de 20 mM de Tris-HCl, búfer pH 7,5 que contiene 5 mM de DTT, 0,5% de Triton X-100, 5% de glicerol, y se aplicó nuevamente a una columna Mono Q (Pharmacia 10/100 GL, tamaño del lecho 8 ml) a 4 ml/min. Las proteínas se eluyeron con NaCl en gradiente de 0,1-0,3 M en el mismo búfer. Se recolectó el pico principal que contenía el DSM-2, y se agregó sulfato de amonio sólido hasta 1.0 M final, y se aplicó a una columna de Flujo Rápido, de Fenilo (Pharmacia HiTrap, tamaño del lecho 5 ml) equilibrado en sulfato de amonio 1.0 M en Tris-HCl, 20 mM, pH 7,5. Esta columna se lavó con el búfer de equilibrio a 4 ml/min hasta que el OD₂₈₀ del eluato retornó a la línea base, luego las proteínas se eluyeron en el lapso de 50 min (3 ml/min) por un gradiente lineal de sulfato de amonio de 1.0 M hasta 0 en Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, y se recolectaron fracciones de 3 ml. Las fracciones de pico principal que contenían DSM-2 eluido a 75 mS/cm se reunieron, y se concentraron a aproximadamente 3 mg/ml utilizando un dispositivo de filtro centrífugo de membrana de 10 kDa MWCO (Millipore). Luego la muestra se aplicó a una columna de filtración de gel Superdex 75 (Pharmacia XK 16/60, tamaño del lecho 110 ml) con búfer de PBS a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las fracciones pico que contenían DSM-2 puro se reunieron y se almacenaron a -80 °C. La concentración de proteína se determinó por el ensayo Bradford o el análisis de aminoácidos totales utilizando albúmina de suero bovino como estándar. La actividad del DSM-2 purificado se midió sobre la base de un procedimiento estándar para el análisis de fosfinotricin acetiltransferasa (PAT). (Wehrmann et al. 1996)

5.2. *Producción de anticuerpo*

El anticuerpo policlonal de conejo contra el DSM-2 se produjo utilizando los protocolos estándar para anticuerpo policlonal de conejo suministrado por Invitrogen Antibody Services (South San Francisco, CA, Cat# M0300). El DSM-2 purificado y expresado en E. coli (ver sección anterior) se suministró como inmunógeno. En breve, dos Conejos Neozelandeses se inyectaron por vía subcutánea (SQ) con 1 mg de proteína DSM-2 emulsionada en 0,25 mg hemocianina Keyhole Limpet y adyuvante de Freund incompleto (IFA). Los conejos se dejaron descansar durante 2 semanas y se aplicaron refuerzos vía SQ, tres veces, con 0,5 mg de proteína DSM-2 emulsionada en IFA con intervalos de tres semanas de período de descanso. Dos semanas después del refuerzo final, se recolectaron sueros de cada conejo y se analizaron por ELISA directo para titular (los datos no se muestran). Se realizaron dos refuerzos adicionales y sangrado terminal (Invitrogen Cat# M0311 y M0313) sobre el conejo número 2, el cual dio un mejor título para los anticuerpos específicos.

5.3. *Análisis de transferencia Western*

Aproximadamente 100 mg de tejido de callos se colocaron en un tubo micrófugo (microfuge, sic) de 2 ml que contenía 3 perlas BB de acero inoxidable. Se agregaron 250 µl de búfer de extracción (solución salina de búfer de fosfato con contenido de 0,1 % de Triton

X-100, DTT 10 mM y 5 µl por ml de coctel de inhibidores de proteasa) y los tubos se fijaron en el pulverizador Geno (Modelo 2000-115, Certiprep, Metuchen, NJ) y se agitaron durante 6 min en la configuración 1x a 500 rpm. Los tubos se centrifugaron a 10.000x g durante 10 min y el sobrenadante que contenía las proteínas solubles se pipeteó en tubos separados y se almacenó sobre hielo. El pellet se extrajo una segunda vez como se describió anteriormente y el sobrenadante se reunió con la fracción previa y se analizó.

Las proteínas extraídas de las muestras de planta se desnaturalizaron en búfer Laemmli y se incubaron a 95°C durante 10 min. Las proteínas desnaturalizadas se separaron en geles prefabricados de Novex 8-16% en Tris-Glicina (Invitrogen Cat# EC60452BOX) de acuerdo con el protocolo del fabricante, seguido por transferencia sobre membrana de nitrocelulosa utilizando el protocolo estándar.

Todos los pasos de incubación para la transferencia Western se realizaron a temperatura ambiente durante una hora. La transferencia se bloqueó primero en PBS que contenía 4% de leche (PBSM) y luego se incubó en anticuerpo policlonal de conejo específico para DSM-2 (ver párrafo anterior) diluido 5000 veces en PBSM. Después de tres lavados de 5 minutos en PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (PBST), el conjugado de anticuerpo anti-ratón de cabra / peroxidasa de rábano picante se incubó en la transferencia. Las proteínas detectadas se visualizaron utilizando sustrato quimioluminiscente (Pierce Biotechnology, Rockford, IL Cat# 32106) y exposición a película de rayos X.

EJEMPLO 6 - TRANSFORMACIÓN EN *ARABIDOPSIS* Y SELECCIÓN

6.1 - Condiciones de desarrollo de Arabidopsis thaliana.

La semilla de *Arabidopsis* de tipo silvestre se suspendió en una solución al 0,1% de agarosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La semilla suspendida se almacenó a 4°C durante 2 días para completar los requerimientos de aletargamiento y asegurar una germinación sincrónica de la semilla (estratificación).

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 tornó húmedo. La mezcla de suelo se dejó drenar durante 24 horas. La semilla estratificada se sembró sobre la vermiculita y se cubrió con domos de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 7 días.

Las semillas se germinaron y las plantas se desarrollaron en un Conviron (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) bajo condiciones de días largos (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una intensidad lumínica de 120-150 µmol/m²seg a temperatura (22° C) y humedad (40-50%) constantes. Las plantas se regaron inicialmente con solución de Hoagland y a continuación con agua desionizada para mantener el suelo húmedo pero no mojado.

6.2- Transformación del Agrobacterium

Una placa de agar LB + con eritromicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (200mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) que contenía una colonia sembrada de DH5α se utilizó para proveer una colonia para inocular cultivos mini prep de 4 ml (LB líquido + eritromicina). Los cultivos se incubaron durante toda la noche a 37° C con agitación constante. Los prep. Spin Mini de Qiagen (Valencia, CA), realizados conforme las instrucciones del fabricante, se utilizaron para purificar el ADN de plásmido.

Las células del *Agrobacterium tumefaciens* electro-competentes (cepas Z707s, EHA101s, y LBA4404s) se prepararon utilizando un protocolo de Weigel & Glazebrook (2002). Las células competentes del *Agrobacterium* se transformaron utilizando un método de electroporación adaptado de Weigel & Glazebrook (2002). Se descongelaron sobre hielo 50 µl de células Agro competentes y 10-25 ng del plásmido deseado se agregaron a estas células. La mezcla de ADN y célula se agregó a cubetas de electroporación pre-enfriadas (2 mm). Se utilizó un Electroporador Eppendorf 2510 para la transformación con las siguientes condiciones, Tensión: 2,4kV, Longitud del pulso: 5 msec.

Después de la electroporación, se agregó 1 ml de caldo YEP (por litro: 10 g de extracto de levadura, 10 g de Bacto-peptona, 5 g de NaCl) a la cubeta, y la suspensión de célula-YEP se transfirió a un tubo de cultivo de 15 ml. Las células se incubaron a 28°C en un baño de agua con constante agitación durante 4 horas. Después de la incubación, el cultivo se puso en placas de YEP + agar con eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (250 mg/L). Las placas se incubaron durante 2-4 días a 28°C.

Las colonias se seleccionaron y se hizo el rayado sobre placas de YEP + agar fresco con eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomina (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 los cebadores específicos de vector. Los Preps Spin Mini de Qiagen, realizados conforme las instrucciones del fabricante, se utilizaron para purificar el ADN del plásmido de las colonias de *Agrobacterium* seleccionadas con la siguiente excepción: alícuotas de 4 ml de un cultivo de 15 ml preparado durante toda la noche, mini prep de (YEP líquido + eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l)) y estreptomina (250 mg/l)), se utilizaron para la purificación del ADN. Una alternativa al uso del ADN del Prep Spin Mini de Qiagen fue el lisado de las células de *Agrobacterium* transformadas, suspendidas en 10 µl de agua, a 100 °C durante 5 minutos. El ADN de plásmido del vector binario utilizado en la transformación de *Agrobacterium* se incluyó como un control. La reacción de PCR se completó utilizando la Taq ADN polimerasa de Takara Mirus Bio Inc. (Madison, Wisconsin) según las instrucciones del fabricante a concentraciones 0,5x. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo por ciclos térmicos en un MJ Research Peltier Thermal Cycler programado con las siguientes condiciones; 1) 94°C durante 3 minutos, 2) 94° C durante 45 segundos, 3) 55°C durante 30 segundos, 4) 72°C durante 1 minuto, durante 29 ciclos, y luego 1 ciclo de 72° C

durante 10 minutos. La reacción se mantuvo a 4°C después terminados los ciclos. 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 del control del plásmido.

6.3- Transformación de *Arabidopsis*

El *Arabidopsis* se transformó utilizando el método de inmersión floral (floral dip). La colonia seleccionada se utilizó para inocular uno o más precultivos de 15 a 30 ml de caldo YEP que contenía eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomicina (250 mg/l). El o los cultivos se incubaron durante toda la noche a 28° C con constante agitación a 220 rpm. Cada pre-cultivo se utilizó para inocular dos cultivos de 500 ml de caldo YEP que contenía eritromicina (200 mg/l) o espectinomicina (100 mg/l) y estreptomicina (250 mg/l) y los cultivos se incubaron durante toda la noche a 28°C con constante agitación. Luego las células se peletizaron a aproximadamente 8700x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y el sobrenadante resultante se descartó. El pellet celular se resuspendió suavemente en 500 ml de medio de infiltración que contenía: 1/2x sales Murashige y Skoog /vitaminas B5 de Gamborg, 10% (p/v) de sacarosa, 0,044 µM de bencilamino purina (10 µl/litro de solución de reserva de 1 mg/ml en DMSO) y 300 µl/litro de Silwet L-77. Las plantas de aproximadamente 1 mes se sumergieron en el medio durante 15 segundos, asegurándose de sumergir la inflorescencia más nueva. Las plantas se acostaron luego sobre sus costados y se cubrieron (transparente u opaco) durante 24 horas, luego se lavaron con agua, y se colocaron hacia arriba. Las plantas se desarrollaron a 22°C, con un foto período de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad. Aproximadamente 4 semanas después de la inmersión, se cosecharon las semillas.

6.4 - Selección de plantas transformadas.

Las semillas T₁ recién cosechadas [gen *DSM-2* (v2)] se dejaron secar durante 7 días a temperatura ambiente. Las semillas T₁ se sembraron en bandejas de germinación de 26,5 x 51-cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), recibiendo cada una alícuotas de 200 mg de la semilla T₁ estratificada (-10.000 semillas) que habían sido suspendidas previamente en 40 ml de solución de agarosa al 0,1% y se almacenaron a 4°C durante 2 días para completar los requerimientos de aletargamiento y asegurar una germinación sincrónica de la semilla.

El Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) se cubrió con vermiculita fina y se subirrigó con solución de Hoagland hasta humedecerse, luego se dejó secar por gravedad. Cada alícuota de 40 ml de semilla estratificada se sembró en forma uniforme sobre la vermiculita con una pipeta y se cubrió con domos de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4-5 días. Los domos se removieron 1 día antes de la selección inicial del transformante utilizando el rociado pos emergencia de 2,4-D (seleccionando para el gen *AAD-12* co-transformado; ver USSN 60/731.044). Siete días

después de la siembra (DDP) y nuevamente 11 DDP, se rociaron las plantas T_1 (cotiledón y etapa de 2 a 4 hojas, respectivamente) con una solución al 0,016% del herbicida 2,4-D (456 g ia/l 2,4-D amina 4, Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, IN) en un volumen de rociado de 10 ml/bandeja (703 l/ha) utilizando una boquilla de pulverización de aire comprimido DeVilbiss para suministrar una proporción eficaz de 50 g ae/ha de 2,4-D DMA por aplicación. Los sobrevivientes (plantas que se desarrollan activamente) se identificaron de 4 a 7 días después del pulverizado final y se transplantaron en forma individual en materas de 3 pulgadas preparadas con medios para materas (Metro Mix 360). Las plantas transplantadas se cubrieron con domos de humedad durante 3 a 4 días y se colocaron en una cámara de crecimiento a 22° C como antes o se movieron directamente al invernadero. Los domos se eliminaron a continuación y las plantas se criaron en el invernadero (22±5° C, 50±30% RH, 14 h de luz: 10 de oscuridad, mínimo 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^1$ natural + luz suplementaria) al menos 1 día antes del ensayo para la capacidad del *DSM-2* (v2) (gen optimizado para la planta) para dar resistencia herbicida al glufosinato.

Luego, las plantas T_1 se asignaron al azar para varias proporciones de glufosinato. Para el *Arabidopsis* 140 g ia/ha de glufosinato es una dosis efectiva para distinguir las plantas sensibles de las que tienen niveles de Resistencia significativos. También se aplicaron proporciones elevadas para determinar niveles relativos de Resistencia (280, 560, o 1120g ia/ha). La Tabla 10 muestra comparaciones tomadas a un gen de Resistencia herbicida al ariloxialcanoato (*AAD-12 v1*); ver USSN 60/731.044.

Todas las aplicaciones de herbicida de glufosinato se aplicaron por pulverizador de pista en un volumen de 187 l/ha. La formulación comercial Liberty™ (200 g a/L, Bayer Crop Science, Research Triangle Park, NC). Las plantas T_1 que exhibieron tolerancia al glufosinato fueron accedidas posteriormente en la generación T_2 .

6.5 - Resultados de selección de plantas transformadas.

Las[G1] primeras transformaciones de *Arabidopsis* se realizaron utilizando *DSM-2* (v2) (gen optimizado de planta). Los transformantes T_1 se seleccionaron primero del un fondo de semillas no transformadas utilizando un esquema de selección DMA para 2,4-D. Se rastrearon más de 100,000 semillas T_1 y se identificaron 260 plantas resistentes al 2,4-D (gen *AAD-12*), equivalente a una frecuencia de transformación/selección de 0,26% la cual es levemente más alta que el rango normal de frecuencia de selección de los constructores en donde *AAD-12* + 2,4-D se utilizan para selección. Las plantas T_1 seleccionadas anteriormente se transplantaron a continuación a materas individuales y se rociaron con varias proporciones de herbicida de glufosinato comercial. La **Tabla 10** compara la respuesta de *DSM-2* (v2) y los genes de control para impartir resistencia al glufosinato con los transformantes T_1 de *Arabidopsis*. La respuesta se presenta en términos de porcentaje de daño visual 2 WAT. Los datos se presentan en forma de un histograma de individuos que exhiben poco o ningún daño (<20%), daño moderado (20-40%), o daño severo (>40%). Dado que cada T_1

u4
62

es un evento de transformación independiente, se puede esperar una variación significativa de respuestas individuales T_1 dentro de una proporción dada. Se presenta una desviación estándar y media aritmética para cada tratamiento. El *Arabidopsis* de tipo silvestre no transformado se utiliza como control sensible al glufosinato. El gen *DSM-2* (v2) impartió resistencia herbicida a plantas T_1 *Arabidopsis* individuales. Dentro de un tratamiento dado, el nivel de respuesta de la planta varió enormemente y se puede atribuir al hecho de que cada planta representa un evento de transformación independiente. De importancia para notar, por encima de 140 g ia/ha de glufosinato, hubo individuos que no se vieron afectados mientras que algunos se vieron seriamente afectados. Un promedio de daño de población total por proporción se presenta en la **Tabla 10** simplemente para demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con *DSM-2* (v2) versus el tipo silvestre o los controles transformados *AAD-12* + *PAT*. Muchos *DSM-2* (v2) individuales sobrevivieron a 1.120 g ia/ha de glufosinato con poco o nada de daño.

Tabla 10. Respuesta de T_1 *Arabidopsis* transformada (optimizada de planta) de T_1 *DSM-2* v2 hasta un rango de proporciones de glufosinato aplicadas pos emergencia en comparación con las plantas T_1 *AAD-12* + *PAT* y de tipo salvaje.

Tabla 10. Respuesta de T_1 <i>Arabidopsis</i> transformada (optimizada de planta) de T_1 <i>DSM-2</i> v2 hasta un rango de tasas de glufosinato aplicadas post emergencia comparada con las plantas tipo silvestres y las T_1 <i>AAD-12</i> + <i>PAT</i>						
Gen <i>DSM-2</i> (v2) + <i>AAD-12</i>		% Daño			% Daño	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desviación Estándar	
0 g ia/ha glufosinato	20	0	0	0,0	0,0	
140 g ia/ha glufosinato	20	0	0	0,0	0,0	
280 g ia/ha glufosinato	19	1	0	3,0	5,0	
560 g ia/ha glufosinato	19	0	1	6,0	22,0	
1120 g ia/ha glufosinato	17	1	2	13,0	19,0	
Control del Tipo Silvestre		%Daño			%Daño	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desviación std.	
0 g ia/ha glufosinato	10	0	0	0,0	0,0	
140 g ia/ha glufosinato	0	0	10	98,0	5,0	
280 g ia/ha glufosinato	0	0	10	100,0	0,0	
560 g ia/ha glufosinato	0	0	10	100,0	0,0	
1120 g ia/ha glufosinato	0	0	10	100,0	0,0	
Gen <i>PAT</i> + <i>AAD-12</i>		% Daño			% Daño	

45
65

Tabla 10. Respuesta de T ₁ <i>Arabidopsis</i> transformada (optimizada de planta) de T ₁ DSM-2 v2 hasta un rango de tasas de glufosinato aplicadas post emergencia comparada con las plantas tipo silvestres y las Ti AAD-12 + PAT					
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desviación std.
0 g ia/ha glufosinato	10	0	0	0,0	0,0
140 g ia/ha glufosinato	10	0	0	0,0	0,0
280 g ia/ha glufosinato	10	0	0	0,0	0,0
560 g ia/ha glufosinato	10	0	0	0,0	0,0
1120 g ia/ha glufosinato	10	0	0	3,0	3,0

6.6 - DSM-2 (v2) como marcador seleccionable.

La capacidad de utilizar DSM-2 (v2) como marcador seleccionable utilizando glufosinato como el agente de selección se analizó con *Arabidopsis* transformado como se describió anteriormente. Aproximadamente 100 semillas de *Arabidopsis* de generación T₁ (100-150 semillas) que contenían DSM-2 (v2) o plantas con 2 mg de homózigos T₅ que contenían PAT se enclavaron entre aproximadamente 10.000 semillas (sensibles) del tipo silvestre. Cada bandeja de plantas recibió dos tiempos de aplicación de 280 g ia/ha de glufosinato en los tiempos de tratamiento siguientes: 7 DDP y 11 DDP. Los tratamientos se aplicaron con una boquilla de pulverizador DeVilbiss según se describió previamente. Otros 2 mg de semilla de *Arabidopsis* de generación T₁ de cada una se sembró y no recibieron tratamiento como un conteo de comparación. Las plantas se identificaron como Resistentes o Sensibles 17 DDP. Los conteos entre las tratadas y no tratada se muestran similares en la **Tabla 11**. Estos resultados indican que la DSM-2 (v2) se puede utilizar efectivamente como un marcador seleccionable alternativo para una población.

Tabla 11. Masa de semilla sembrada y cuenta del número de plantas que sobrevivieron a continuación del tratamiento con 280 ia/ha de glufosinato

Trmto	Peso de la masa plantada	Masa de PAT plantada	Masa de DSM-2 (v2) plantada	Número de plantas sobrevivientes después de ser rociadas con glufosinato
1	200 mg	0 mg	0 mg	0
2	0 mg	2 mg	0 mg	154
3	200 mg	2 mg	0 mg	121
4	0 mg	0 mg	2 mg	117
5	200 mg	0 mg	2 mg	121

6.7-Análisis Molecular

6.7.1 – Recolección de tejido, aislamiento de AND y cuantificación X μ l.

El tejido fresco se coloca en tubos y se liofiliza a 4°C durante 2 días. Después de que el tejido está totalmente seco se coloca una bola de tungsteno (Heavy Shot) en el tubo y las muestras se someten a molienda seca durante un minuto usando un Molino de Bolas Kelco. Luego se sigue el procedimiento estándar DNeasy para aislamiento del ADN (Qiagen, DNeasy 69109). Luego se colorea una alícuota del ADN extraído con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se lee en el fluorómetro (Longitud de Onda 485/530-Bio Tek), con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/ μ l.

6.7.2- Análisis para el ensayo del invasor, X μ l

Las muestras de AND se diluyen a 0,7 ng/ μ l y luego se desnaturalizan por incubación en un ciclador térmico a 95°C durante 10 minutos. La mezcla de reacción para el ensayo del invasor se prepara luego siguiendo el procedimiento para el formato de 96 celdas publicado por Third Wave Technologies. En cada celda de la placa de 96 celdas se dispersan 7,5 μ l de la mezcla de reacción preparada, seguida por una alícuota de 7,5 μ l de los controles y por los 0,7ng/ μ l diluidos de las muestras desconocidas desnaturalizadas. Cada celda se cubre con 15 μ l de aceite mineral (Sigma). Luego se incuban las placas a 63°C durante 1 hora y se lee en el fluorómetro (Biotek). El cálculo del % de señal sobre la señal de fondo para la sonda blanco (longitud de onda para el colorante FAM 560/620) dividido por el % de señal sobre la señal de fondo para sonda de control (longitud de onda para el colorante RED 485/530) será el cálculo de la relación. La relación se emplea luego para determinar la formación de cigotos en el evento.

6.8 - Heredabilidad.

Una variedad de eventos T₁ se auto-polinizaron para producir la semilla T₂. Se ensayó la progenie de estas semillas aplicando glufosinato (200 g ia/ha) a 100 plantas hermanas T₂ aleatorias. Cada planta T₂ individual se transplantó a materas de 3 pulgadas cuadradas antes de la aplicación por rociado (rociador de pista a una proporción de aplicación de 187 l/ha). Sesenta y tres por ciento de las familias T₁ (plantas T₂) segregadas en el anticipado modelo 3 Resistentes: 1 sensible para un locus único heredado predominantemente con herencia Mendeliana según se determinó por análisis Chi cuadrado ($P > 0,05$).

Se ejecutó invasión para (determinar) cigosidad en 16 plantas seleccionadas al azar de cada una de las líneas que tuvieron segregación de lugar único. Se recolectaron semillas de individuos T₂ en los cuales se determinó el invasor homócigo (semilla T₃). Veinticinco plantas hermanas T₃ de cada cuatro familias T₂ en las cuales se determinó el invasor homócigo se ensayaron para progenie según se describió previamente. Todas las familias T₂ de las que se anticipó que eran homócigas (poblaciones no segregantes), fueron

no segregantes. Estos datos muestran que el *DSM-2* (v2) se integra en forma estable y se hereda en forma Mendeliana en por lo menos tres generaciones.

EJEMPLO 7 -TRANSFORMACIÓN DE MAÍZ MEDIADA POR BIGOTES UTILIZANDO HERBIACE

7.1- Clonación del *DSM-2* (v2).

El gen *DSM-2* (v2) se separó del vector DASPIC045 como un fragmento Bbs1/Sac1. Este se ligó en forma direccional en el vector pDAB3812 separado en forma similar que contenía el promotor monocotiledóneo ZmUbi1. Los dos fragmentos se ligaron juntos utilizando ligasa ADN T4 y se transformaron en células DH5 α . Los minipreps se realizaron en las colonias resultantes utilizando el kit mini prep QÍASpin de Qiagen, y las colonias se digirieron para verificar la orientación. La construcción final se designó pDAB3250, la cual contenía ZmUbi1/0SM-2 (v2) / ZmPer5. Un vector de control idéntico que contenía el gen *PAT* se construyó en la forma que se mencionó anteriormente. Esta construcción se designó pDAB3251.

7.2- Iniciación de callo/suspensión.

Para obtener embriones inmaduros para la iniciación del cultivo de callo, se realizaron cruces F₁ entre los progenitores Hi-II A y B desarrollados en el invernadero (Armstrong *et al.* 1991). Cuando los embriones alcanzaron un tamaño de 1,0-1,2 mm (aproximadamente 9 a 10 días posteriores a la polinización), las espigas se cosecharon y la superficie se esterilizó por frotado con jabón Liqui-Nox®, sumergido en etanol al 70% durante 2-3 minutos, y luego sumergido en blanqueador comercial al 20% (0,1% de hipoclorito de sodio) durante 30 minutos.

Las espigas se lavaron en agua destilada, estéril, y los embriones zigóticos inmaduros se extirparon en forma aséptica y se cultivaron sobre el medio 15Ag10 (Medio 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 AgNO₃, 2,5 g/l de Gelrite, pH 5,8, durante 2 a 3 semanas retirando el escutelo del medio. El tejido que mostraba la morfología apropiada (Welter *et al.*, 1995) se transfirió selectivamente a intervalos de dos semanas sobre medio 15Ag10 fresco durante aproximadamente 6 semanas, luego se transfirió al 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) a intervalos de dos semanas durante aproximadamente 2 meses.

Para iniciar los cultivos embriogénicos en suspensión, se agregó un volumen aproximadamente de 3 ml de célula empacada (PCV) del tejido de callo que se origina de un único embrión a aproximadamente 30 ml de medio líquido H9CP+ (mezcla de sal basal MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas MS modificadas que contienen 10 veces menos

ácido nicotínico y 5 veces más alto el clorhidrato de tiamina , 2,0 mg/l de 2,4-D, 2,0 mg/l de ácido a-naftalenacético (NAA), 30 g/l de sacarosa, 200 mg/l de hidrolizado de caseína (digesto ácido), 100 mg/l de *myo*-inositol, L-prolina 6 mM, 5% v/v de agua de coco (agregado solo antes del subcultivo), pH 6,0). Los cultivos en suspensión se mantuvieron en condiciones de oscuridad en matraces Erlenmeyer de 125 ml en un agitador con control de temperatura configurado a 125 rpm a 28°C. Característicamente, las líneas celulares 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 PVC de células y 7 ml de medio condicionado a 20 ml de medio líquido H9CP+ fresco utilizando una pipeta de orificio grande. Una vez que el tejido comenzó a duplicar el crecimiento, las suspensiones se escalaron y se mantuvieron en matraces de 500 ml por lo cual 12 ml de PVC de células y 28 ml de medio condicionado se transfirieron en 80 ml del medio H9CP+. Una vez que las suspensiones se establecieron completamente, se sometieron a criopreservación para uso futuro.

7.3 - Criopreservación y descongelamiento de suspensiones.

A los dos días post subcultivo, se agregaron 4 ml de PCV de células en suspensión y 4 ml de medio condicionado a 8 ml de crioprotector (disuelto en medio H9CP+ sin agua de coco, glicerol 1 M, DMSO 1 M, sacarosa 2 M, filtro esterilizado) y se dejó agitar a 125 rpm a 4°C durante 1 hora en una matraz de 125 ml. Después de 1 hora se agregaron 4,5 ml a un frasquito criogénico de Corning de 5,0 ml enfriado. Una vez que los recipientes individuales se llenaron se mantuvieron durante 15 minutos a 4°C en un congelador de velocidad controlada, luego se dejaron congelar a una velocidad de -0.5°C/minuto hasta alcanzar una temperatura final de -40° C. Después de alcanzar la temperatura final, los frasquitos se transfirieron a cajas en el espacio de estantes dentro de una unidad de almacenamiento Cryoplus 4 (Forma Scientific) rellena con vapores de nitrógeno líquido.

Para el descongelamiento, los frasquitos se removieron de la unidad de almacenamiento y se colocaron en un contenedor de hielo seco cerrado, luego se zambulleron en un baño acuoso mantenido a 40-45° C hasta que la "ebullición" disminuyó. Cuando se descongelaron, el contenido se vertió en una pila de -8 papeles estériles de filtro Whatman (No. 4) de 70 mm en cajas de Petri de 100x25 mm con cubierta. El líquido se dejó absorber en los filtros durante varios minutos, luego el filtro superior que contenía las células se transfirió al 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 promisorio se transfirió del papel de filtro directamente al medio GN6 fresco. Este tejido se subcultivó cada 7 a 14 días hasta que de 1 a 3 gramos estuvieron disponibles para la iniciación de la suspensión en aproximadamente 30 ml de medio H9CP+ en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Tres mililitros de PCV se subcultivaron en medio H9CP+ fresco cada 3,5 días hasta que se obtuvo un total de 12 ml de PCV, momento en el cual tuvo lugar el subcultivo de punto según se describió previamente.

Aproximadamente 24 horas antes de la transformación, 12 ml de PCV de suspensión de células de maíz embriogénico previamente criopreservado más 28 ml de medio condicionado se subcultivaron en 80 ml de medio líquido GN6 (medio 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 dos veces utilizando la misma línea celular de modo que un total de 36 ml de PVC se distribuyó entre los 3 matraces. Después de 24 horas el medio líquido GN6 se eliminó y se reemplazó con 72 ml de medio osmótico GN6 S/M (medio 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 myo-inositol, pH 6,0) por matraz para la plasmólisis de las células. Los matraces se colocaron en un agitador en la oscuridad durante 30-35 minutos, y durante este tiempo se preparó una suspensión de 50 mg/ml de bigotes de carburo de silicio agregando el volumen apropiado de medio líquido GN6 S/M para 405 mg de bigotes de carburo de silicio pre-tratados en autoclave (Advanced Composite Materials, Inc.).

Después de la incubación en GN6 S/M, el contenido de cada matraz se reunió en una botella centrífuga de 250 ml. Una vez que todas las células se asentaron en el fondo, todo, excepto 14 ml de líquido GN6 S/M se sacó y se recolectó en un matraz estéril de 1 litro para uso futuro. La suspensión pre-humedecida de los bigotes se agitó por remolino (en un Vortex) durante 60 segundos a velocidad máxima y se agregaron 8,1 ml a la botella, a lo cual se agregaron 170 µg de ADN como último paso. La botella se colocó inmediatamente en un mezclador comercial de pinturas Red Devil 5400 modificado y se agitó durante 10 segundos. Después de la agitación, el coctel de células, el medio, los bigotes y el ADN se agregaron al contenido del matraz de 1 litro junto 125 ml de medio líquido GN6 para reducir el medio osmótico. Las células se dejaron recuperar en un agitador durante 2 horas antes de filtrarse sobre un papel filtro Whatman #4 (5,5 cm) utilizando una unidad de vidrio para recolectar células que se conectó a una línea de vacío local.

Aproximadamente 6 ml de suspensión dispersa se pipeteó sobre la superficie del filtro a medida que se extraía el vacío. Los filtros se colocaron sobre placas de medio GN6 de 60 x 20 mm. Las placas se cultivaron durante 1 semana a 28° C en una caja oscura.

Después de una semana, 20 de los papeles de filtro se transfirieron a placas de medio GN6 (1 Herbiace) de 60x20 mm, 20 de los papeles de filtro se transfirieron a placas de medio GN6 (2 Herbiace) de 60x20 mm y 20 de los papeles de filtro se transfirieron a placas de medio GN6 (4 Herbiace) de 60x20 mm (medio N6, 2,0 mg/l de 2,4-D, 30 g/l de sacarosa, 100 mg/l de myo-inositol, 1, 2, o 4 mg/L de bialafos (de Herbiace) y, 2,5 g/l de Gelrite, pH 5,8) Las placas se colocaron en cajas y se cultivaron durante una semana adicional.

Después de una semana adicional, todos los papeles de filtro se transfirieron nuevamente a las mismas concentraciones de medio GN6 + Herbiace (1H, 2H y/o 4H). Las placas se colocaron en cajas y se cultivaron durante otra semana adicional.

Tres semanas después de la transformación, el tejido se embebió raspando la mitad ($\frac{1}{2}$) de las células en la placa en 3,0 ml de medio de agarosa GN6 fundido (medio N6, 2,0 mg/l de 2,4-D, 30 g/l de sacarosa, 100 mg/l de myo-inositol, 7 g/l de agarosa Sea Plaque, pH 5,8, tratado en autoclave durante solo 10 minutos a 121° C) que contenía ya sea 1, 2, o 4 mg/l de bialafos de Herbiace. El tejido se rompió y los 3 ml de agarosa y tejido se vertieron en forma uniforme sobre la superficie de una placa de GN6 (1H, 2H o 4H) de 100 x 15 mm, dependiendo de la concentración en que las células se cultivaron originalmente. Esto se repitió con la otra mitad ($\frac{1}{2}$) de las células sobre cada placa. Una vez embebidas las placas se sellaron individualmente con Nescofilm® o Parafilm M®, y luego se cultivaron durante aproximadamente 4 semanas a 28° C en cajas oscuras.

7.4- Protocolo para regeneración de planta.

Los aislados transformados putativamente son típicamente visibles por primera vez de 5 a 8 semanas después de la transformación. Todos los aislados potenciales se eliminaron de la placa sumergida y se transfirieron a medio de selección fresco de la misma concentración en placas de 60 x 20 mm. Si el desarrollo sostenido es evidente después de aproximadamente 2 semanas, un evento se considera resistente. Un subconjunto de los eventos resistentes se entregó luego para análisis molecular.

La regeneración se inicia transfiriendo el tejido de callo a un medio de inducción basado en citoquinina, 28 (1H), que contiene, (sales y vitaminas MS, 30,0 g/l de sacarosa, 5 mg/l de BAP, 0,25 mg/l de 2,4-D, 1 mg/l de bialafos, 2,5 g/l de Gelrite; pH 5,7.) Las células se dejaron desarrollar en luz baja ($13 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante una semana, luego luz más alta ($40 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante otra semana, antes de ser transferidas al medio de regeneración, 36 (1H), el cual es idéntico a 28 (1H) salvo que carece de reguladores del crecimiento de la planta. Se retiraron pequeñas plántulas (3 a 5 cm) y se colocaron en tubos de cultivo de 150 x 25 mm que contenían medio SHGA libre de selección (Schenk y Hildebrandt basal salts and vitamins, 1972; 1 g/l de myo-inositol, 10 g/l de sacarosa, 2,0 g/l de Gelrite, pH 5,8). Una vez que las plántulas desarrollaron un sistema de brote y raíz suficiente, se transplantaron al suelo en el invernadero.

7.5- Análisis Molecular: Materiales y Métodos para Maíz.

7.5.1- Aislamiento y cuantificación de ADN en tejido cosechado.

El tejido fresco se coloca en tubos y se liofiliza a 4°C durante 2 días. Después de que el tejido se seca totalmente, se coloca en el tubo una perla de tungsteno (Valenite) y las muestras se someten a 1 minuto de molienda seca utilizando un molino de bolas Kelco. Luego se sigue el procedimiento estándar DNeasy para aislamiento de ADN (Qiagen, DNeasy 69109). Una alícuota del ADN extraído se tiñe luego con Pico Green (Sondas Moleculares P7589) y se lee en el fluorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/ μl .

7.5.2- *Análisis para el Ensayo del Invasor PAT.*

Las muestras de ADN se diluyeron a 20 ng/μl luego se desnaturalizaron en un ciclador térmico a 95°C durante 10 minutos. La mezcla de la sonda de señal se prepara luego utilizando la oligomezcla provista y MgCl₂ (Third Wave Technologies). Una alícuota de 7,5 μl se coloca en cada celda de la placa para el ensayo del Invasor seguido de una alícuota de 7,5 μl de controles, estándares, y 20 ng/μl de muestras desconocidas diluidas. Cada celda se recubre con 15 μl de aceite mineral (Sigma). Las placas se incuban luego a 63°C durante 1 hora y se leen en el fluorómetro (Biotek). El cálculo del porcentaje, % de señal sobre la señal de fondo para la sonda específica dividido el % de señal sobre la señal de fondo de la sonda control interno será el cálculo de la relación. La relación de estándares de copia conocidos desarrollada y validada con análisis de transferencia Southern se utiliza para identificar la copia estimada de los eventos desconocidos.

7.5.3 - *Reacción en cadena de polimerasa para PAT.*

Un total de 100 ng del ADN total se utiliza como molde. Se utilizan 20 mM de cada cebador con el kit Takara Ex Taq PCR Polimerasa (Mirus TAKRR001 A) Los cebadores para el PAT PTU son (MAS123 Delantero GAACAGTTAGACATGGTCTAAAGG) (SEC ID NO: 5) y (Per5-4 Trasero GCTGCAACACTGATAAATGCCAACTGG) (SEC ID NO: 6). La reacción de PCR se lleva a cabo en el ciclador térmico 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94°C durante 3 minutos y a 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 62°C durante 30 segundos, y 72° C durante 3 minutos y 15 segundos seguidos de 72°C durante 10 minutos. Los cebadores para la región codificadora PCR PAT son (Delantero - ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEC ID NO: 7) y (Trasero - CGGGC AGGCCTAACTCCACCAA) (SEC ID NO: 8). La reacción de PCR se lleva a cabo en el ciclador térmico 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94°C durante 3 minutos y a 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, y 72° C durante 1 minuto y 45 segundos seguidos de 72°C durante 10 minutos. Los cebadores para la región codificadora PCR para DSM-2 son (Delantero - ATGCCTGGAAGTCTGAGGTC) (SEC ID NO: 9) y (Trasero - TGAGCGATGCCAGCATAAGCT) (SEC ID NO: 10). La reacción de PCR se lleva a cabo en el ciclador térmico 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94°C durante 3 minutos y a 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, y 72° C durante 45 segundos seguidos de 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis sobre gel de agarosa al 1% teñido con EtBr.

7.5.4 _ *Análisis de transferencia Southern.*

El análisis de transferencia Southern se realiza con ADN total obtenido del conjunto Qiagen DNeasy. Un total de 5 μg de AND genómico total se somete a una digestión nocturna con NcoI y SwaI para obtener los datos de integración. Una digestión de 5 μg con

52
98

la enzima de restricción Sspl se utilizó para obtener los datos PTU. Después de analizar los datos de digestión de Sspl, la enzima de restricción Mfel se utilizó para digerir todas las muestras restantes porque pareció ser una mejor elección en la enzima. Después de la digestión nocturna una alícuota de -100 ng se corre sobre un gel al 1% para asegurar la digestión completa. Después de asegurarse de esto, las muestras se corren sobre un gel grande de agarosa al 0,85 % durante toda la noche a 40 voltios. El gel se desnaturaliza luego en NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. El gel se neutraliza luego en Tris HCl 0,5 M, NaCl 1, 5 M pH de 7,5 durante 30 minutos. Un aparato para gel que contiene 20x SSC se configura luego para obtener una transferencia de gel a membrana de nylon (Millipore INYC00010) por gravedad durante toda la noche. Después de la transferencia nocturna la membrana se somete a luz UV mediante un unificador de cruce (Stratagene UV stratalinker 1800) a 120.000 microjulios. La membrana se lava luego en SDS al 0,1% , 0,1 de SSC durante 45 minutos. Después del lavado de 45 minutos, la membrana se hornea durante 3 horas a 80°C y luego se almacena a 4° C hasta la hibridación. El fragmento de molde de hibridación se prepara utilizando la PCR de región codificadora que utiliza el ADN de plásmido. El producto se corre sobre un gel de agarosa al 1 % y se divide y luego se extrae el gel utilizando el procedimiento de extracción de gel Qiagen (28706). La membrana se somete luego a una pre-hibridación a 60°C durante 1 hora en búfer Perfect Hyb (Sigma H7033). El procedimiento de la reacción de rotulación Prime it RmT dCTP- (Stratagene 300392) se utiliza para desarrollar la sonda de basada en P³² (Perkin Elmer). La sonda se limpia utilizando las columnas G50 de Probe Quant. (Amersham 27-5335-01). Se utilizaron dos millones de recuentos CPM por ml de búfer de hibridación para hibridar las transferencias Southern durante toda la noche. Después de la hibridación nocturna las transferencias se sometieron a dos lavados de 20 minutos a 65°C en SDS al 0,1%, 0,1 de SSC. Las transferencias se expusieron luego a incubación laminar durante la noche a - 80° C.

7.6 Resultados

Tres transformaciones de maíz mediadas por bigotes se llevaron a cabo con cada una de las dos construcciones (*PAT* y *DSM-2*) descritas anteriormente. De estos experimentos colectivos, se recuperaron 230 aislados. En el medio que contiene 1 y 2 mg/l de bialafos (de Herbiace), la recuperación del evento entre *PAT* y *DSM-2* fue muy similar, sin embargo, la recuperación en el medio de evento que contiene 4 mg/l de bialafos fue más alta para *PAT* que para *DSM-2*.

Tabla Ejemplo. 7.6-1

Construcción	Gen de interés	Eventos completos recuperados por botella			
		1 Herbiace	2 Herbiace	4 Herbiace	

57
28

pDAB3250	DSM2	46	41	17
pDAB3251	PAT	44	37	45

Cuarenta y ocho de los eventos de DSM-2 seleccionados de 1 o 2 Herbiace se entregaron para el análisis de número de copia y la presencia de una unidad de transcripción de planta intacta (PTU) mediante transferencia Southern. Los 48 eventos contenían al menos una copia del gen DSM-2. Un subconjunto de resultados de los eventos de copia inferior (3 o menos) se presentan a continuación.

Tabla Ejemplo 7.6-2

	Integración	PTU
Muestra #	Transferencia Southern de DSM2	Transferencia Southern de DSM2
1941 [1]-005	2	Más grande que lo esperado
1941 [1]-006	3	sí
1941 [1]-008	1	si
1941 [1]-009	2	si
1941 [1]-021	2	si
1941 [1]-023	2	si
1941 [2]-012	2	si
1941 [2]-014	2	si
1941 [2]-016	3	si
1941 [2]-017	2	si
1941 [2]-029	2	si
1941 [4]-038	1	si
1941 [5]-044	2	si
1941 [5]-045	2	si
1941 [5]-047	3	si

54
23

Cuarenta y ocho de los eventos de PAT seleccionados de 1, 2 o 4 Herbiace se entregaron para el análisis de número de copia y la presencia de una unidad de transcripción de planta intacta (PTU) mediante Ensayo Invasor y PCR respectivamente. Los 48 eventos contenían al menos una copia del gen PAT. Un subconjunto de resultados de los eventos de copia inferior (3 o menos) se presentan a continuación

Tabla Ejemplo 7.6-3

ID de Planta	Copia	PTU
	#	PCR
1942[1]-001	1	+
1942[1]-007	3	+
1942[2]-017	2	+
1942f3]-018	1	+
1942[3]-021	1	+
1942[3]-022	1	+
1942[3]-024	3	+

Aproximadamente 6-10 plantas T₀ se regeneraron de cada uno de los 15 eventos que contienen DSM-2- y 7-8 plantas se regeneraron de cada uno de los 7 eventos que contienen PAT mencionados anteriormente para determinar la tolerancia a Liberty.

Las muestras de tejidos de callo de 31 eventos diferentes junto con un callo no transformado (control negativo) se analizaron con el experimento de transferencia Western. Todas las muestras excepto el control negativo tenían una banda observada con peso molecular relativo de 20 kDa para el marcador. Esto concordó con el tamaño previsto para la proteína de 19,7 kDa. Además, la banda tiene el mismo tamaño que la estándar, es decir proteína DSM-2 purificada de *E. coli*. Con 0,7 µg/ml del estándar sobre el gel y dado un puntaje arbitrario de 5 (++++), las bandas de diferentes eventos se clasificaron relativamente y se enumeran en la tabla a continuación.

Tabla Ejemplo 7.6-4

Recuento	Evento #	Gramos	Detección
1	1941[1]-018	0,090	++
2	1941 [1]-019	0,070	+++
3	1941 [1]-020	0,080	++
4	1941 [1]-021	0,060	++
5	1941[1]-022	0,070	++++
6	1941[1]-023	0,050	+
7	1941[1]-024	0,080	++
8	1941 [1]-025	0,050	++
9	1941[1]-026	0,070	+
10	1941[1]-027	0,060	++
11	1941[2]-028	0,080	++++
12	1941[2]-029	0,090	+++

Recuento	Evento #	Gramos	Detección
13	1941[2]-030	0,110	++
14	1941[2]-031	0,140	+++
15	1941[2]-032	0,130	+++
16	1941[2]-033	0,120	+++
17	1941[2]-034	0,070	+++
18	1941[2]-035	0,140	+
19	1941[4]-036	0,160	+
20	1941[4]-037	0,140	++
21	1941[4]-038	0,140	+/-
22	1941[4]-039	0,130	+
23	1941[4]-040	0,100	+/-
24	1941[2]-041	0,130	++
25	1941[2]-042	0,090	+/-
26	1941[2]-043	0,110	+
27	1941[4]-044	0,090	+++
28	1941[4]-045	0,090	++
29	1941[4]-046	0,100	+++
30	1941[4]-047	0,090	+++
31	1941[4]-048	0,110	+

7.6.1 - Comparación directa de pintura de hoja en maíz T₀.

Las plantas T₀ de *DSM-2 (v2)* se pintaron con aplicación débil de herbicida glufosinato. Cuatro plantas hermanas de cada uno de los 15 eventos T₀ se ensayaron, y 4 hojas de cada planta individual recibieron una aplicación débil de glufosinato en aproximadamente estadio V8. Los tratamientos de aplicación débil se aplicaron aleatoriamente para cada proporción permitiendo una variación de la ubicación del tratamiento sobre hojas individuales. Para el maíz, 0,25% v/v de glufosinato es la dosis efectiva mínima para distinguir las plantas sensibles de unas con niveles significativos de resistencia. Las proporciones elevadas se aplicaron además para determinar niveles relativos de resistencia (0,5%, 1,0%, y 2,0% v/v). Los tratamientos de glufosinato se aplicaron utilizando aplicadores con punta de algodón en un área de tratamiento de aproximadamente 2,5 cm de diámetro.

La **Tabla 11** compara la respuesta de los genes *DSM-2 (v2)* y control para impartir resistencia al glufosinato a los transformantes T₀ de maíz. La respuesta se presenta en términos de % del daño visual 2 wat. Los datos se presentan como un histograma de individuos que exhiben poco o ningún daño (<20%), daño moderado (20-40%), o daño severo (>40%). Dado que cada T₀ es un evento de transformación independiente, se puede esperar una variación significativa de las respuestas T₀ individuales dentro de una proporción dada. Se presenta una desviación estándar y media aritmética para cada tratamiento. El maíz de tipo silvestre no transformado fue útil como un control sensible al glufosinato. El gen *DSM-2 (v2)* impartió resistencia al herbicida a las plantas de maíz T₀ individuales. Dentro de un tratamiento dado, el nivel de respuesta de planta varió enormemente y puede atribuirse al hecho de cada planta representa un evento de transformación

56
75

independiente. De importancia, en hasta 2% v/v de glufosinato, el *DSM-2* (v2) funciona mejor en conjunto que las plantas transformadas de *PAT*, Un promedio de daño de población en conjunto por proporción se presenta en la **Tabla 11** simplemente para demostrar la diferencia significativa entre las plantas transformadas con *DSM-2* (v2) versus los controles de tipo silvestre o transformados de *PAT*.

Tabla 11. Respuesta de las plantas de maíz transformadas-(optimizado de planta) T ₀ <i>DSM-2</i> v2 a un rango de proporciones de glufosinato aplicado como pinturas de hoja a las plantas pos emergencia en comparación con las plantas de tipo salvaje y transformadas de <i>PAT</i> T ₀			
	Tipo silvestre	PAT	DSM-2 (v2)
Tratamiento	% Daño	% Daño	% Daño
2% v/v	90	9	4
1%v/v	84	6	2
0,5% v/v	50	3	1
0,25% v/v	33	1	0

7.6.2 Verificación de la alta tolerancia del maíz T₂ al glufosinato

Fueron plantadas las semilla del cruce de *DMS-2* (v2) x 5XH751 T₁ en materas de 4 pulgadas conteniendo el medio Metro Mix y en el estado de dos hojas fueron rociadas en el rociador de pista ajustado a 187l/ha a 560 ia/ha de glufosinato para remover los nulos. A los 7 DAT se removieron los nulos y las plantas resistentes fueron rociadas en el rociador de pista, como antes, a las siguientes tasas: 0, 560, 1120. 2240, 4480 g ia/ha de glufosinato. Las plantas fueron clasificadas a los 3 y 14 DAT y comparadas con las plantas de control 5XH751xHi II. La tabla Ex 7.6.2-1 de abajo muestra que hay plantas de *DMS-2* (v2) individuales que proporcionaron hasta 2240 g ia/ha de glufosinato con menos de 20% de daño. La *DMS-2* (v2) también proporcionó una tolerancia a 4480 g ia/ha de glufosinato en los controles transformados de *PAT*.

Tabla Ex. 7.6.2-1. Respuesta del maíz T ₂ a un rango de tasas de glufosinato aplicado post emergencia (14 DAT)					
<i>DSM-2</i> v2 (pDAS1941)		% Daño			% Daño
Promedios		<20%	20-40%	>40%	Promedio
					Desviación
Control no Tratado		4	0	0	3
560g ia/ha glufosinato		4	0	0	6
1120 g ia/ha glufosinato		2	2	0	18

57
26

Tabla Ex. 7.6.2-1. Respuesta del maíz T ₂ a un rango de tasas de glufosinato aplicado post emergencia (14 DAT)						
DSM-2 v2 (pDAS1941)		% Daño			% Daño	
Promedios		<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desviación
2240 g ia/ha glufosinato		1	3	0	21	5
4480 g ia/ha glufosinato		0	4	0	29	5
PAT (Pdas1942)		%Daño			%Daño	
Promedios		<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desviación std.
Control no Tratado		4	0	0	0	0
560g ia/ha glufosinato		4	0	0	6	5
1120 g ia/ha glufosinato		0	1	3	25	10
2240 g ia/ha glufosinato		2	1	1	25	12
4480 g ia/ha glufosinato		0	3	1	33	5
WT		% Daño			% Daño	
Promedios		<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desviación std.
Control no Tratado		4	0	0	3	3
560g ia/ha glufosinato		0	0	4	100	0
1120 g ia/ha glufosinato		0	0	4	100	0
2240 g ia/ha glufosinato		0	0	4	100	0
4480 g ia/ha glufosinato		0	0	4	100	0

7.6.3 Heredabilidad del DMS-2 (v2) en el maíz

Se plantó semilla del cruce de DMS-2 (v2) x 5xh751 T₁ en materas de 3 pulgadas en un medio que contenía Metro Mix y en estado de dos hojas fue rociada en el rociador de pista ajustado a 187 l/ha a 0, 280, 560, 1120. 2240 y 4480 g ia/ha de glufosinato. Las plantas fueron clasificadas a los 3 y a los 14 DAT y comparadas a las plantas de control 5XH751 x Hi II. Las plantas fueron clasificadas como antes por daño global visual de 0-100%. Para determinar la segregación de cada población se escogió la tasa de 1120g ia/ha y mayor. Las plantas resistentes y las sensitivas fueron contadas y se determinó que todas las de las familias T₁ se segregaron por un solo locus, el rasgo dominante Mendeliano (1R:1S) como se determinó por el análisis de Chi cuadrado. Las plantas sobrevivientes fueron a reproducción vegetativa para producir la generación T₂. El DSM-2

58
27

(v2) es heredable como un robusto gen resistente al glufosinato en múltiples especies cuando se cruza recíprocamente con un híbrido comercial.

Una prueba de progenie también fue conducida en cinco familias T_2 de DSM-2 (v2). Las semillas fueron plantadas en materas de tres pulgadas como se describió anteriormente. En el estado de 3 hojas todas las plantas fueron rociadas con 560g ia/ha de glufosinato en el rociador de pista como se describió anteriormente. Después de 7 DAT, las plantas resistentes y las sensitivas fueron contadas. Cuatro de cinco líneas probadas se segregaron como un solo locus, el rasgo Mendeliano dominante (3R:1S) como se determinó por el análisis de Chi cuadrado.

7.6.4 Apilamiento de DSM-2(v2) para incrementar el espectro herbicida

Ha sido hecho el cruce de las plantas T_1 con el BE1146RR. Las plantas transformadas con DSM-2 (v2) pueden ser fecundadas convencionalmente con otras líneas de maíz que contengan rasgos de interés adicionales. Un BE1146RR endógamo que contenía el rasgo de tolerancia al glifosato CP4 fue cruzado con plantas T_1 que contenían el DSM-2 (v2). Las plantas de la generación subsiguiente pueden ser probadas eficazmente del rasgo de tolerancia a ambos herbicidas por la aplicación de glufosinato y glifosato en secuencia o en mezcla en tanque a tasas iguales a o que exceden las tasas letales normales de los herbicidas (por ejemplo las plantas puede ser rociadas con 280, 560, 1120, g ia/ha o más de ambos herbicidas). Esto identificaría la habilidad para usar ambos herbicidas aplicados en combinación o secuencialmente para manejo de resistencia a los herbicidas.

EJEMPLO 8. DETECCIÓN DE PROTEÍNA DE PLANTAS TRANSFORMADAS MEDIANTE ANTICUERPOS

8.1 Producción de anticuerpo policlonal

Cinco miligramos de DSM-2 (v2) purificado (ver sección anterior) se suministraron a Invitrogen Custom Antibody Services (South San Francisco, CA) para la producción de anticuerpo policlonal de conejo. El conejo recibió 4 inyecciones en el período de 12 semanas conteniendo cada inyección 0,5 mg de la proteína purificada suspendida en 1 ml de adyuvante de Freund incompleto. Se ensayaron los sueros con los experimentos de ELISA directo y transferencia Western para confirmar la especificidad y afinidad.

8.2 Extracción de DSM-2 (v2) del tejido de callo

Cuatro discos de hoja de maíz (Hi-II) utilizando un punzador de un solo orificio se colocaron en tubos micrófugos (sic) que contenían 2 perlas de acero inoxidable (4.5 mm; Daisy Co., Cat# 145462-000) y 500 μ l de búfer de extracción de planta (PBS con contenido de 0,1 % de Triton X-100 y 5 μ l por ml de coctel de inhibidores de proteasa (Sigma Cat # P9599). Los tubos se aseguraron en la Pulverizadora/Geno (Modelo 2000-115, Certiprep, Metuchen, NJ) y se agitaron durante 6 min con una configuración de 1x de 500 rpm. Los

20/9

tubos se centrifugaron a 5000x g durante 10 min el sobrenadante que contiene las proteínas solubles se ensayó según los experimentos de transferencia Western para detectar la presencia de DSM-2 (v2).

8.3 *Análisis de Transferencia Western*

El extracto de hoja se fortaleció con varias concentraciones de DSM-2 (v2) purificado y se incubó en muestra de búfer Laemmli a 95 °C durante 10 min seguido de separación por electroforesis de gel prefabricado de Tris-Glicina al 8-16%. Luego las proteínas se electro-transfirieron en una membrana de nitrocelulosa utilizando un protocolo estándar. Después del bloqueo en leche descremada al 4% en PBS, la proteína DSM-2 (v2) se detectó por antisuero anti-DSM-2 (v2) seguido de conjugados anti-conejo/HRP de cabra. La proteína detectada se visualizó quimioluminiscencia del sustrato con el reactivo ECL de Western Analysis(Amersham Cat.# RPN 21058).

8.4 *Resultados*

Los anticuerpos policlonales para DSM-2 se generaron utilizando proteína expresada en las células E. coli y purificadas a partir de las mismas. Después de cuatro inyecciones, los antisueros tenían un elevado título de anticuerpos anti-DSM-2 como se observó en el ELISA directo. A una dilución de 100.000 veces, el suero todavía suministraba una señal seis veces por encima de la original.

En el análisis de transferencia Western (de DSM-2 en matriz de hoja de maíz tipo silvestre (Hi-II), el suero podía detectar una mayor banda, de aproximadamente 22 kDa, lo cual es comparable con el peso molecular previsto basado en el gen *DSM-2*. La misma banda podía incluso ser detectada cuando el extracto se fortaleció a 5 ng/ml, la concentración más baja ensayada. También se observaron menores bandas a concentraciones de DSM-2 altas, las cuales se creen son agregados de la proteína blanco ya que éstas no se observaron a concentraciones más bajas. Se observó una única banda principal con peso molecular comparable al previsto. (Las líneas de las corridas sobre este gel fueron un marcador de peso molecular, y los extractos de hoja que contenían proteína DSM-2 a concentraciones de 0,005, 0,05, 0,5 y 5 µg/ml, respectivamente.) Además, el anticuerpo policlonal no presentó reacción cruzada con ninguna proteína de hoja de maíz ya que se observó poca señal de origen.

La expresión de DSM-2 del tejido de callo de tabaco transformado se determinó utilizando análisis de transferencia Western. La banda detectada con tamaño comparativo al del estándar (aproximadamente 22 kDa) se observó en diferentes eventos indicando que el DSM-2 se expresó en tejido de tabaco transgénico.

EJEMPLO 9 - TRANSFORMACIÓN DE TABACO (CULTIVO CELULAR)

Cuatro días antes de la transformación, una suspensión de tabaco NT-1 de 1 semana de antigüedad, la cual estaba siendo subcultivada cada 7 días, se subcultivó a medio fresco

60
74

agregando 2 ml del cultivo NT-1 o 1 ml de células empacadas en 40 ml de medio NT-1 B. La suspensión subcultivada se mantuvo en la oscuridad a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en un agitador a 125 rpm

Receta de medio NT-1 B

Tabla Ejemplo 9-1	
Receta de medio NT-1 B	
Reactivo	Por litro
Sales MS (10X)	100 ml
MES	0,5 g
Tiamina-HCl (1 mg/ml)	1 ml
myo-inositol	100 mg
K ₂ HP0 ₄	137,4 mg
2,4-D (10 mg/ml)	222 µl
Sacarosa	30 g
pH hasta 5,7 + 0,03	

Una reserva en glicerol al 50% del *Agrobacterium tumefaciens* [cepa LBA4404] que aloja un vector binario de interés se utilizó para iniciar un cultivo líquido durante la noche agregando 20, 100, o 500 µl a 30 ml de líquido YEP (10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de peptona, 5 g/l de NaCl, 0-10 g/l de sacarosa) que contiene 50-100 mg/l de espectinomicina. El cultivo bacteriano se incubó en la oscuridad a 28°C en una incubadora con agitador a 150-250 rpm hasta que la OD₆₀₀ fue $1,5 \pm 0,2$. Esto tomó aproximadamente 18-20 horas.

Para cada vector ensayado, se transfirieron de 20 a 70 ml de células en suspensión de 4 días de antigüedad en un recipiente estéril, al cual se agregaron 500-1750 µl de suspensión de *Agrobacterium* en la OD apropiada. Para asegurar la obtención de una mezcla uniforme, las células se pipetearon hacia arriba y hacia abajo 5 veces con una pipeta de orificio amplio de 10 ml. La suspensión uniforme o se pasó luego al barril de 25 ml de un pipeteador automático y se dispensaron 250 µl de la suspensión por celda en placas de 24 celdas, continuando hasta que la suspensión se agotó. Las placas de celdas se envolvieron en película parafinada y se cultivaron en la oscuridad a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sin agitar para un co-cultivo de 3 días.

A continuación del co-cultivo, todo el líquido en exceso se eliminó de las celdas individuales con una punta de pipeta de 1 ml, y las células restantes de nuevo se suspendieron en 1 ml de líquido NTC (medio NT-1 B que contenía 500 mg/L de

carbenicilina, agregado después de esterilizar en el autoclave). El contenido de una celda individual se dispersó a través de la superficie completa de placas de selección de 100 x 25 mm utilizando pipetas de transferencia descartables. El medio de selección consistía de medio NTC solidificado con 8g/l de agar TC suplementado con 7,5 hasta 15 mg/l de bialafos glufosinato de amonio de grado técnico, agregado después de esterilizar en el autoclave. Todas las placas de selección, que se dejaron sin envolver, se mantuvieron en la oscuridad a 28°C.

Los transformantes putativos aparecieron como pequeños racimos de callo sobre un fondo de células no transformadas, muertas. Los callos se aislaron aproximadamente en las 2 a 6 semanas posteriores a la transformación. Cada aislado de callo se transfirió a su propia placa de 60 x 20 mm que contenía el mismo medio de selección y se permitió el desarrollo durante aproximadamente 2 semanas antes de ser entregado para el análisis.

9.1 Resultados

Se completó un experimento lado con lado que compara el *DSM-2 (v2)* con el *PAT*. En el estudio, 100% de las placas de selección *PAT* produjeron al menos un aislado positivo de PCR en el medio de 10 mg/l de bialafos, mientras que 79% de las placas de selección de *DSM-2 (v2)* produjeron al menos un aislado positivo de PCR. Todos los eventos se ensayaron para la presencia del gen *DSM-2 (v2)* o *PAT* vía región codificadora PCR, y se halló que eran positivos

Tabla Ejemplo 9-2

Construcción	Gen de interés	Frecuencia de transformación sobre 10 mg/l de Bialafos a continuación de la verificación por PCR
pDAB3778	DSM-2	79%
pDAB3779	PAT	100%

Las transferencias Western se realizaron sobre un pequeño subconjunto de los eventos seleccionados de *DSM-2 (v2)*, y tres eventos positivos se identificaron como se vio en los datos a continuación. En un segundo experimento, las células de tabaco tratadas con *DSM-2 (v2)* se seleccionaron sobre 7, 5, 10, 12, 5 o 15 mg/L de bialafos o de glufosinato de amonio de grado técnico. Las frecuencias de transformación (% de placas de selección que producen al menos un callo) a continuación de la verificación por medio de la región codificadora de PCR, se mencionan en la tabla a continuación.

Tabla Ejemplo 9-3

Concentración en mg/L	Glufosinato	Bialafos
7,5	55,6%	38,9%
10	50,0%	44,4%
12,5	44,4%	38,9%
15	38,9%	22,2%

EJEMPLO 10 - TRANSFORMACIÓN DEL AGROBACTERÍUM DE OTROS CULTIVOS

A la luz de la divulgación presente, se pueden transformar cultivos adicionales de acuerdo con la invención utilizando técnicas que son bien conocidas en el arte. Para la transformación del centeno mediada por el *Agrobacterium*, ver, por ej. Popelka & Altpeter (2003). Para la transformación de la soja mediada por el *Agrobacterium*, ver, por ej. Hinchee et al., 1988. Para la transformación del sorgo mediada por el *Agrobacterium*, ver, por ej. Zhao et al., 2000. Para la transformación de la cebada mediada por el *Agrobacterium*, ver, por ej. Tingay et al., 1997. Para la transformación del trigo mediada por el *Agrobacterium*, ver, por ej. Cheng et al., 1997. Para la transformación del arroz mediado por el *Agrobacterium*, ver, por ej. Hiei et al., 1997.

Los nombres latinos para estas y otras plantas se dan a continuación. Debe ser claro que estas y otras técnicas de transformación (*no-Agrobacterium*) se pueden utilizar para transformar el DSM-2 (v1), por ejemplo, en estas y otras plantas, incluyendo pero no limitadas a 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 azucarera (*Chenopodiaceae Beta vulgaris altissima*), caña de azúcar (*Arenga pinnata*), tomate (*Solanaceae Lycopersicon esculentum* y otros spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* y otro spp., y *Cyphomandra betacea*), papa, patata, centeno (*Pooideae Sécale* spp.), pimientos (*Solanaceae Capsicum annuum*, *sinense*, y *frutescens*), lechuga (*Compositae Lactuca sativa*, *perennis*, y *pulchella*), repollo, apio (*Umbelliferae Apium graveolens*), berenjena (*Solanaceae Solanum melongena*), sorgo (todas las especies de *Sorghum* s), alfalfa (*Leguminosae Medicago sativum*), zanahoria (*Umbelliferae Daucus carota sativa*), habas (*Leguminosae Phaseolus* spp. y otros géneros), avena (*Avena Sativa* y *Strigosa*), frijoles (*Leguminosae Pisum*, *Vigna*, y *Tetragonolobus* spp.), Avena (*Avena Sativa* y *Strigosa*), Arverja (*Leguminosae Pisum*, *Vigna*, y *Tetragonolobus* spp), girasol (*Compositae Helianthus annuus*), calabaza (*Dicotyledoneae Cucúrbita* spp.), pepino (*Dicotyledoneae genera*), tabaco (*Solanaceae Nicotiana* spp.), *Arabidopsis* (*Cruciferae Arabidopsis thaliana*), hierba de césped (*Lolium*, *Agrostis*, y otras familias), y trébol (*Leguminosae*). Tales plantas, con genes DSM-2 (v2),

por ejemplo, se incluyen en la presente invención. El control de vegetación en plantas dotadas con resistencia a glufosinato o bialafos como resultado de la transformación con *DSM-2 (v2)* mejorarse por aplicación selectiva de glufosinato,

DSM-2 (v2) tiene el potencial de aumentar la aplicabilidad de herbicidas que pueden ser inactivados por el *DSM-2* e.g., glufosinato, bialafos y/o fosfinotricin para uso en temporada en muchos sistemas de cultivo de maderables perennes y de hoja caduca. Las especies maderables resistentes a glufosinato y/o bialafos podrían aumentar la flexibilidad del uso sobre la copa de estos herbicidas sin consecuencias nocivas. Estas especies incluirían aunque sin limitarse a: aliso, ceniza, álamo temblón, haya, abedul, cerezo, eucalipto, no americano, arce, roble, pino y álamo blanco. El uso de resistencia a auxina para el control selectivo en especies decorativas está también dentro del alcance de la invención. Los ejemplos incluirían, aunque sin limitarse a, rosas, *Euonymus*, petunia, begonia y caléndulas.

EJEMPLO 11 - *DSM-2 (V2)* APILADO CON LA CARACTERÍSTICA DE TOLERANCIA AL GLIFOSATO EN CUALQUIER CULTIVO

La mayor parte de los acres de algodón, canola, y soja plantados en América del Norte contienen una característica de tolerancia al glifosato. La adopción de GT del maíz está en aumento. Los cultivos GT adicionales (por ej., trigo, arroz, remolacha azucarera, y césped) han estado en desarrollo pero no han sido colocadas en el comercio hasta la fecha. Muchas otras especies resistentes al glifosato están en estado experimental o de desarrollo (por ej., alfalfa, caña de azúcar, girasol, arveja, zanahoria, pepino, lechuga, cebolla, fresa, tomate, y tabaco, especies forestales del tipo álamo y estoraque americano; y especies de horticultura como caléndula, petunia y begonias; en la World Wide Web isb.vt.edu/cfdocs/fieldtest1.cfm, 2005). Las GTC son herramientas valiosas para la extensión completa de las malezas controladas, convenientes y efectivas en costo suministradas por este sistema.

Sin embargo, la utilidad del glifosato como un tratamiento estándar ahora es la selección de malezas resistentes al glifosato. Además, las malezas en las que el glifosato es inherentemente menos eficaz están cambiando a ser las especies predominantes en campos donde los programas químicos en práctica son únicamente con glifosato. Mediante el apilamiento del *DSM-2 (v2)* con una característica GT sea a través de la fecundación convencional o en conjunto como un evento de transformación novedoso, la eficacia en el control de las malezas, la flexibilidad, la capacidad de manejar los cambios de las malezas y el desarrollo de resistencia al herbicida podrían ser mejorados. Se pueden visualizar varios escenarios para las opciones de control de malezas mejorado donde el *DSM-2 (v2)* y una característica GT se apilan en cualquier especie de cultivo monocotiledónea o dicotiledónea:

a) El glifosato se puede aplicar en una proporción estándar de aplicación posemergente (420 a 2160 g ae/ha, preferentemente 560 a 840 g ae/ha) para el control de la mayoría de las especies de malezas de hoja ancha y césped. Para el control de las malezas de hoja ancha resistentes al glifosato del tipo *Conyza canadensis* o las malezas inherentemente difíciles de controlar con glifosato (por ej., *Commelina* spp, *Ipomoea* spp, etc), 280-2240 g ae/ha (preferentemente 350-1700 g ae/ha) se puede aplicar glufosinato en forma consecutiva, mezcla en tanque, o una premezcla con glifosato para suministrar control efectivo.

b) Normalmente, las proporciones aplicadas para el rango general de GTC varían desde 560 hasta 2240 g ae/ha por tiempo de aplicación. El glifosato es lejos más eficaz en las especies de césped que en las especies de malezas de hoja ancha. Las características apiladas de *DSM-2* (v2) + GT permitirían proporciones de glifosato eficaces para el césped (105-840 g ae/ha, con mayor preferencia 210-420 g ae/ha). El glufosinato (a 280-2240 g ae/ha, con mayor preferencia 350-1700 g ae/ha) podría aplicarse luego en forma consecutiva, como mezcla en tanque, o como una premezcla con proporciones de glifosato eficaces para el césped para suministrar el control de maleza de hoja ancha necesario.

Un experto en la técnica del control de malezas reconocerá que otros herbicidas (por ej. Bialafos) pueden habilitarse por la transformación de las plantas con *DSM-2* (v2). Las proporciones específicas se pueden determinar por las etiquetas de los herbicidas compiladas en el libro CPR (Referencia para Protección de Cultivos) o compilación similar, etiquetas compiladas en línea (por ej., cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía de protección de cultivos comercial o académica tal. Como Crop Protection Guide de Agrilience (2003). Cada herbicida alternativo apto para el uso en CTHs por *DSM-2* (v2), ya sea usado solo, en mezcla en tanque, o en forma consecutiva, se considera dentro del alcance de esta invención.

EJEMPLO 12 - *DSM-2* (V2) APILADO CON CARACTERÍSTICA AHAS EN CUALQUIER CULTIVO

La tolerancia al herbicida imidazolinona (*AHAS*, et al.) normalmente está presente en un número de cultivos plantados en América del Norte que incluyen, pero sin limitación a, maíz, arroz y trigo. Otros cultivos tolerantes a la imidazolinona (por ej., algodón y remolacha azucarera) han estado en desarrollo pero no se han liberado al comercio hasta la fecha. Muchos herbicidas de imidazolinona (por ej. imazamox, imazetapir, imazaquin, e imazapic) se utilizan normalmente en forma selectiva en varios cultivos convencionales. El uso de imazetapir, imazamox, y el imazapir no selectivo ha sido habilitado a través de las características de tolerancia de la imidazolinona como *AHAS* et al. Las CTH tolerantes a la imidazolinona comerciales a la fecha tienen la ventaja de ser no transgénicas. Esta clase de química también tiene actividad residual en suelo significativa, pudiendo de este modo

suministrar control de maleza extendido más allá del tiempo de aplicación, a diferencia del glifosato o sistemas basados en glufosinato. Sin embargo, el espectro de malezas controladas por los herbicidas de imidazolinona no es tan amplio como el del glifosato (Agrilience, 2003). Además, los herbicidas de imidazolinona tienen un modo de acción (inhibición de acetolactato sintasa, ALS) a la cual muchas malezas han desarrollado resistencia (Heap, 2004). Al apilar *DSM-2 (v2)* con una característica de tolerancia a la imidazolinona, ya sea a través de fecundación convencional o en conjunto como un evento de transformación novedoso, la eficacia de control de maleza, la flexibilidad, y la capacidad de manejar los cambios de malezas y el desarrollo de resistencia al herbicida podría mejorarse. Varios escenarios para las opciones de control mejorado pueden ser previstos donde el *DSM-2 (v2)* y la característica de tolerancia a la imidazolinona se apilan en cualquier especie de cultivo monocotiledónea o dicotiledónea:

a) Se puede aplicar Imazetapir en una proporción de aplicación pos emergente estándar de (35 a 280 g ae/ha, preferentemente 70-140 g ae/ha) para el control de muchas especies de maleza de hoja ancha y césped.

i) Las malezas de hoja ancha resistentes al inhibidor ALS del tipo

Amaranthus rudis, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album* (entre otros, Heap, 2004) podrían controlarse mediante una mezcla en tanque 280-2240 g ae/ha, con mayor preferencia 350-1700 g ae/ha de glufosinato.

ii) Las especies de hoja ancha inherentemente más tolerantes a los herbicidas de imidazolinona del tipo *Ipomoea spp.* también se pueden controlar por mezcla en tanque 280-2240 g ae/ha, con mayor preferencia 350-1700 g ae/ha de glufosinato. Un experto en la técnica en control de malezas reconocerá que el uso de cualquiera de varios herbicidas de imidazolinona comerciales, y los herbicidas basados en glufosinato, solo o en múltiples combinaciones, está permitido por la transformación y apilamiento de *DSM-2 (v2)* con cualquier característica de tolerancia de imidazolinona ya sea por fecundación convencional o ingeniería genética. Las proporciones específicas de otros herbicidas representativos de estos químicos pueden ser determinadas por las etiquetas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Referencia de Protección de Cultivo) o compilación similar, etiquetas compilada en línea (por ej., cdms.net/manuf/manuf.asp), o cualquier guía de protección de cultivo comercial o académica tal como la Crop Protection Guide de Agrilience (2003). Cada herbicida alternativo para uso en CTHs por el *DSM-2 (v2)*, ya sea usado solo, mezclado en tanque, o en forma consecutiva, se considera dentro del alcance de esta invención.

EJEMPLO 13 - *DSM-2 (v2)* EN ARROZ

13.1 - Descripción de medios

Los medios de cultivo empleados se ajustaron hasta pH 5,8 con KOH 1 M y solidificado con 2,5 g/l Phytigel (Sigma). Los callos embriogénicos se cultivaron en bandejas de Petri de 100 x 20 mm que contenían 40 ml de medio semi-sólido. Las suspensiones de células se mantuvieron en frascos cónicos de 125-ml que contenían 35 ml de medio líquido y se rotaron a 125 rpm. La inducción y el mantenimiento de los cultivos embriogénicos tuvieron lugar en la oscuridad a 25-26°C (Zhang *et al.* 1996).

La inducción y el mantenimiento del callo embriogénico tuvo lugar sobre un medio basal NB según se describió previamente (Li *et al.* 1993), pero adaptado para contener 500 mg/l de glutamina. Los cultivos en suspensión se iniciaron y se mantuvieron en medio de líquido SZ (Zhang *et al.* 1998) con la inclusión de 30 g/l de sacarosa en lugar de maltosa. El medio osmótico (NBO) consistía de medio NB con la adición de 0,256 M de manitol y sorbitol. El callo resistente al herbicida se seleccionó del medio NB suplementado con 8 mg/l de bialafos durante 9 semanas con subcultivo cada 3 semanas.

13.2- Desarrollo del cultivo de tejido.

Las semillas disecadas maduras de *Oryza sativa* L. japónica cv. Taipei 309 se esterilizaron como se describe en Zhang *et al.* 1996. Los tejidos embriogénicos se indujeron por subcultivo de semillas de arroz maduras estériles sobre medio NB en la oscuridad. El callo primario de aproximadamente 1 mm de diámetro, se retiró del escutelio y se utilizó para iniciar la suspensión celular en medio líquido SZ. Las suspensiones luego se mantuvieron según se describió en Zhang 1995. Los tejidos embriogénicos derivados de la suspensión se eliminaron del cultivo líquido 3 a 5 días después del subcultivo previo y se colocaron sobre medio osmótico NBO para formar un círculo de aproximadamente 2,5 cm en una bandeja Petri y se cultivaron durante 4 horas antes del bombardeo. De dieciséis hasta 20 horas después del bombardeo, los tejidos se transfirieron del medio NBO sobre el medio de selección herbiace NBH8, asegurando que la superficie bombardeada estuviera orientada hacia arriba, y se incubaron en la oscuridad durante 3 semanas. El callo nuevo formado se subcultivó a un medio NBH8 fresco dos veces cada 3 semanas.

13.3 - Bombardeo por microproyectiles.

Todos los bombardeos se condujeron con el sistema Biolistic PDS-1000/He™ (Bio-Rad, Laboratories, Inc.). Tres miligramos de partículas de oro de 1,0 micrones de diámetro se lavaron una vez con etanol al 100%, dos veces con agua destilada estéril y se suspendieron de nuevo en 50 µl de agua en un tubo Eppendorf siliconado. Cinco microgramos de ADN de plásmido, 20 µl de espermidina (0,1 M) y 50 µl de cloruro de calcio (2,5 M) se agregaron a la suspensión de oro. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, se peletizó a 10000 rpm durante 10 s, se resuspendió en 60 µl de etanol al 100% frío y 8-9 µl se distribuyeron sobre cada macro transportador. Las muestras de tejido se bombardearon a 77,33 kg/cm² (1100 psi) y un de vacío de 27 pulgadas de Hg según se describió en Zhang *et al.* (1996).

EJEMPLO 14 - DSM-2 (v2) APILADO CON AAD-1 (v3) EN CUALQUIER CULTIVO

El glufosinato, como el glifosato, es un herbicida de amplio espectro para hoja ancha y césped, relativamente no selectivo. El modo de acción del glufosinato difiere de el del glifosato. Es de acción más rápida, dando por resultado la disecación y la "quemadura" de las hojas tratadas de 24 a 48 horas después de la aplicación del herbicida. Esto es ventajoso para la apariencia del control rápido de maleza. Sin embargo, esto también limita la traslocación del glufosinato a las regiones meristemáticas de las plantas blanco dando por resultado un control de malezas deficiente según se evidencia por las clasificaciones relativas del rendimiento en control de malezas de los dos compuestos en muchas especies (Agrilience, 2003).

Al apilar AAD-1 (v3) (ver; USSN 11/587.893; y WO 2005/107437) con una característica de tolerancia al glufosinato, ya sea a través de la fecundación convencional o en conjunto como un evento de transformación novedoso, la eficacia de control de la maleza, la flexibilidad, y la capacidad de manejar los cambios de maleza y el desarrollo de resistencia al herbicida podrían mejorarse. Como se mencionó en los ejemplos previos, al transformar cultivos con AAD-1 (v3), se puede aplicar en forma selectiva herbicidas AOPP en cultivos monocotiledóneos, los cultivos monocotiledóneos tendrían un margen alto de seguridad a la fenoxi auxina, y las fenoxi auxinas se pueden aplicar en forma selectiva en cultivos dicotiledóneos. Se pueden visualizar varios escenarios para las opciones de control mejorado de malezas donde el AAD-1 (v3) y una característica de tolerancia al glufosinato se apilan en cualquier especie de cultivo monocotiledóneo o dicotiledóneo:

- a) El glufosinato se puede aplicar en una proporción de aplicación pos emergente estándar (200 hasta 1700 g ae/ha, preferentemente 350 hasta 500 g ae/ha) para el control de muchas especies de maleza de hoja ancha y césped. A 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 lo que es el glifosato.
 - i) las especies de malezas de césped inherentemente tolerantes (por ej., *Echinochloa spp* o *Sorghum spp*) podrían ser controladas por mezcla en tanque 10-200 g ae/ha (preferentemente 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 ser controladas por mezcla en tanque 280-2240 g ae/ha, con mayor preferencia 560-2240 g ae/ha de 2,4-D para un control eficaz de estas especies perennes de difícil control y para fortalecer el control anual sobre las especies de malezas de hoja ancha

62

- b) Una combinación de tres formas de glufosinato (200-500 g ae/ha) + 2,4-D (280-1120 g ae/ha) + quizalofop (10-100 g ae/ha), por ejemplo, podrían aportar un espectro de control de maleza sobrepuesto y más fuerte. Además, el espectro sobrepuesto provee un mecanismo adicional para el manejo o retardo de las malezas resistentes al herbicida.

EJEMPLO 15 - DSM-2 (v2) APILADO CON AAD-12 (v2) EN CUALQUIER CULTIVO

El glufosinato, como el glifosato, es un herbicida de amplio espectro para hoja ancha y césped, relativamente no selectivo. El modo de acción del glufosinato difiere del modo de acción del glifosato. Es de acción más rápida, dando por resultado la disecación y la "quemadura" de las hojas tratadas de 24 a 48 horas después de la aplicación del herbicida. Esto es ventajoso para la apariencia del control rápido de maleza. Sin embargo, esto también limita la traslocación del glufosinato a las regiones meristemáticas dando por resultado un control de malezas deficiente según se evidencia por las clasificaciones relativas del rendimiento en control de malezas de los dos compuestos en muchas especies (Agrilience, 2005).

Al apilar A4D-7 (v1) con una característica de tolerancia al glufosinato, ya sea a través de la fecundación convencional o en conjunto como un evento de transformación novedoso, la eficacia en control de la maleza, la flexibilidad, y la capacidad de manejar los cambios de la maleza y el desarrollo de resistencia al herbicida podrían mejorarse. Varios escenarios para las opciones de control mejorado de maleza se pueden visualizar donde el AAD-12 (v1) y una característica de tolerancia al glufosinato se apilan en cualquier especie de cultivo monocotiledóneo o dicotiledóneo:

- a) El glufosinato se puede aplicar en una proporción de aplicación pos emergente estándar (200 hasta 1700 g ae/ha, preferentemente 350 hasta 500 g ae/ha) para el control de muchas especies de maleza de hoja ancha y césped. A 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 lo que es el glifosato.
 - i) las especies de maleza de hoja ancha inherentemente tolerantes (por ej., *Cirsium arvensis*, *Apocynum cannabinum*, y *Conyza canadensis*) podría estar controladas por la mezcla en tanque 280-2240 g ae/ha, con mayor preferencia 560-2240 g ae/ha de 2,4-D para un control eficaz de estas especies perennes de difícil control y para fortalecer el control anual sobre las especies de malezas de hoja ancha. El triclopir y el fluroxipir serían componentes aceptables para considerar el régimen de control de la maleza. Para el triclopir, las proporciones de aplicación típicamente estarían en el rango de

70-1120 g ae/ha, más típicamente 140-420 g ae/ha. Para el fluroxipir, las proporciones de aplicación típicamente estarían en el rango de 35-560 g ae/ha, más típicamente 70-280 ae/ha.

- b) Una combinación múltiple de glufosinato (200-500 g ae/ha) +/- 2,4-D (280-1120 g ae/ha) +/- triclopir o fluroxipir (en las proporciones mencionadas anteriormente), por ejemplo, podrían aportar un espectro solapado y más fuerte para control de malezas. Además, el espectro sobrepuesto provee un mecanismo adicional para el manejo o retardo de las malezas resistentes al herbicida.

EJEMPLO 16 – DSM-2 (v2) APILADO CON RASGO DE RESISTENCIA A INSECTOS (IR) O CON LA INTRODUCCIÓN DE OTRO RASGO EN CUALQUIER CULTIVO

La resistencia a los insectos en cultivos, proporcionada por un rasgo transgénico, se ha generalizado en la producción de maíz y algodón en Norteamérica y en todo el mundo. Los productos comerciales que tienen rasgos combinados para IR y HT han sido desarrollados por múltiples compañías de semillas. Estos incluyen los rasgos de Bt IR (por ej., la toxinas Bt en lista en el sitio web lifesci.sussex.ac.uk, 2006) y cualquiera de los otros rasgos HTC mencionados anteriormente. Así, el valor de estas ofertas en venta incluye la capacidad de controlar múltiples problemas de plagas por medios genéticos en una sola oferta. La conveniencia de esta oferta se restringiría si el control de malezas y el control de insectos se llevan a cabo independientemente uno de otro. El DSM-2 (v2) solo o apilado con uno o más rasgos HTC adicionales puede apilarse con uno o más rasgos introducidos adicionales (por ej., resistencia a insectos, resistencia a hongos, o tolerancia a la carga y otros) (isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005) ya sea por fecundación convencional o en unión como un evento nuevo de transformación. Los beneficios incluyen la conveniencia y flexibilidad descritos en los anteriores ejemplos 11 -15, junto con la capacidad de manejar plagas de insectos y/u otras cargas agronómicas en adición al mejor control de malezas ofrecido por el DSM-2 (v2) y la tolerancia asociada a los herbicidas. Así, la presente invención puede usarse para suministrar un paquete completo para agronomía, con calidad mejorada del cultivo y la capacidad de flexibilizar y controlar con eficiencia en costos cualquier cantidad de eventos de agronomía.

La combinación de rasgos de IR y HT tiene aplicación en la mayoría de los cultivos de horticultura/ornamentales y agronómicos y en silvicultura. La combinación del DSM-2 (v2) y su conmensurable tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos aportada por algunos entre la cantidad de genes IR Bt o no Bt puede alicarse a las especies de cultivos inscritas (pero no limitadas a) en el ejemplo 10. Alguien con experiencia en la técnica de control de malezas reconocerá que apilar el DSM-2 con el correspondiente rasgo Ht o

rasgo IR puede efectuarse, por ejemplo, por fecundación convencional o por ingeniería genética.

EJEMPLO 17 – COMBINACIONES DE GENES ADICIONALES

La presente invención incluye también plantas que producen una o más enzimas de la presente invención "apiladas" juntas con uno o más genes resistentes a herbicida, incluyendo pero sin estar limitados a glifosato, ALS-(imidazolinona, sulfonilurea), oriloxialcanoato, HPPD-, PPO-, y genes resistentes al glufosinato, a fin de proveer plantas tolerantes al herbicida compatibles con opciones de controles de malezas más robustos y amplios y manejo de la resistencia a herbicidas. La presente invención incluye, además, métodos y composiciones que utilizan homólogos de los genes y proteínas ejemplarizadas en la presente.

En algunas modalidades, la invención provee plantas monocotiledóneas y dicotiledónea tolerantes al bialafos, al fosfinotricin o al glufosinato y uno o más herbicidas disponibles comercialmente (e.g. glifosato, glufosinato, paraquat, inhibidores de ALS-(e.g. sulfonilureas, imidasolinonas, triazolopirimidin sulfonanilidas, et al.), inhibidores de HPPD (e.g. mesotrion, isoxaflutol, et al.), 2,4-D, fluroxipir, tricoplr, dicamba, bromoxinil, ariloxifenoxipropionatos, y otros).

También se divulgan los vectores que comprenden secuencias de ácido nucleico responsables de la tolerancia a herbicidas, como lo son los métodos para usar dichas plantas tolerantes y las combinaciones de herbicidas para el control de malezas y la prevención de los cambios de las poblaciones de malezas. La presente invención capacita combinaciones de herbicidas novedosas para ser usadas de maneras nuevas. La presente invención además proporciona métodos novedosos de prevenir el desarrollo de y el control de las cepas de maleza que son resistentes a uno o más herbicidas tal como el glifosato. La presente invención capacita los usos novedosos de las combinaciones novedosas de herbicidas y cultivos, incluyendo la aplicación pre-siembra en un área a ser plantada inmediatamente antes de ser plantada con semilla de plantas que de otra forma serían sensitivas al herbicida (tal como glufosinato).

Los presentes genes puede ser apilados con uno o más genes *pat/bar*, para un mecanismo adicional para la tolerancia al glufosinato, el cual es bien conocido en la técnica.

Para el uso de un gen, en plantas, que codifiquen un HPPD (hidroxil-fenil pirovat dioxigenasas), véase e.g. la patentes estadounidenses números 6,268,549 y 7,297,541. Tales plantas "apiladas" pueden ser combinadas con otro(s) gene(s) para resistencia a glufosinato, y tales plantas "apiladas" (y varias otras plantas y plantas apiladas de la presente invención) pueden ser usadas para prevenir el desarrollo de resistencia al glifosato.

También pueden ser usados (apilados) con los gene(s) DMS-2 de la presente invención los genes que codifican enzimas con actividad glifosato N- acetiltransferasa (GAT). Véase e.g. Castle *et al.* (2004), Discovery of Directed Evolution of a Glophosato Tolerance Gene, *Science* Vol. 34, pp 1151-1154; y WO 2002/36782.

Los presentes genes DSM-2 también pueden ser apilados con los genes AAD-1 y AAD-13 de las WO 2005/107437, WO 2007/053482 y USSN 60/928,303, respectivamente, y pueden ser usados para combatir la resistencia al glifosato en algunas modalidades preferidas, como se divulga en la presente.

REIVINDICACIONES

①. Un vector que comprende un promotor que puede operar en una célula de planta, y un polinucleótido enlazado operativamente a dicho promotor, en donde dicho polinucleótido codifica una proteína que tiene actividad de fosfinotricin acetiltransferasa, y en donde dicha polinucleótido produce híbridos bajo condiciones de 6XSSC a 65°C con el pleno complemento de una sonda de ácido nucleico que codifica la secuencia identificada con el No. 2 (SEC ID NO:2.).

②. Un método para utilizar un gen de resistencia a la fosfinotricina como marcador de resistencia en las células de planta, comprendiendo dicho método los pasos de someter una pluralidad de células de planta a transformación con un vector de la reivindicación 4, cultivar las células en un medio, exponer las células a la fosfinotricina, y determinar si las células son resistentes a la fosfinotricina.

③. Un proceso para generar células de planta, plantas y sus propagaciones resistentes a la fosfinotricina, en donde dicho método comprende transformar las células de planta con el vector de la reivindicación 1, y regenerar las células de planta transformadas a plantas que producen propagaciones.

4. Un proceso para la producción de una planta resistente a la fosfinotricina, en donde dicho método comprende incorporar al genoma de la planta el vector de la reivindicación 1, y seleccionar por resistencia a la fosfinotricina.

⑤. Un proceso para la producción de una célula de planta que sea tolerante a la actividad herbicida de un inhibidor de glutamin sintetasa que incluye fosfinotricina o un compuesto con una porción de fosfinotricina, en donde dicho método comprende el paso de incorporar al genoma nuclear de una célula de planta inicial un ADN recombinante que comprende:

- a. un promotor reconocido por una polimerasa de dicha célula de planta inicial, y
- b. una región codificadora que comprende un fragmento de ADN de un microorganismo *Streptomyces coelicolor* A3 que produce dicho inhibidor de glutamina sintetasa, en donde dicho fragmento de ADN codifica una proteína con actividad de acetiltransferasa a dicho inhibidor de glutamin sintetasa.

6. Un proceso para producir una planta que es tolerante a la actividad herbicida de un inhibidor de glutamin sintetasa que incluye la fosfinotricina o un compuesto con una porción de fosfinotricina, en donde dicho proceso comprende los pasos de a) producir una célula de planta de la reivindicación 1, y b) regenerar una planta a partir de dicha célula, comprendiendo dicha planta dicho polinucleótido en su genoma nuclear.

73
62

⑦ Un proceso para proteger un grupo de plantas cultivadas en un campo destruyendo las malezas, en donde dichas plantas han incorporado en el genoma de sus células un vector de la reivindicación 1, en donde dichas malezas son destruidas por la aplicación de un herbicida que comprende un inhibidor de glutamin sintetasa como ingrediente activo.

⑧ Un proceso para producir un cultivo puro de células de planta transformadas que tienen un ADN foráneo en su genoma nuclear, comprendiendo dicho método los pasos de:

- a. Transformar las células de planta iniciales en un cultivo de célula de planta con un ADN foráneo, comprendiendo dicho ADN foráneo:
 - i. un promotor reconocido por las polimerasas de dicha célula de planta inicial y
 - ii. una región codificadora que comprende un fragmento de ADN de un microorganismo *Streptomyces coelicolor* A3 que produce un inhibidor de glutamin sintetasa, que incluye fosfinotricina o un compuesto con una porción de fosfinotricina, en donde dicho fragmento de ADN codifica una proteína con actividad de acetiltransferasa a dicho inhibidor de glutamin sintetasa; y
- b. Seleccionar las células de planta transformadas aplicando al cultivo celular de planta dicho inhibidor de glutamin sintetasa a una concentración suficiente para destruir las células de planta no transformadas.

⑨ Un método para producir una proteína sintética que tiene actividad de fosfinotricin acetiltransferasa, en donde dicho método comprende modificar una proteína que codifica la secuencia con número de identificación 2 (SEC ID NO:2) para producir una proteína variante, y analizar dicha proteína variante para determinar dicha actividad.

10. El método de la reivindicación 9, en donde dicho método comprende modificar un polinucleótido seleccionado del grupo integrado por la secuencia con número de identificación 1 (SEC ID NO:1) y la secuencia con número de identificación 3 (SEC ID NO:3) para crear una pluralidad de polinucleótidos modificados, y utilizar dichos polinucleótidos modificados en un procedimiento de entremezclado de genes.

11. El método de la reivindicación 9, en donde dicho método comprende modificar un polinucleótido seleccionado del grupo integrado por la secuencia con número de identificación 1 (SEC ID NO:1) y la secuencia con número de identificación 3 (SEC ID NO:3) mediante PCR con propensión a error.

12. El método de la reivindicación 9, en donde dicho método comprende modificar al menos un polinucleótido que codifica por lo menos una de dichas secuencias de aminoácidos.

13. Una célula bacteriana diferente de *Streptomyces* en donde dicha célula comprende un vector de la reivindicación 1.

14. Un método para seleccionar una célula de planta que comprende un vector de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende

- a. proveer dicho vector a una pluralidad de células ; y
- b. cultivar dicha pluralidad de células en una concentración de un herbicida que permita que las células que expresan dicho polinucleótido crezcan mientras destruyen o inhiben el desarrollo de las células que carecen de dicho vector, en donde dicho herbicida comprende fosfinotricina.

15. El método de la reivindicación 14, en donde dicho método se utiliza en un sistema de expresión seleccionado del grupo integrado por un sistema de expresión bacteriano, un sistema de expresión de cultivo de células de planta, un sistema de expresión de algas, un sistema de expresión de células animales, un sistema de expresión viral, un sistema de expresión de hongos y un sistema de expresión de levaduras.

16. El método de la reivindicación 15, en donde dicho sistema de expresión es un sistema de expresión de *Pseudomonas fluorescens*.

17. La célula de planta transgénica de la reivindicación 1, en donde dicha célula comprende además un gen con resistencia a herbicidas seleccionado del grupo integrado por AAD-1 y AAD-12.

18. Un método para seleccionar o distinguir una planta individual o un grupo de plantas de cultivo que contienen un gen DSM-2 entre una población de plantas de la misma especie que no contienen el gen.

19. El método de la reivindicación 18 que comprende la aplicación de glufosinato o bialafos a la colección de plantas.

20. El método de la reivindicación 18 en donde dicho método es practicado en un invernadero, en una cámara de crecimiento, o en el campo.

21. Un método para controlar por lo menos una maleza en el campo, comprendiendo dicho método la siembra en dicho campo de semilla de por lo menos una planta transgénica que contiene un vector de la reivindicación 1, comprendiendo dicha planta

- a. un polinucleótido heterólogo que codifica una enzima que confiere resistencia a un herbicida inhibidor de la glutamin sintetasa, y
- b. un segundo polinucleótido heterólogo que codifica una enzima que confiere resistencia a por lo menos otro herbicida;

Adicionalmente, comprendiendo dicho método la aplicación a por lo menos una porción de dicho campo de un primer herbicida seleccionado entre un grupo que consta de glufosinato,

fosfinotricin y bialafos; y aplicando dicho por lo menos uno de otros herbicidas a dicha por lo menos una parte de dicho campo.

22. Un método para detectar si una planta contiene un polinucleótido de la reivindicación 1 en donde dicho método comprende la recolección de una muestra de dicha planta y analizar dicha muestra para probar la presencia de dicho polinucleótido.

23. El método de la reivindicación 22 en donde dicho método comprende analizar dicha muestra para probar la presencia de una proteína codificada por dicho polinucleótido.

24. El método de la 22 en donde dicho método comprende usar un cebador de PCR o una sonda para detectar la presencia de dicho polinucleótido.

25. El método de la reivindicación 22 en donde dicho método comprende el uso de un anticuerpo para detectar la presencia de dicha proteína.

26. Un método para controlar por lo menos una maleza en el campo, comprendiendo dicho método el crecimiento de por lo menos una planta que contiene un vector de la reivindicación 1 en dicho campo, y la aplicación de un herbicida inhibidor de la glutamin sintetasa a por lo menos una porción de dicho campo.

27. El método de la reivindicación 12 en donde dicha planta es una monocotiledónea.

28. El método de la reivindicación 27 en donde dicha monocotiledónea se selecciona entre un grupo que consta de maíz, arroz, trigo, cebada, centeno, caña de azúcar, pasto césped de estaciones cálidas y frías, avena, sorgo, y las hierbas para pastura.

29. El método de la reivindicación 12 en donde dicha planta es una dicotiledónea.

30. El método de la reivindicación 18 en donde dicho gen DSM-2 funciona como un marcador seleccionable y dicho método se practica en invernadero, una cámara de crecimiento o en el campo.

31. Un método de usar un polinucleótido para producir una planta transgénica que contiene un vector de la reivindicación 1, en donde dicho polinucleótido tiene un codón usado para incrementar la expresión de la planta.

32. Un método de usar una proteína para comunicar a una planta tolerancia a los herbicidas, en donde dicho método comprende integrar dentro de una planta de cultivo un polinucleótido, en donde dicho polinucleótido codifica dicha proteína y dicha proteína tiene la actividad de la fosfinotricin acetiltransferasa, en donde dicho polinucleótido produce híbridos bajo condiciones de 6XSSC a 65°C con el pleno complemento de una sonda de ácido nucleico que codifica la secuencia con número de identificación 2 (SEQ ID NO:2), y en donde la expresión de dicho polinucleótido y la producción de dicha proteína dan a dicha planta tolerancia a un herbicida de fosfinotricina.

RESUMEN

La presente invención se refiere a un nuevo gen denominado, en la presente, *DSM-2*. Este gen se identificó en el *Streptomyces coelicolor* A3. La proteína *DSM-2* está relacionada en forma distante con el PAT y BAR. La presente invención además provee genes optimizados de plantas que codifican las proteínas *DSM-2*. El *DSM-2* se puede utilizar como una característica transgénica para impartir tolerancia en plantas y células de plantas a los herbicidas glufosinato y bialafos. Un uso preferido de los presentes genes es en forma de marcadores seleccionables. El uso de este gen como marcador seleccionable en un sistema bacteriano puede incrementar la eficiencia para las transformaciones de plantas. El uso de *DSM-2* como marcador único de selección elimina la necesidad de un marcador de antibiótico medicinal adicional (tal como el de resistencia a la ampicilina) durante la clonación. Además son posibles varios usos adicionales de acuerdo con la presente invención.

JK
96

DAS-136XC1-PCT
LISTA DE SECUENCIAS

<110> Dow AgroSciences LLC
Lira, Justin M.
Wright, Terry R.
Robinson, Andrew
Russell, Sean M.
Merlo, Donald J.
Webb, Steven Robert
Arnold, Nicole
Smith, Kelley

<120> Novedosos Genes Marcadores Seleccionables

<130> DAS-136XC1

<140> 60/873,602

<141> 2006-12-07

<160> 10

<170> Patente en Versión 3.3

<210> 1
<211> 516
<212> DNA
<213> Streptomyces coelicolor A3

<400> 1
atgccgggaa ctgccgaggt ccaggtcaga ccgggagtcg aggaggatct caagccactc 60
accgacctct acaaccacta cgtacgtgag acgcccata cgttcgacac cgagccgttc 120
actccggagg agcgccgacc gtggctgctc tcccacctg aagacggccc gtaccgcctg 180
agggttgcca cggacgcgga gtcacaggag atcctggggt acgccacatc cagcccctac 240
cgcgcaagc ccgcctacgc gacctcggtg gagaccacg tctacgtcgc cccggggggc 300
ggcgggccgc gcatcggtc gctcctctac gcgtccctct tcgacgcctt ggccgcccag 360
gacctgcacc gcgcctacgc gggcatcgcc cagcccaacg aggcctccgc ccggtgcac 420
gcgcgcttcg gtttccggca cgtgggcacg taccgcgagg tgggccgcaa gtccggccgg 480
tactgggacg tggcctggta cgagagaccg ctctag 516

<210> 2
<211> 171
<212> PRT
<213> Streptomyces coelicolor A3

<400> 2
Met Pro Gly Thr Ala Glu Val Gln Val Arg Pro Gly Val Glu Glu Asp
1 5 10 15
Leu Lys Pro Leu Thr Asp Leu Tyr Asn His Tyr Val Arg Glu Thr Pro
20 25 30
Ile Thr Phe Asp Thr Glu Pro Phe Thr Pro Glu Glu Arg Arg Pro Trp
35 40 45
Leu Leu Ser His Pro Glu Asp Gly Pro Tyr Arg Leu Arg Val Ala Thr
50 55 60
Asp Ala Glu Ser Gln Glu Ile Leu Gly Tyr Ala Thr Ser Ser Pro Tyr
65 70 75 80
Arg Ala Lys Pro Ala Tyr Ala Thr Ser Val Glu Thr Thr Val Tyr Val
85 90 95

6X
78

DAS-136XC1-PCT

Ala Pro Gly Ala Gly Gly Arg Gly Ile Gly Ser Leu Leu Tyr Ala Ser
100 105 110

Leu Phe Asp Ala Leu Ala Ala Glu Asp Leu His Arg Ala Tyr Ala Gly
115 120 125

Ile Ala Gln Pro Asn Glu Ala Ser Ala Arg Leu His Ala Arg Phe Gly
130 135 140

Phe Arg His Val Gly Thr Tyr Arg Glu Val Gly Arg Lys Phe Gly Arg
145 150 155 160

Tyr Trp Asp Val Ala Trp Tyr Glu Arg Pro Leu
165 170

<210> 3
<211> 516
<212> DNA
<213> Streptomyces coelicolor A3

<400> 3
atgcctggaa ctgctgaggt ccaagttcgc cctggagtcg aagaggacct caaaccactc 60
accgatctct acaaccacta cgttcgtgag actccaataa cctttgacac tgagccattc 120
actccagaag agcgtaggcc ttggcttttg agccaccag aagatggccc ttatagggtg 180
agggttgcca ccgatgcaga gtcccaagaa atccttggtc acgccacctc aagcccctac 240
agagccaagc cagcatacgc aacctctgtg gaaacaacag tctatgttgc ccctgggtgct 300
ggtggacgtg gaattgggtc tctcctttat gcctccctct ttgacgccct tgctgccgag 360
gaccttcaca gagcttatgc tggcatcgct cagcccaatg aggcatcagc acgcttgcac 420
gctaggtttg gtttcagaca tgtgggcact taccggaag tggggaggaa gtttggtcgt 480
tactgggatg tggcttggtg tgagagaccc ttgtga 516

<210> 4
<211> 171
<212> PRT
<213> Streptomyces coelicolor A3

<400> 4
Met Pro Gly Thr Ala Glu Val Gln Val Arg Pro Gly Val Glu Glu Asp
1 5 10 15

Leu Lys Pro Leu Thr Asp Leu Tyr Asn His Tyr Val Arg Glu Thr Pro
20 25 30

Ile Thr Phe Asp Thr Glu Pro Phe Thr Pro Glu Glu Arg Arg Pro Trp
35 40 45

Leu Leu Ser His Pro Glu Asp Gly Pro Tyr Arg Leu Arg Val Ala Thr
50 55 60

Asp Ala Glu Ser Gln Glu Ile Leu Gly Tyr Ala Thr Ser Ser Pro Tyr
65 70 75 80

Arg Ala Lys Pro Ala Tyr Ala Thr Ser Val Glu Thr Thr Val Tyr Val
85 90 95

79 48

DAS-136XC1-PCT

Ala Pro Gly Ala Gly Gly Arg Gly Ile Gly Ser Leu Leu Tyr Ala Ser
100 105 110
Leu Phe Asp Ala Leu Ala Ala Glu Asp Leu His Arg Ala Tyr Ala Gly
115 120 125
Ile Ala Gln Pro Asn Glu Ala Ser Ala Arg Leu His Ala Arg Phe Gly
130 135 140
Phe Arg His Val Gly Thr Tyr Arg Glu Val Gly Arg Lys Phe Gly Arg
145 150 155 160
Tyr Trp Asp Val Ala Trp Tyr Glu Arg Pro Leu
165 170

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PTU delantero "Mas 123"

<400> 5
gaacagttag acatggtcta aagg

24

<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> reverse PTU primer "Per5-4"

<400> 6
gctgcaacac tgataaatgc caactgg

27

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

<220>
<223> forward coding region primer

<400> 7
atggctcatg ctgccctcag cc

22

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> reverse coding region primer

<400> 8
cgggcaggcc taactccacc aa

22

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador delantero para la Región Codificadora PCR para DSM-2

80
9

DAS-136XC1-PCT

<400> 9
atgcctggaa ctgctgaggt c

21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

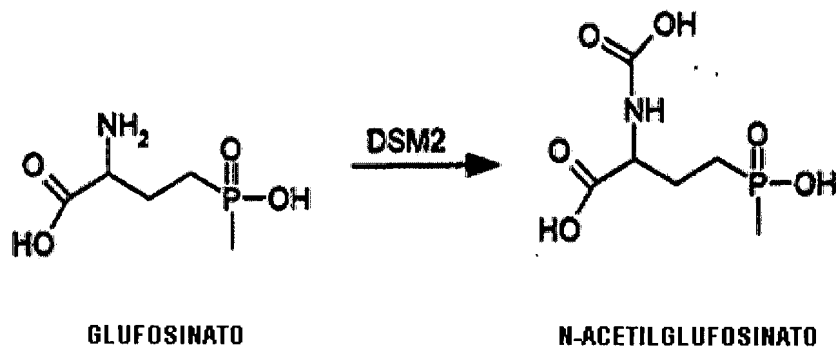
<220>
<223> Cebador trasero para la región codificadora PCR para DSM-2

<400> 10
tgagcgtatgc cagcataagc t

21

81
100

FIG. 1



DGA\DGA\ID-235664\WPC10975

10975 82
6228 107

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

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

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

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER OF ATTORNEY

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

Dow AgroSciences LLC

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

por el presente ratificamos la

presentada por

como agente oficioso ante

en

el

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

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

hereby ratify the

filed without a Power of Attorney by

before

in

on

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

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

A la vuelta →

Over →

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

83
102

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

Given and signed this/Dado y firmado hoy _____

February 6, 1978

In/en Indianapolis, Indiana 46268

United States of America

Kenneth L. Loertscher

Signature

Firma

Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary
& General Patent Counsel





Consulado General de Colombia

500 NORTH MICHIGAN AVENUE, SUITE 2040
CHICAGO, ILLINOIS 60611

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

No. 254

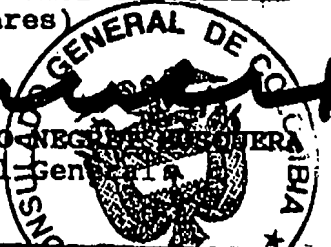
Chicago, FEB 20 1998

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

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

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


CARLOS ALFONSO NEGRETE ROSQUERA
Cónsul General



~~EXTERIORES~~

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1998 MAR 11 11:55

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

ESTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
FUNCIONES INDICADAS

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

87
104

UNITED STATES OF AMERICA
CERTIFICATE OF OFFICE
STATE OF INDIANA

I, Sue Anne Gilroy, Secretary of State of Indiana, DO HEREBY CERTIFY: That,
according to records on file in my office, Lydia S. Owens was duly elected
or appointed to the office of Notary Public in and for Hendricks County
and that the term of said office included the date of February 6, 1998; that to all his/her official acts as said offi-

cial, full faith and credit ought to be given in all Courts of
Justice and elsewhere. In testimony whereof, I have here unto
set my hand and affixed the Great Seal of the State of Indiana,
at Indianapolis, this Tenth day of
February, 1998



Sue Anne Gilroy
Secretary of State
by: Mary Brewer
Deputy
CHICAGO

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

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

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

Notario Público Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

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

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

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:
CERTIFICADO DE CONSTITUCION, FECHADO 1 JULIO 1997
CERTIFICADO DE MODIFICACION, FECHADO 1 OCT. 1997
RESOLUCION JUNTA DIRECTIVA, FECHADO 23 OCT. 1997
CONSENTIMIENTO ESCRITO DE LA JUNTA, 1 JULIO 1997

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Dow AgroSciences LLC
es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de 1 Estado de Delaware, Estados Unidos de América

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

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

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

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

Ciudad INDIANAPOLIS

Estado INDIANA

Hoy 6 de FEB. de 19 98

Notario Público Notary Public

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

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

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

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 6th day of February 19 98
appeared before me
Kenneth L. Loertscher
who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Dow AgroSciences LLC Limited Liability Company, named Dow AgroSciences LLC

I Certify:

1. That I have seen the following documents:
Certificate of formation, dated July 1, 1997
Certificate of amendment, dated October 1, 1997
Board resolution, dated October 23, 1997
Board written consent, dated July 1, 1997

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Dow AgroSciences LLC
Limited Liability
is a Corporation Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of the State of Delaware, United States of America

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

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation limited liability company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary and General Parent Counsel
is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Indianapolis

State Indiana

This 6th day of Feb. 19 98

Lydia S. Owens

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

* Documents must be identified with date and origin.

**CERTIFICACION NOTARIAL
Y AUTENTICACION CONSULAR**

1. Es necesaria la legalización con certificado notarial. El Notario Público debe certificar:

- 1.1. Que la compañía está legalmente constituida y actualmente existente.
- 1.2. Su domicilio.
- 1.3. Que el propósito del poder está incluido en el objeto social de la compañía.
- 1.4. Que el poderdante está autorizado para dar el poder en nombre de la compañía.

2. Los documentos que hay que mostrarle al Notario Público para probar los puntos anteriores, deben estar expresados en el Certificado Notarial con fecha y origen:

- 2.1. Respecto a los puntos 1.1, 1.2 y 1.3 sugerimos referirse a los artículos de constitución con fecha y lugar de otorgamiento; y
- 2.2. Para el punto 1.4 -sugerimos mencionar la resolución de la Junta Directiva o los estatutos, según los cuales la persona que otorga el poder está autorizada para ello.

3. Enseguida el Señor Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

**NOTARIAL CERTIFICATION AND
CONSULAR AUTENTIFICATION**

1. Notarial legalization is necessary. The Notary Public must certify:

- 1.1. That the company is legally constituted and presently existent.
- 1.2. Its place of business.
- 1.3. That the purpose of the Power-of-Attorney is included in the activities of the company.
- 1.4. That the grantor is empowered to give the Power of Attorney in the name of the company he represents.

2. The documents which the Notary Public had before him to prove the above points must be listed by him in the Notarial Certificate with dated and origin:

- 2.1. In connection with points 1.1., 1.2. and 1.3 we suggest referring to the articles of incorporation with date and place of execution.
- 2.2. For point 1.4 we suggest to mention the resolution of the Board of Directors and/or the by-laws whereby the person who grants the Power of Attorney has been authorized to give it.

3. Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

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

88
10x

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

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

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

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

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

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

(Firmado), Lydia S. Owens, Notario Público

(Sello notarial en tinta), LYDIA S. OWENS Notario Público,
Estado de Indiana, Condado de Hendricks Mi comisión expira el
03/05/00

(Sello notarial seco), LYDIA S. OWENS NOTARIO PUBLICO INDIANA

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

ESTADO UNIDOS DE AMERICA

CERTIFICADO DEL CARGO

ESTADO DE INDIANA

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

(Firma facsimilar), Sue Ann Gilroy

Secretario de Estado

(Firmado),

Por: Mary Reeve

Suplente

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

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

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

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

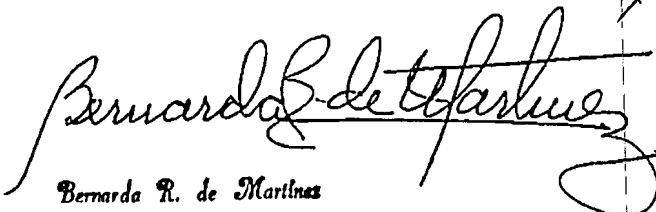
(al dorso), Legalización de la firma que antecede expedida por el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 221220, de fecha 11 de marzo de 1998 y firmada por el Jefe de Legalizaciones.

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

Bogotá, 17 de marzo de 1998

COLO 6641-801-001-3

BRM.137


Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 653 Minjusticia 1994

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

[Signature]

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 17 MAR 1998

[Circular Stamp: REPUBLICA DE COLOMBIA, SANTAFE DE BOGOTA D.C.]

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

98 MAR 18 AMU 156

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

022686

CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESEMPEÑAR
LAS FUNCIONES INDICADAS

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

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

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : DOW AGROSCIENCES LLC

Poder conferido el : 06/02/1998

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
Bogotá, D.C. **22 OCT 2009**
Ante mí AMPARO QUINTERO AZUARO
NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
BOGOTÁ, D.C.
Comparado(aron) **Emilio Ferrero**
Williamson y Luz Clemente
Gómez de Poes
Quien(es) exhibi(eron) la(s) C.C.
CC 438019 TP 31929
CC 35456344 TP 23555
y declará(aron) que la(s) firma(s) que acompaña(n)
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Ferrero
Luz Clemente Gómez de Poes



42
44

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 -/-					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 13 - 0012405	
				Bogotá D.C., Febrero 07 de 2013 - 11:42:40	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	4142	16/01/2013		325.000.00
RECIBO DE CA	999999999	6507	22/01/2013		125.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE			450.000.00	450.000.00
					\$450.000.00
SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: 					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
					
No. 09-070159-00006-0000					
Fecha: 2013-02-08 16:17:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYH Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 523 RESPUESTA Folios: 112					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
					
No. 09-070159-A-00000-0000					
Fecha: 2013-03-01 11:18:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYH Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93					
Código: 10975-841-142-4					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Febrero 7 de 2013 - 11:42:41					

Febrero 8 de 2013 - 11:34:56