

08/53430

JOV
R67

Organización
Digitalización



CSA626303

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

INVENTARIO

SOLICITUD DE

PCT

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

08-53430

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: NUEVOS GENES DE RESISTENCIA A HERBICIDAS

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: A01H 5/00

71. SOLICITANTE: DOW AGROSCIENCES LLC

DOMICILIO: 9330 Zionsville Road, 46268 Indianapolis, IN,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C.,

2. 2008

PETITORIO

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-053430- -00000-0000

Fecha: 2008-05-27 13:50:09 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 428**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

9 Mayo 2008

SOLICITUD DE:

①

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

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: DOW AGROSCIENCES LLC

Dirección: 9330 Zionsville Road,

46268 Indianapolis, IN

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Domicilio: Indianapolis, IN, ESTADOS UNIDOS
DE AMERICALugar de Constitución: ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 610 7420 Fax: 610 0706

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

39'779.654 TPA 70.819

④

INVENTOR (ES) (72)

1 TERRY R. WRIGHT

14162 Charity Chase Circle

Westfield, IN 46074

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

3 TERENCE ANTHONY WALSH

11638 Promontory Trail

Zionsville, IN 46077

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

5 PON SAMUEL JAYAKUMAR

3336 Kilkenny Circle

Carmel, IN 46032

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

2 JUSTIN M. LIRA

12373 Ensley Drive

Fishers, IN 46038

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

4 DONALD J. MERLO

11845 Durbin Drive

Carmel, IN 46032

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

6 GAOFENG LIN

981 Franklin Trace

Zionsville, IN 46077

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2006/042133

Fecha

27/10/2006

Publicación Internacional No.

WO 2007/053482 A2

Fecha

10/05/2007

⑥

Título (54)

NUEVOS GENES DE RESISTENCIA A HERBICIDAS

⑦

Clasificación Internacional (51)

A01H 5/00

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

US

28/10/2005

60/731,044

⑨

Comprobante de pago No.

08-41,612

Fecha

Mayo 23 de 2008

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

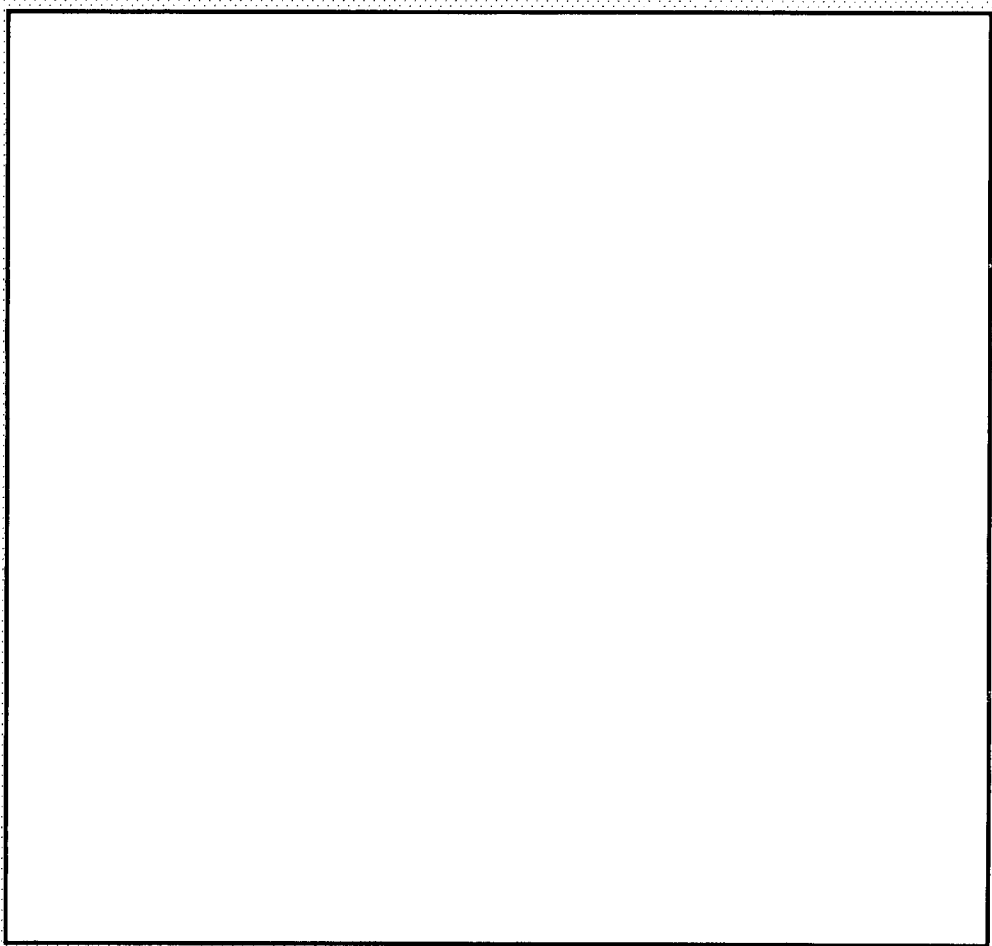
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros Tarjeta de Propietario y Extracto para la publicación

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA: 
C.C. No 39.779.654 Usaqué - TPA 70.819 C.S.J.

27 JUN 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 41,612
FECHA : MAYO 23 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-053430- -00000-0000

Fecha: 2008-05-27 13:50:09 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 428

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTELLANOS Y CO	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	730800	23/05/2008	1,649,200.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 May 2007 (10.05.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/053482 A2

- (51) International Patent Classification:
A01H 5/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/042133

(22) International Filing Date: 27 October 2006 (27.10.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/731,044 28 October 2005 (28.10.2005) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **WRIGHT, Terry, R.** [US/US]; 14162 Charity Chase Circle, Westfield, IN 46074 (US). **LIRA, Justin, M.** [US/US]; 12373 Ensley Drive, Fishers, IN 46038 (US). **WALSH, Terence, Anthony** [US/US]; 11638 Promontory Trail, Zionsville, IN 46077 (US). **MERLO, Donald, J.** [US/US]; 11845 Durbin Drive, Carmel, IN 46032 (US). **JAYAKUMAR, Pon, Samuel** [US/US]; 3336 Kilkenney Circle, Carmel, IN 46032 (US). **LIN, Gaofeng** [US/US]; 981 Franklin Trace, Zionsville, IN 46077 (US).
- (74) Agents: **SANDERS, Jay, M.** et al.; Saliwanchik, Lloyd & Saliwanchik, P.O. Box 142950, Gainesville, FL 32614-2950 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

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

(54) Title: NOVEL HERBICIDE RESISTANCE GENES

(57) Abstract: The subject invention provides novel plants that are not only resistant to 2,4-D, but also to pyridyloxyacetate herbicides. Heretofore, there was no expectation or suggestion that a plant with both of these advantageous properties could be produced by the introduction of a single gene. The subject invention also includes plants that produce one or more enzymes of the subject invention "stacked" together with one or more other herbicide resistance genes. The subject invention enables novel combinations of herbicides to be used in new ways. Furthermore, the subject invention provides novel methods of preventing the development of, and controlling, strains of weeds that are resistant to one or more herbicides such as glyphosate. The preferred enzyme and gene for use according to the subject invention are referred to herein as *AAD-12* (AryloxyAlkanoate Dioxygenase). This highly novel discovery is the basis of significant herbicide tolerant crop trait and selectable marker opportunities.



WO 2007/053482 A2

NOVEL HERBICIDE RESISTANCE GENESBackground of the Invention

[0001] Weeds can quickly deplete soil of valuable nutrients needed by crops and other desirable plants. There are many different types of herbicides presently used for the control of weeds. One extremely popular herbicide is glyphosate.

[0002] Crops, such as corn, soybeans, canola, cotton, sugar beets, wheat, turf, and rice, have been developed that are resistant to glyphosate. Thus, fields with actively growing glyphosate resistant soybeans, for example, can be sprayed to control weeds without significantly damaging the soybean plants.

[0003] With the introduction of genetically engineered, glyphosate tolerant crops (GTCs) in the mid-1990's, growers were enabled with a simple, convenient, flexible, and inexpensive tool for controlling a wide spectrum of broadleaf and grass weeds unparalleled in agriculture. Consequently, producers were quick to adopt GTCs and in many instances abandon many of the accepted best agronomic practices such as crop rotation, herbicide mode of action rotation, tank mixing, incorporation of mechanical with chemical and cultural weed control. Currently glyphosate tolerant soybean, cotton, corn, and canola are commercially available in the United States and elsewhere in the Western Hemisphere. Alfalfa was the first perennial GTC introduced, furthering the opportunity for repeated use of glyphosate on the same crop and fields repeatedly over a period of years. More GTCs (*e.g.*, wheat, rice, sugar beets, turf, *etc.*) are poised for introduction pending global market acceptance. Many other glyphosate resistant species are in experimental to development stages (*e.g.*, sugar cane, sunflower, beets, peas, carrot, cucumber, lettuce, onion, strawberry, tomato, and tobacco; forestry species like poplar and sweetgum; and horticultural species like marigold, petunia, and begonias; *see* "isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005" website). Additionally, the cost of glyphosate has dropped dramatically in recent years to the point that few conventional weed control programs can effectively compete on price and performance with glyphosate GTC systems.

[0004] Glyphosate has been used successfully in burndown and other non-crop areas for total vegetation control for more than 15 years. In many instances, as with GTCs, glyphosate has been used 1-3 times per year for 3, 5, 10, up to 15 years in a row. These circumstances have led to an over-reliance on glyphosate and GTC technology and have placed a heavy selection

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

[0005]

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

[0006]

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

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

[0007] 2,4-D is in the phenoxy acid class of herbicides, as is MCPA. 2,4-D has been used in many monocot crops (such as corn, wheat, and rice) for the selective control of broadleaf weeds without severely damaging the desired crop plants. 2,4-D is a synthetic auxin derivative that acts to deregulate normal cell-hormone homeostasis and impede balanced, controlled growth; however, the exact mode of action is still not known. Triclopyr and fluroxypyr are pyridyloxyacetic acid herbicides whose mode of action is as a synthetic auxin, also.

[0008] These herbicides have different levels of selectivity on certain plants (e.g., dicots are more sensitive than grasses). Differential metabolism by different plants is one explanation for varying levels of selectivity. In general, plants metabolize 2,4-D slowly, so varying plant response to 2,4-D may be more likely explained by different activity at the target site(s) (WSSA, 2002). Plant metabolism of 2,4-D typically occurs via a two-phase mechanism, typically hydroxylation followed by conjugation with amino acids or glucose (WSSA, 2002).

[0009] Over time, microbial populations have developed an alternative and efficient pathway for degradation of this particular xenobiotic, which results in the complete mineralization of 2,4-D. Successive applications of the herbicide select for microbes that can utilize the herbicide as a carbon source for growth, giving them a competitive advantage in the soil. For this reason, 2,4-D currently formulated has a relatively short soil half-life, and no significant carryover effects to subsequent crops are encountered. This adds to the herbicidal utility of 2,4-D.

[0010] One organism that has been extensively researched for its ability to degrade 2,4-D is *Ralstonia eutropha* (Streber *et al.*, 1987). The gene that codes for the first enzymatic step in the mineralization pathway is *tfdA*. See U.S. Patent No. 6,153,401 and GENBANK Acc. No. M16730. *TfdA* catalyzes the conversion of 2,4-D acid to dichlorophenol (DCP) via an α -ketoglutarate-dependent dioxygenase reaction (Smejkal *et al.*, 2001). DCP has little herbicidal activity compared to 2,4-D. *TfdA* has been used in transgenic plants to impart 2,4-D resistance in dicot plants (e.g., cotton and tobacco) normally sensitive to 2,4-D (Streber *et al.* (1989), Lyon *et al.* (1989), Lyon (1993), and U.S. Patent No. 5,608,147).

[0011] A large number of *tfdA*-type genes that encode proteins capable of degrading 2,4-D have been identified from the environment and deposited into the Genbank database. Many

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

[0012] One unique example with low homology to *tfdA* (31% amino acid identity) is *sdpA* from *Delftia acidovorans* (Kohler *et al.*, 1999, Westendorf *et al.*, 2002, Westendorf *et al.*, 2003). This enzyme has been shown to catalyze the first step in (S)-dichlorprop (and other (S)-phenoxypropionic acids) as well as 2,4-D (a phenoxyacetic acid) mineralization (Westendorf *et al.*, 2003). Transformation of this gene into plants, has not heretofore been reported.

[0013] Development of new herbicide-tolerant crop (HTC) technologies has been limited in success due largely to the efficacy, low cost, and convenience of GTCs. Consequently, a very high rate of adoption for GTCs has occurred among producers. This created little incentive for developing new HTC technologies.

[0014] Aryloxyalkanoate chemical substructures are a common entity of many commercialized herbicides including the phenoxyacetate auxins (such as 2,4-D and dichlorprop), pyridyloxyacetate auxins (such as fluroxypyr and triclopyr), aryloxyphenoxypropionates (AOPP) acetyl-coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibitors (such as haloxyfop, quizalofop, and diclofop), and 5-substituted phenoxyacetate protoporphyrinogen oxidase IX inhibitors (such as pyraflufen and flumiclorac). However, these classes of herbicides are all quite distinct, and no evidence exists in the current literature for common degradation pathways among these chemical classes. A multifunctional enzyme for the degradation of herbicides covering multiple modes of action has recently been described (PCT US/2005/014737; filed May 2, 2005). Another unique multifunctional enzyme and potential uses are described hereafter.

Brief Summary of the Invention

[0015] The subject invention provides novel plants that are not only resistant to 2,4-D, but also to pyridyloxyacetate herbicides. Heretofore, there was no expectation or suggestion that a plant with both of these advantageous properties could be produced by the introduction of a single gene. The subject invention also includes plants that produce one or more enzymes of

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

[0016] In some embodiments, the invention provides monocot and dicot plants tolerant to 2,4-D, MCPA, triclopyr, fluroxypyr, and one or more commercially available herbicides (e.g., glyphosate, glufosinate, paraquat, ALS-inhibitors (e.g., sulfonyleureas, imidazolinones, triazolopyrimidine sulfonanilides, et al), HPPD inhibitors (e.g., mesotrione, isoxaflutole, *et al.*), dicamba, bromoxynil, aryloxyphenoxypropionates, and others). Vectors comprising nucleic acid sequences responsible for such herbicide tolerance are also disclosed, as are methods of using such tolerant plants and combinations of herbicides for weed control and prevention of weed population shifts. The subject invention enables novel combinations of herbicides to be used in new ways. Furthermore, the subject invention provides novel methods of preventing the development of, and controlling, strains of weeds that are resistant to one or more herbicides such as glyphosate. The subject invention enables novel uses of novel combinations of herbicides and crops, including preplant application to an area to be planted immediately prior to planting with seed for plants that would otherwise be sensitive to that herbicide (such as 2,4-D).

[0017] The subject invention relates in part to the identification of an enzyme that is not only able to degrade 2,4-D, but also surprisingly possesses novel properties, which distinguish the enzyme of the subject invention from previously known *tfdA* proteins, for example. More specifically, the subject invention relates to the use of an enzyme that is capable of degrading both 2,4-D and pyridyloxyacetate herbicides. No α -ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme has previously been reported to have the ability to degrade herbicides of both the phenoxyacetate and pyridyloxyacetates auxin herbicides. The preferred enzyme and gene for use according to the subject invention are referred to herein as *AAD-12* (AryloxyAlkanooate Dioxygenase). This highly novel discovery is the basis of significant herbicide-tolerant crop (HTC) trait and selectable marker opportunities. Plants of the subject invention can be resistant throughout their entire life cycle.

[0018] There was no prior motivation to produce plants comprising an *AAD-12* gene (preferably an *AAD-12* polynucleotide that has a sequence optimized for expression in one or more types of plants, as exemplified herein), and there was no expectation that such plants could effectively produce an AAD-12 enzyme to render the plants resistant a phenoxyacetic acid herbicide (such as 2,4-D) and/or one or more pyridyloxyacetates herbicides such as triclopyr and fluroxypyr. Thus, the subject invention provides many advantages that were not heretofore thought to be possible in the art.

[0019] This invention also relates in part to the identification and use of genes encoding aryloxyalkanoate dioxygenase enzymes that are capable of degrading phenoxyacetate auxin and/or pyridyloxyacetates auxin herbicides. Methods of screening proteins for these activities are within the scope of the subject invention. Thus, the subject invention includes degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other aryloxyalkanoate auxin herbicides by a recombinantly expressed AAD-12 enzyme. The subject invention also includes methods of controlling weeds wherein said methods comprise applying one or more pyridyloxyacetate or phenoxyacetate auxin herbicides to plants comprising an *AAD-12* gene. The subject invention also provides methods of using an *AAD-12* gene as a selectable marker for identifying plant cells and whole plants transformed with *AAD-12*, optionally including one, two, or more exogenous genes simultaneously inserted into target plant cells. Methods of the subject invention include selecting transformed cells that are resistant to appropriate levels of an herbicide. The subject invention further includes methods of preparing a polypeptide, having the biological activity of aryloxyalkanoate dioxygenase, by culturing plants and/or cells of the subject invention.

Brief Description of the Figures

[0020] **Figure 1** illustrates the general chemical reaction that is catalyzed by AAD-12 enzymes of the subject invention.

[0021] **Figure 2** is an amino acid sequence alignment of an exemplified AAD-12 protein, TfdA, AAD-2, AAD-1, and TauD.

[0022] **Figure 3** illustrates activity of AAD-12 (v2) on 2,4-D and enantiomers of dichlorprop.

Brief Description of the Sequences

[0023] **SEQ ID NO:1** is the nucleotide sequence of *AAD-12* from *Delftia acidovorans*.

- [0024] SEQ ID NO:2 is the translated protein sequence encoded by SEQ ID NO:1.
- [0025] SEQ ID NO:3 is the plant optimized nucleotide sequence of *AAD-12* (v1).
- [0026] SEQ ID NO:4 is the translated protein sequence encoded by SEQ ID NO:3.
- [0027] SEQ ID NO:5 is the E.coli optimized nucleotide sequence of *AAD-12* (v2).
- [0028] SEQ ID NO:6 is the sequence of the M13 forward primer.
- [0029] SEQ ID NO:7 is the sequence of the M13 reverse primer.
- [0030] SEQ ID NO:8 is the sequence of the forward *AAD-12* (v1) PTU primer.
- [0031] SEQ ID NO:9 is the sequence of the reverse *AAD-12* (v1) PTU primer.
- [0032] SEQ ID NO:10 is the sequence of the forward *AAD-12* (v1) coding PCR primer.
- [0033] SEQ ID NO:11 is the sequence of the reverse *AAD-12* (v1) coding PCR primer.
- [0034] SEQ ID NO:12 shows the sequence of the "sdpacodF" *AAD-12* (v1) primer.
- [0035] SEQ ID NO:13 shows the sequence of the "sdpacodR" *AAD-12* (v1) primer.
- [0036] SEQ ID NO:14 shows the sequence of the "Nco1 of Brady" primer.
- [0037] SEQ ID NO:15 shows the sequence of the "Sac1 of Brady" primer.

Detailed Description of the Invention

[0038] The subject development of a 2,4-D resistance gene and subsequent resistant crops provides excellent options for controlling broadleaf, glyphosate-resistant (or highly tolerant and shifted) weed species for in-crop applications. 2,4-D is a broad-spectrum, relatively inexpensive, and robust broadleaf herbicide that would provide excellent utility for growers if greater crop tolerance could be provided in dicot and monocot crops alike. 2,4-D-tolerant transgenic dicot crops would also have greater flexibility in the timing and rate of application. An additional utility of the subject herbicide tolerance trait for 2,4-D is its utility to prevent damage to normally sensitive crops from 2,4-D drift, volatilization, inversion (or other off-site movement phenomenon), misapplication, vandalism, and the like. An additional benefit of the *AAD-12* gene is that unlike all *tfdA* homologues characterized to date, *AAD-12* is able to degrade the pyridyloxyacetates auxins (e.g., triclopyr, fluroxypyr) in addition to achiral phenoxy auxins (e.g., 2,4-D, MCPA, 4-chlorophenoxyacetic acid). See Table 1. A general illustration of the chemical reactions catalyzed by the subject *AAD-12* enzyme is shown in Figure 1. (Addition of O₂ is stereospecific; breakdown of intermediate to phenol and glyoxylate is spontaneous.) It should be understood that the chemical structures in Figure 1 illustrate the molecular backbones and that various R groups and the like (such as those

shown in Table 1) are included but are not necessarily specifically illustrated in Figure 1. Multiple mixes of different phenoxy auxin combinations have been used globally to address specific weed spectra and environmental conditions in various regions. Use of the *AAD-12* gene in plants affords protection to a much wider spectrum of auxin herbicides, thereby increasing the flexibility and spectra of weeds that can be controlled. The subject invention can also be used to protect from drift or other off-site synthetic auxin herbicide injury for the full breadth of commercially available phenoxy auxins. **Table 1** defines commercially available pyridyloxy and phenoxy auxins and provides relevant chemical structures.

Table 1. Commercially available phenoxyacetate and pyridyloxyacetate auxins. Reference to phenoxy auxin and pyridyloxy auxin herbicides is generally made to the active acid but some are commercially formulated as any of a variety of corresponding ester formulations and these are likewise considered as substrates for AAD-12 enzyme *in planta* as general plant esterases convert these esters to the active acids *in planta*. Likewise reference can also be for the corresponding organic or inorganic salt of the corresponding acid. Possible use rate ranges can be as stand-alone treatments or in combination with other herbicides in both crop and non-crop uses.

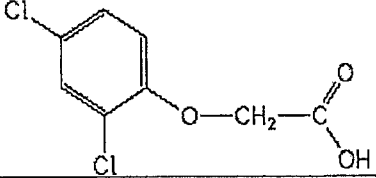
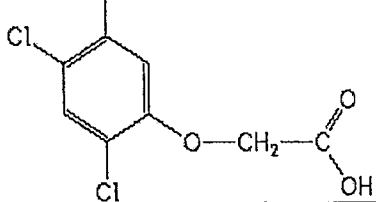
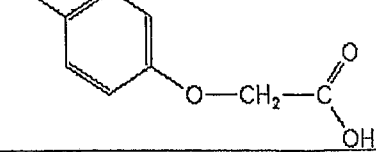
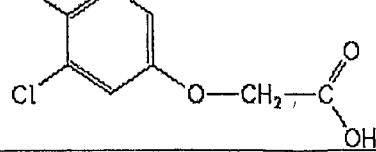
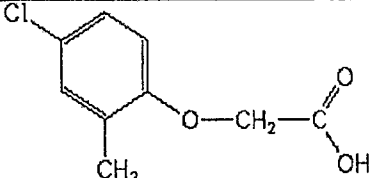
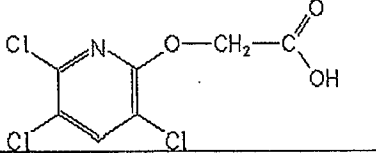
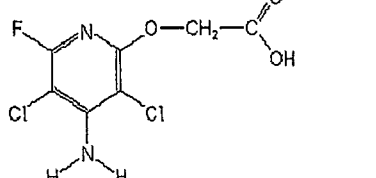
Chemical name	CAS no	Possible use rate ranges (g ae/ha)	Preferred use rate ranges (g ae/ha)	Structure
2,4-D	94-75-7	25 – 4000	280 - 1120	
2,4,5-T	93-76-5	25 – 4000	25 – 4000	
4-CPA	122-88-3	25 – 4000	25 – 4000	
3,4-DA	588-22-7	25 – 4000	25 – 4000	

Table 1. Commercially available phenoxyacetate and pyridyloxyacetate auxins. Reference to phenoxy auxin and pyridyloxy auxin herbicides is generally made to the active acid but some are commercially formulated as any of a variety of corresponding ester formulations and these are likewise considered as substrates for AAD-12 enzyme <i>in planta</i> as general plant esterases convert these esters to the active acids <i>in planta</i> . Likewise reference can also be for the corresponding organic or inorganic salt of the corresponding acid. Possible use rate ranges can be as stand-alone treatments or in combination with other herbicides in both crop and non-crop uses.				
Chemical name	CAS no	Possible use rate ranges (g ae/ha)	Preferred use rate ranges (g ae/ha)	Structure
MCPA	94-74-6	25 – 4000	125 - 1550	
Triclopyr	55335-06-3	50 – 2000	70 – 840	
Fluroxypyr	69377-81-7	25 – 2000	35 – 560	

[0039] A single gene (*AAD-12*) has now been identified which, when genetically engineered for expression in plants, has the properties to allow the use of phenoxy auxin herbicides in plants where inherent tolerance never existed or was not sufficiently high to allow use of these herbicides. Additionally, *AAD-12* can provide protection *in planta* to pyridyloxyacetate herbicides where natural tolerance also was not sufficient to allow selectivity, expanding the potential utility of these herbicides. Plants containing *AAD-12* alone now may be treated sequentially or tank mixed with one, two, or a combination of several phenoxy auxin herbicides. The rate for each phenoxy auxin herbicide may range from 25 to 4000 g ae/ha, and more typically from 100 to 2000 g ae/ha for the control of a broad spectrum of dicot weeds. Likewise, one, two, or a mixture of several pyridyloxyacetate auxin compounds may be applied to plants expressing *AAD-12* with reduced risk of injury from said herbicides. The rate for each pyridyloxyacetate herbicide may range from 25 to 2000 g ae/ha, and more typically from 35-840 g ae/ha for the control of additional dicot weeds.

[0040]

Glyphosate is used extensively because it controls a very wide spectrum of broadleaf and grass weed species. However, repeated use of glyphosate in GTCs and in non-crop applications has, and will continue to, select for weed shifts to naturally more tolerant species or glyphosate-resistant biotypes. Tankmix herbicide partners used at efficacious rates that offer control of the same species but having different modes of action is prescribed by most herbicide resistance management strategies as a method to delay the appearance of resistant weeds. Stacking *AAD-12* with a glyphosate tolerance trait (and/or with other herbicide-tolerance traits) could provide a mechanism to allow for the control of glyphosate resistant dicot weed species in GTCs by enabling the use of glyphosate, phenoxy auxin(s) (e.g., 2,4-D) and pyridyloxyacetates auxin herbicides (e.g., triclopyr)—selectively in the same crop. Applications of these herbicides could be simultaneously in a tank mixture comprising two or more herbicides of different modes of action; individual applications of single herbicide composition in sequential applications as pre-plant, preemergence, or postemergence and split timing of applications ranging from approximately 2 hours to approximately 3 months; or, alternatively, any combination of any number of herbicides representing each chemical class can be applied at any timing within about 7 months of planting the crop up to harvest of the crop (or the preharvest interval for the individual herbicide, whichever is shortest).

[0041]

It is important to have flexibility in controlling a broad spectrum of grass and broadleaf weeds in terms of timing of application, rate of individual herbicides, and the ability to control difficult or resistant weeds. Glyphosate applications in a crop with a glyphosate resistance gene/*AAD-12* stack could range from about 250-2500 g ae/ha; phenoxy auxin herbicide(s) (one or more) could be applied from about 25-4000 g ae/ha; and pyridyloxyacetates auxin herbicide(s) (one or more) could be applied from 25-2000 g ae/ha. The optimal combination(s) and timing of these application(s) will depend on the particular situation, species, and environment, and will be best determined by a person skilled in the art of weed control and having the benefit of the subject disclosure.

[0042]

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

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

[0043] Herbicide formulations (*e.g.*, ester, acid, or salt formulation; or soluble concentrate, emulsifiable concentrate, or soluble liquid) and tankmix additives (*e.g.*, adjuvants, surfactants, drift retardants, or compatibility agents) can significantly affect weed control from a given herbicide or combination of one or more herbicides. Any combination of these with any of the aforementioned herbicide chemistries is within the scope of this invention.

[0044] One skilled in the art would also see the benefit of combining two or more modes of action for increasing the spectrum of weeds controlled and/or for the control of naturally more tolerant or resistant weed species. This could also extend to chemistries for which herbicide tolerance was enabled in crops through human involvement (either transgenically or non-transgenically) beyond GTCs. Indeed, traits encoding glyphosate resistance (*e.g.*, resistant plant or bacterial *EPSPS*, glyphosate oxidoreductase (*GOX*), *GAT*), glufosinate resistance (*e.g.*, *Pat*, *bar*), acetolactate synthase (*ALS*)-inhibiting herbicide resistance (*e.g.*, imidazolinone, sulfonylurea, triazolopyrimidine sulfonanilide, pyrimidinylthiobenzoates, and other chemistries = *AHAS*, *Csr1*, *SurA*, *et al.*), bromoxynil resistance (*e.g.*, *Bxn*), resistance to inhibitors of HPPD (4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase) enzyme, resistance to inhibitors of phytoene desaturase (*PDS*), resistance to photosystem II inhibiting herbicides (*e.g.*, *psbA*), resistance to photosystem I inhibiting herbicides, resistance to protoporphyrinogen oxidase IX (*PPO*)-inhibiting herbicides (*e.g.*, *PPO-1*), resistance to phenylurea herbicides (*e.g.*, *CYP76B1*), dicamba-degrading enzymes (*see, e.g.*, US 20030135879), and others could be stacked alone or in multiple combinations to provide the ability to effectively control or prevent weed shifts and/or resistance to any herbicide of the aforementioned classes. *In vivo* modified *EPSPS* can be used in some preferred embodiments, as well as Class I, Class II, and Class III glyphosate resistance genes.

[0045] Regarding additional herbicides, some additional preferred *ALS* inhibitors include but are not limited to the sulfonylureas (such as chlorsulfuron, halosulfuron, nicosulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, trifloxysulfuron), imidazolinones (such as imazamox, imazethapyr, imazaquin), triazolopyrimidine sulfonanilides (such as cloransulam-methyl, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, and penoxsulam),

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

[0046] Additionally, *AAD-12* alone or stacked with one or more additional HTC traits can be stacked with one or more additional input (*e.g.*, insect resistance, fungal resistance, or stress tolerance, *et al.*) or output (*e.g.*, increased yield, improved oil profile, improved fiber quality, *et al.*) traits. Thus, the subject invention can be used to provide a complete agronomic package of improved crop quality with the ability to flexibly and cost effectively control any number of agronomic pests.

[0047] The subject invention relates in part to the identification of an enzyme that is not only able to degrade 2,4-D, but also surprisingly possesses novel properties, which distinguish the enzyme of the subject invention from previously known *tfdA* proteins, for example. Even though this enzyme has very low homology to *tfdA*, the genes of the subject invention can still be generally classified in the same overall family of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. This family of proteins is characterized by three conserved histidine residues in a "HX(D/E)X₂₃₋₂₆(T/S)X₁₁₄₋₁₈₃HX₁₀₋₁₃R" motif which comprises the active site. The histidines coordinate Fe⁺² ion in the active site that is essential for catalytic activity (Hogan *et al.*, 2000). The preliminary *in vitro* expression experiments discussed herein were tailored to help select for novel attributes. These experiments also indicate the AAD-12 enzyme is unique from another disparate enzyme of the same class, disclosed in a previously filed patent application (PCT US/2005/014737; filed May 2, 2005). The AAD-1 enzyme of that application shares only about 25% sequence identity with the subject AAD-12 protein.

[0048] More specifically, the subject invention relates in part to the use of an enzyme that is not only capable of degrading 2,4-D, but also pyridyloxyacetate herbicides. No α -ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme has previously been reported to have the ability to degrade herbicides of different chemical classes and modes of action. Preferred enzymes and genes for use according to the subject invention are referred to herein as AAD-12 (AryloxyAlkanoate Dioxygenase) genes and proteins.

[0049] This invention also relates in part to the identification and use of genes encoding aryloxyalkanoate dioxygenase enzymes that are capable of degrading phenoxy auxin and

pyridyloxyacetate herbicides. Thus, the subject invention relates in part to the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, other phenoxyacetic acids, and pyridyloxyacetic acid herbicides by a recombinantly expressed AAD-12 enzyme.

[0050] The subject proteins tested positive for 2,4-D conversion to 2,4-dichlorophenol ("DCP"; herbicidally inactive) in analytical assays. Partially purified proteins of the subject invention can rapidly convert 2,4-D to DCP *in vitro*. An additional advantage that AAD-12 transformed plants provide is that parent herbicide(s) are metabolized to inactive forms, thereby reducing the potential for harvesting herbicidal residues in grain or stover.

[0051] The subject invention also includes methods of controlling weeds wherein said methods comprise applying a pyridyloxyacetate and/or a phenoxy auxin herbicide to plants comprising an AAD-12 gene.

[0052] In light of these discoveries, novel plants that comprise a polynucleotide encoding this type of enzyme are now provided. Heretofore, there was no motivation to produce such plants, and there was no expectation that such plants could effectively produce this enzyme to render the plants resistant to not only phenoxy acid herbicides (such as 2,4-D) but also pyridyloxyacetate herbicides. Thus, the subject invention provides many advantages that were not heretofore thought to be possible in the art.

[0053] Publicly available strains (deposited in culture collections like ATCC or DSMZ) can be acquired and screened, using techniques disclosed herein, for novel genes. Sequences disclosed herein can be used to amplify and clone the homologous genes into a recombinant expression system for further screening and testing according to the subject invention.

[0054] As discussed above in the Background section, one organism that has been extensively researched for its ability to degrade 2,4-D is *Ralstonia eutropha* (Streber *et al.*, 1987). The gene that codes for the first enzyme in the degradation pathway is *tfda*. See U.S. Patent No. 6,153,401 and GENBANK Acc. No. M16730. *Tfda* catalyzes the conversion of 2,4-D acid to herbicidally inactive DCP via an α -ketoglutarate-dependent dioxygenase reaction (Smejkal *et al.*, 2001). *Tfda* has been used in transgenic plants to impart 2,4-D resistance in dicot plants (*e.g.*, cotton and tobacco) normally sensitive to 2,4-D (Streber *et al.*, 1989; Lyon *et al.*, 1989; Lyon *et al.*, 1993). A large number of *tfda*-type genes that encode proteins capable of degrading 2,4-D have been identified from the environment and deposited into the Genbank database. Many homologues are quite similar to *tfda* (>85% amino acid identity) and have similar enzymatic properties to *tfda*. However, a small collection of α -

ketoglutarate-dependent dioxygenase homologues are presently identified that have a low level of homology to *tfdA*.

[0055] The subject invention relates in part to surprising discoveries of new uses for and functions of a distantly related enzyme, *sdpA*, from *Delftia acidivorans* (Westendorf *et al.*, 2002, 2003) with low homology to *tfdA* (31% amino acid identity). This α -ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme purified in its native form had previously been shown to degrade 2,4-D and S-dichlorprop (Westendorf *et al.*, 2002 and 2003). However, no α -ketoglutarate-dependent dioxygenase enzyme has previously been reported to have the ability to degrade herbicides of pyridyloxyacetate chemical class. *SdpA* has never been expressed in plants, nor was there any motivation to do so in part because development of new HTC technologies has been limited due largely to the efficacy, low cost, and convenience of GTCs (Devine, 2005).

[0056] In light of the novel activity, proteins and genes of the subject invention are referred to herein as AAD-12 proteins and genes. AAD-12 was presently confirmed to degrade a variety of phenoxyacetate auxin herbicides *in vitro*. However, this enzyme, as reported for the first time herein, was surprisingly found to also be capable of degrading additional substrates of the class of aryloxyalkanoate molecules. Substrates of significant agronomic importance include the pyridyloxyacetate auxin herbicides. This highly novel discovery is the basis of significant Herbicide Tolerant Crop (HTC) and selectable marker trait opportunities. This enzyme is unique in its ability to deliver herbicide degradative activity to a range of broad spectrum broadleaf herbicides (phenoxyacetate and pyridyloxyacetate auxins).

[0057] Thus, the subject invention relates in part to the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, other phenoxyacetic auxin herbicides, and pyridyloxyacetate herbicides by a recombinantly expressed aryloxyalkanoate dioxygenase enzyme (AAD-12). This invention also relates in part to identification and uses of genes encoding an aryloxyalkanoate dioxygenase degrading enzyme (AAD-12) capable of degrading phenoxy and/or pyridyloxy auxin herbicides.

[0058] The subject enzyme enables transgenic expression resulting in tolerance to combinations of herbicides that would control nearly all broadleaf weeds. *AAD-12* can serve as an excellent herbicide tolerant crop (HTC) trait to stack with other HTC traits [*e.g.*, glyphosate resistance, glufosinate resistance, ALS-inhibitor (*e.g.*, imidazolinone, sulfonylurea, triazolopyrimidine sulfonanilide) resistance, bromoxynil resistance, HPPD-

inhibitor resistance, PPO-inhibitor resistance, *et al.*], and insect resistance traits (*CryIF*, *CryIAb*, *Cry 34/45*, other Bt. Proteins, or insecticidal proteins of a non-*Bacillus* origin, *et al.*) for example. Additionally, *AAD-12* can serve as a selectable marker to aid in selection of primary transformants of plants genetically engineered with a second gene or group of genes.

[0059] In addition, the subject microbial gene has been redesigned such that the protein is encoded by codons having a bias toward both monocot and dicot plant usage (hemicot). *Arabidopsis*, corn, tobacco, cotton, soybean, canola, and rice have been transformed with *AAD-12*-containing constructs and have demonstrated high levels of resistance to both the phenoxy and pyridyloxy auxin herbicides. Thus, the subject invention also relates to "plant optimized" genes that encode proteins of the subject invention.

[0060] Oxyalkanoate groups are useful for introducing a stable acid functionality into herbicides. The acidic group can impart phloem mobility by "acid trapping," a desirable attribute for herbicide action and therefore could be incorporated into new herbicides for mobility purposes. Aspects of the subject invention also provide a mechanism of creating HTC. There exist many potential commercial and experimental herbicides that can serve as substrates for *AAD-12*. Thus, the use of the subject genes can also result in herbicide tolerance to those other herbicides as well.

[0061] HTC traits of the subject invention can be used in novel combinations with other HTC traits (including but not limited to glyphosate tolerance). These combinations of traits give rise to novel methods of controlling weed (and like) species, due to the newly acquired resistance or inherent tolerance to herbicides (*e.g.*, glyphosate). Thus, in addition to the HTC traits, novel methods for controlling weeds using herbicides, for which herbicide tolerance was created by said enzyme in transgenic crops, are within the scope of the invention.

[0062] This invention can be applied in the context of commercializing a 2,4-D resistance trait stacked with current glyphosate resistance traits in soybeans, for example. Thus, this invention provides a tool to combat broadleaf weed species shifts and/or selection of herbicide resistant broadleaf weeds, which culminates from extremely high reliance by growers on glyphosate for weed control with various crops.

[0063] The transgenic expression of the subject *AAD-12* genes is exemplified in, for example, *Arabidopsis*, tobacco, soybean, cotton, rice, corn and canola. Soybeans are a preferred crop for transformation according to the subject invention. However, this invention can be utilized in multiple other monocot (such as pasture grasses or turf grass) and dicot

crops like alfalfa, clover, tree species, *et al.* Likewise, 2,4-D (or other AAD-12-substrates) can be more positively utilized in grass crops where tolerance is moderate, and increased tolerance via this trait would provide growers the opportunity to use these herbicides at more efficacious rates and over a wider application timing without the risk of crop injury.

[0064] Still further, the subject invention provides a single gene that can provide resistance to herbicides that control broadleaf weed. This gene may be utilized in multiple crops to enable the use of a broad spectrum herbicide combination. The subject invention can also control weeds resistant to current chemicals, and aids in the control of shifting weed spectra resulting from current agronomic practices. The subject AAD-12 can also be used in efforts to effectively detoxify additional herbicide substrates to non-herbicidal forms. Thus, the subject invention provides for the development of additional HTC traits and/or selectable marker technology.

[0065] Separate from, or in addition to, using the subject genes to produce HTCs, the subject genes can also be used as selectable markers for successfully selecting transformants in cell cultures, greenhouses, and in the field. There is high inherent value for the subject genes simply as a selectable marker for biotechnology projects. The promiscuity of AAD-12 for other aryloxyalkanoate auxinic herbicides provides many opportunities to utilize this gene for HTC and/or selectable marker purposes.

[0066] Proteins (and source isolates) of the subject invention. The present invention provides functional proteins. By "functional activity" (or "active") it is meant herein that the proteins/enzymes for use according to the subject invention have the ability to degrade or diminish the activity of a herbicide (alone or in combination with other proteins). Plants producing proteins of the subject invention will preferably produce "an effective amount" of the protein so that when the plant is treated with a herbicide, the level of protein expression is sufficient to render the plant completely or partially resistant or tolerant to the herbicide (at a typical rate, unless otherwise specified; typical application rates can be found in the well-known *Herbicide Handbook* (Weed Science Society of America, Eighth Edition, 2002), for example). The herbicide can be applied at rates that would normally kill the target plant, at normal field use rates and concentrations. (Because of the subject invention, the level and/or concentration can optionally be higher than those that were previously used.) Preferably, plant cells and plants of the subject invention are protected against growth inhibition or injury caused by herbicide treatment. Transformed plants and plant cells of the subject invention

are preferably rendered resistant or tolerant to an herbicide, as discussed herein, meaning that the transformed plant and plant cells can grow in the presence of effective amounts of one or more herbicides as discussed herein. Preferred proteins of the subject invention have catalytic activity to metabolize one or more aryloxyalkanoate compounds.

[0067] One cannot easily discuss the term "resistance" and not use the verb "tolerate" or the adjective "tolerant." The industry has spent innumerable hours debating Herbicide Tolerant Crops (HTC) versus Herbicide Resistant Crops (HRC). HTC is a preferred term in the industry. However, the official Weed Science Society of America definition of resistance is "the inherited ability of a plant to survive and reproduce following exposure to a dose of herbicide normally lethal to the wild type. In a plant, resistance may be naturally occurring or induced by such techniques as genetic engineering or selection of variants produced by tissue culture or mutagenesis." As used herein unless otherwise indicated, herbicide "resistance" is heritable and allows a plant to grow and reproduce in the presence of a typical herbicidally effective treatment by a herbicide for a given plant, as suggested by the current edition of *The Herbicide Handbook* as of the filing of the subject disclosure. As is recognized by those skilled in the art, a plant may still be considered "resistant" even though some degree of plant injury from herbicidal exposure is apparent. As used herein, the term "tolerance" is broader than the term "resistance," and includes "resistance" as defined herein, as well an improved capacity of a particular plant to withstand the various degrees of herbicidally induced injury that typically result in wild-type plants of the same genotype at the same herbicidal dose.

[0068] Transfer of the functional activity to plant or bacterial systems can involve a nucleic acid sequence, encoding the amino acid sequence for a protein of the subject invention, integrated into a protein expression vector appropriate to the host in which the vector will reside. One way to obtain a nucleic acid sequence encoding a protein with functional activity is to isolate the native genetic material from the bacterial species which produce the protein of interest, using information deduced from the protein's amino acid sequence, as disclosed herein. The native sequences can be optimized for expression in plants, for example, as discussed in more detail below. An optimized polynucleotide can also be designed based on the protein sequence.

[0069] The subject invention provides classes of proteins having novel activities as identified herein. One way to characterize these classes of proteins and the polynucleotides that encode them is by defining a polynucleotide by its ability to hybridize, under a range of specified conditions, with an exemplified nucleotide sequence (the complement thereof and/or a probe or probes derived from either strand) and/or by their ability to be amplified by PCR using primers derived from the exemplified sequences.

[0070] There are a number of methods for obtaining proteins for use according to the subject invention. For example, antibodies to the proteins disclosed herein can be used to identify and isolate other proteins from a mixture of proteins. Specifically, antibodies may be raised to the portions of the proteins that are most conserved or most distinct, as compared to other related proteins. These antibodies can then be used to specifically identify equivalent proteins with the characteristic activity by immunoprecipitation, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), or immuno-blotting. Antibodies to the proteins disclosed herein, or to equivalent proteins, or to fragments of these proteins, can be readily prepared using standard procedures. Such antibodies are an aspect of the subject invention. Antibodies of the subject invention include monoclonal and polyclonal antibodies, preferably produced in response to an exemplified or suggested protein.

[0071] One skilled in the art would readily recognize that proteins (and genes) of the subject invention can be obtained from a variety of sources. Since entire herbicide degradation operons are known to be encoded on transposable elements such as plasmids, as well as genomically integrated, proteins of the subject invention can be obtained from a wide variety of microorganisms, for example, including recombinant and/or wild-type bacteria.

[0072] Mutants of bacterial isolates can be made by procedures that are well known in the art. For example, asporogenous mutants can be obtained through ethylmethane sulfonate (EMS) mutagenesis of an isolate. The mutant strains can also be made using ultraviolet light and nitrosoguanidine by procedures well known in the art.

[0073] A protein “from” or “obtainable from” any of the subject isolates referred to or suggested herein means that the protein (or a similar protein) can be obtained from the isolate or some other source, such as another bacterial strain or a plant. “Derived from” also has this connotation, and includes proteins obtainable from a given type of bacterium that are modified for expression in a plant, for example. One skilled in the art will readily recognize that, given the disclosure of a bacterial gene and protein, a plant can be engineered to produce the protein. Antibody preparations, nucleic acid probes (DNA, RNA, or PNA, for example), and the like can be prepared using the polynucleotide and/or amino acid sequences disclosed herein and used to screen and recover other related genes from other (natural) sources.

[0074] Standard molecular biology techniques may be used to clone and sequence the proteins and genes described herein. Additional information may be found in Sambrook *et al.*, 1989, which is incorporated herein by reference.

[0075] Polynucleotides and probes. The subject invention further provides nucleic acid sequences that encode proteins for use according to the subject invention. The subject invention further provides methods of identifying and characterizing genes that encode proteins having the desired herbicidal activity. In one embodiment, the subject invention provides unique nucleotide sequences that are useful as hybridization probes and/or primers for PCR techniques. The primers produce characteristic gene fragments that can be used in the identification, characterization, and/or isolation of specific genes of interest. The nucleotide sequences of the subject invention encode proteins that are distinct from previously described proteins.

[0076] The polynucleotides of the subject invention can be used to form complete "genes" to encode proteins or peptides in a desired host cell. For example, as the skilled artisan would readily recognize, the subject polynucleotides can be appropriately placed under the control of a promoter in a host of interest, as is readily known in the art. The level of gene expression and temporal/tissue specific expression can greatly impact the utility of the invention. Generally, greater levels of protein expression of a degradative gene will result in faster and more complete degradation of a substrate (in this case a target herbicide). Promoters will be desired to express the target gene at high levels unless the high expression has a consequential negative impact on the health of the plant. Typically, one would wish to have the *AAD-12* gene constitutively expressed in all tissues for complete protection of the plant at all growth stages. However, one could alternatively use a vegetatively expressed resistance gene; this would allow use of the target herbicide in-crop for weed control and would subsequently control sexual reproduction of the target crop by application during the flowering stage. In addition, desired levels and times of expression can also depend on the type of plant and the level of tolerance desired. Some preferred embodiments use strong constitutive promoters combined with transcription enhancers and the like to increase expression levels and to enhance tolerance to desired levels. Some such applications are discussed in more detail below, before the Examples section.

[0077] As the skilled artisan knows, DNA typically exists in a double-stranded form. In this arrangement, one strand is complementary to the other strand and vice versa. As DNA is replicated in a plant (for example), additional complementary strands of DNA are produced. The "coding strand" is often used in the art to refer to the strand that binds with the anti-sense strand. The mRNA is transcribed from the "anti-sense" strand of DNA. The "sense" or

"coding" strand has a series of codons (a codon is three nucleotides that can be read as a three-residue unit to specify a particular amino acid) that can be read as an open reading frame (ORF) to form a protein or peptide of interest. In order to produce a protein *in vivo*, a strand of DNA is typically transcribed into a complementary strand of mRNA which is used as the template for the protein. Thus, the subject invention includes the use of the exemplified polynucleotides shown in the attached sequence listing and/or equivalents including the complementary strands. RNA and PNA (peptide nucleic acids) that are functionally equivalent to the exemplified DNA molecules are included in the subject invention.

[0078] In one embodiment of the subject invention, bacterial isolates can be cultivated under conditions resulting in high multiplication of the microbe. After treating the microbe to provide single-stranded genomic nucleic acid, the DNA can be contacted with the primers of the invention and subjected to PCR amplification. Characteristic fragments of genes of interest will be amplified by the procedure, thus identifying the presence of the gene(s) of interest.

[0079] Further aspects of the subject invention include genes and isolates identified using the methods and nucleotide sequences disclosed herein. The genes thus identified can encode herbicidal resistance proteins of the subject invention.

[0080] Proteins and genes for use according to the subject invention can be identified and obtained by using oligonucleotide probes, for example. These probes are detectable nucleotide sequences that can be detectable by virtue of an appropriate label or may be made inherently fluorescent as described in International Application No. WO 93/16094. The probes (and the polynucleotides of the subject invention) may be DNA, RNA, or PNA. In addition to adenine (A), cytosine (C), guanine (G), thymine (T), and uracil (U; for RNA molecules), synthetic probes (and polynucleotides) of the subject invention can also have inosine (a neutral base capable of pairing with all four bases; sometimes used in place of a mixture of all four bases in synthetic probes) and/or other synthetic (non-natural) bases. Thus, where a synthetic, degenerate oligonucleotide is referred to herein, and "N" or "n" is used generically, "N" or "n" can be G, A, T, C, or inosine. Ambiguity codes as used herein are in accordance with standard IUPAC naming conventions as of the filing of the subject application (for example, R means A or G, Y means C or T, *etc.*).

[0081] As is well known in the art, if a probe molecule hybridizes with a nucleic acid sample, it can be reasonably assumed that the probe and sample have substantial homology/similarity/identity. Preferably, hybridization of the polynucleotide is first conducted followed by washes under conditions of low, moderate, or high stringency by techniques well-known in the art, as described in, for example, Keller, G.H., M.M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, NY, pp. 169-170. For example, as stated therein, low stringency conditions can be achieved by first washing with 2x SSC (Standard Saline Citrate)/0.1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) for 15 minutes at room temperature. Two washes are typically performed. Higher stringency can then be achieved by lowering the salt concentration and/or by raising the temperature. For example, the wash described above can be followed by two washings with 0.1x SSC/0.1% SDS for 15 minutes each at room temperature followed by subsequent washes with 0.1x SSC/0.1% SDS for 30 minutes each at 55° C. These temperatures can be used with other hybridization and wash protocols set forth herein and as would be known to one skilled in the art (SSPE can be used as the salt instead of SSC, for example). The 2x SSC/0.1% SDS can be prepared by adding 50 ml of 20x SSC and 5 ml of 10% SDS to 445 ml of water. 20x SSC can be prepared by combining NaCl (175.3 g/0.150 M), sodium citrate (88.2 g/0.015 M), and water, adjusting pH to 7.0 with 10 N NaOH, then adjusting the volume to 1 liter. 10% SDS can be prepared by dissolving 10 g of SDS in 50 ml of autoclaved water, then diluting to 100 ml.

[0082] Detection of the probe provides a means for determining in a known manner whether hybridization has been maintained. Such a probe analysis provides a rapid method for identifying genes of the subject invention. The nucleotide segments used as probes according to the invention can be synthesized using a DNA synthesizer and standard procedures. These nucleotide sequences can also be used as PCR primers to amplify genes of the subject invention.

[0083] Hybridization characteristics of a molecule can be used to define polynucleotides of the subject invention. Thus the subject invention includes polynucleotides (and/or their complements, preferably their full complements) that hybridize with a polynucleotide exemplified herein. That is, one way to define a gene (and the protein it encodes), for example, is by its ability to hybridize (under any of the conditions specifically disclosed herein) with a known or specifically exemplified gene.

[0084] As used herein, "stringent" conditions for hybridization refers to conditions which achieve the same, or about the same, degree of specificity of hybridization as the conditions employed by the current applicants. Specifically, hybridization of immobilized DNA on Southern blots with ³²P-labeled gene-specific probes can be performed by standard methods (see, e.g., Maniatis *et al.* 1982). In general, hybridization and subsequent washes can be carried out under conditions that allow for detection of target sequences. For double-stranded DNA gene probes, hybridization can be carried out overnight at 20-25° C below the melting temperature (T_m) of the DNA hybrid in 6x SSPE, 5x Denhardt's solution, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml denatured DNA. The melting temperature is described by the following formula (Beltz *et al.* 1983):

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

[0085] Washes can typically be carried out as follows:

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

[0086] For oligonucleotide probes, hybridization can be carried out overnight at 10-20° C below the melting temperature (T_m) of the hybrid in 6x SSPE, 5x Denhardt's solution, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml denatured DNA. T_m for oligonucleotide probes can be determined by the following formula:

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

(Suggs *et al.*, 1981).

[0087] Washes can typically be out as follows:

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

[0088] In general, salt and/or temperature can be altered to change stringency. With a labeled DNA fragment >70 or so bases in length, the following conditions can be used:

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

[0089] Duplex formation and stability depend on substantial complementarity between the two strands of a hybrid, and, as noted above, a certain degree of mismatch can be tolerated. Therefore, the probe sequences of the subject invention include mutations (both single and multiple), deletions, insertions of the described sequences, and combinations thereof, wherein said mutations, insertions and deletions permit formation of stable hybrids with the target polynucleotide of interest. Mutations, insertions, and deletions can be produced in a given polynucleotide sequence in many ways, and these methods are known to an ordinarily skilled artisan. Other methods may become known in the future.

[0090] PCR technology. Polymerase Chain Reaction (PCR) is a repetitive, enzymatic, primed synthesis of a nucleic acid sequence. This procedure is well known and commonly used by those skilled in this art (*see* Mullis, U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,683,202, and 4,800,159; Saiki *et al.*, 1985). PCR is based on the enzymatic amplification of a DNA fragment of interest that is flanked by two oligonucleotide primers that hybridize to opposite strands of the target sequence. The primers are preferably oriented with the 3' ends pointing towards each other. Repeated cycles of heat denaturation of the template, annealing of the primers to their complementary sequences, and extension of the annealed primers with a DNA polymerase result in the amplification of the segment defined by the 5' ends of the PCR primers. The extension product of each primer can serve as a template for the other primer, so each cycle essentially doubles the amount of DNA fragment produced in the previous cycle. This results in the exponential accumulation of the specific target fragment, up to several million-fold in a few hours. By using a thermostable DNA polymerase such as *Taq* polymerase, isolated from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*, the amplification process can be completely automated. Other enzymes which can be used are known to those skilled in the art.

[0091] Exemplified DNA sequences, or segments thereof, can be used as primers for PCR amplification. In performing PCR amplification, a certain degree of mismatch can be tolerated between primer and template. Therefore, mutations, deletions, and insertions (especially additions of nucleotides to the 5' end) of the exemplified primers fall within the

scope of the subject invention. Mutations, insertions, and deletions can be produced in a given primer by methods known to an ordinarily skilled artisan.

[0092] Modification of genes and proteins. The subject genes and proteins can be fused to other genes and proteins to produce chimeric or fusion proteins. The genes and proteins useful according to the subject invention include not only the specifically exemplified full-length sequences, but also portions, segments and/or fragments (including contiguous fragments and internal and/or terminal deletions compared to the full-length molecules) of these sequences, variants, mutants, chimerics, and fusions thereof. Proteins of the subject invention can have substituted amino acids so long as they retain desired functional activity. "Variant" genes have nucleotide sequences that encode the same proteins or equivalent proteins having activity equivalent or similar to an exemplified protein.

[0093] The top two results of BLAST searches with the native aad-12 nucleotide sequence show a reasonable level of homology (about 85%) over 120 basepairs of sequence. Hybridization under certain conditions could be expected to include these two sequences. See GENBANK Acc. Nos. DQ406818.1 (89329742; *Rhodoferax*) and AJ6288601.1 (44903451; *Sphingomonas*). *Rhodoferax* is very similar to *Delftia* but *Sphingomonas* is an entirely different Class phylogenetically.

[0094] The terms "variant proteins" and "equivalent proteins" refer to proteins having the same or essentially the same biological/functional activity against the target substrates and equivalent sequences as the exemplified proteins. As used herein, reference to an "equivalent" sequence refers to sequences having amino acid substitutions, deletions, additions, or insertions that improve or do not adversely affect activity to a significant extent. Fragments retaining activity are also included in this definition. Fragments and other equivalents that retain the same or similar function or activity as a corresponding fragment of an exemplified protein are within the scope of the subject invention. Changes, such as amino acid substitutions or additions, can be made for a variety of purposes, such as increasing (or decreasing) protease stability of the protein (without materially/substantially decreasing the functional activity of the protein), removing or adding a restriction site, and the like. Variations of genes may be readily constructed using standard techniques for making point mutations, for example.

[0095] In addition, U.S. Patent No. 5,605,793, for example, describes methods for generating additional molecular diversity by using DNA reassembly after random or focused

fragmentation. This can be referred to as gene “shuffling,” which typically involves mixing fragments (of a desired size) of two or more different DNA molecules, followed by repeated rounds of renaturation. This can improve the activity of a protein encoded by a starting gene. The result is a chimeric protein having improved activity, altered substrate specificity, increased enzyme stability, altered stereospecificity, or other characteristics.

[0096] “Shuffling” can be designed and targeted after obtaining and examining the atomic 3D (three dimensional) coordinates and crystal structure of a protein of interest. Thus, “focused shuffling” can be directed to certain segments of a protein that are ideal for modification, such as surface-exposed segments, and preferably not internal segments that are involved with protein folding and essential 3D structural integrity.

[0097] Specific changes to the “active site” of the enzyme can be made to affect the inherent functionality with respect to activity or stereospecificity (see alignment **Figure 2**). Muller *et. al.* (2006). The known tauD crystal structure was used as a model dioxygenase to determine active site residues while bound to its inherent substrate taurine. Elkins *et al.* (2002) “X-ray crystal structure of *Escherichia coli* taurine/alpha-ketoglutarate dioxygenase complexed to ferrous iron and substrates,” *Biochemistry* 41(16):5185-5192. Regarding sequence optimization and designability of enzyme active sites, see Chakrabarti *et al.*, PNAS, (Aug. 23, 2005), 102(34):12035-12040.

[0098] Variant genes can be used to produce variant proteins; recombinant hosts can be used to produce the variant proteins. Using these “gene shuffling” techniques, equivalent genes and proteins can be constructed that comprise any 5, 10, or 20 contiguous residues (amino acid or nucleotide) of any sequence exemplified herein. As one skilled in the art knows, the gene shuffling techniques, for example, can be adjusted to obtain equivalents having, for example, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190,

191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, or 293 contiguous residues (amino acid or nucleotide), corresponding to a segment (of the same size) in any of the exemplified or suggested sequences (or the complements (full complements) thereof). Similarly sized segments, especially those for conserved regions, can also be used as probes and/or primers.

[0099] Fragments of full-length genes can be made using commercially available exonucleases or endonucleases according to standard procedures. For example, enzymes such as *Bal31* or site-directed mutagenesis can be used to systematically cut off nucleotides from the ends of these genes. Also, genes that encode active fragments may be obtained using a variety of restriction enzymes. Proteases may be used to directly obtain active fragments of these proteins.

[00100] It is within the scope of the invention as disclosed herein that proteins can be truncated and still retain functional activity. By "truncated protein" it is meant that a portion of a protein may be cleaved off while the remaining truncated protein retains and exhibits the desired activity after cleavage. Cleavage can be achieved by various proteases. Furthermore, effectively cleaved proteins can be produced using molecular biology techniques wherein the DNA bases encoding said protein are removed either through digestion with restriction endonucleases or other techniques available to the skilled artisan. After truncation, said proteins can be expressed in heterologous systems such as *E. coli*, baculoviruses, plant-based viral systems, yeast, and the like and then placed in insect assays as disclosed herein to determine activity. It is well-known in the art that truncated proteins can be successfully produced so that they retain functional activity while having less than the entire, full-length sequence. For example, *B.t.* proteins can be used in a truncated (core protein) form (*see, e.g., Höfte et al. (1989), and Adang et al. (1985)*). As used herein, the term "protein" can include functionally active truncations.

[00101] In some cases, especially for expression in plants, it can be advantageous to use truncated genes that express truncated proteins. Preferred truncated genes will typically

encode 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% of the full-length protein.

[00102] Certain proteins of the subject invention have been specifically exemplified herein. As these proteins are merely exemplary of the proteins of the subject invention, it should be readily apparent that the subject invention comprises variant or equivalent proteins (and nucleotide sequences coding for equivalents thereof) having the same or similar activity of the exemplified proteins. Equivalent proteins will have amino acid similarity (and/or homology) with an exemplified protein. The amino acid identity will typically be at least 60%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, even more preferably at least 90%, and can be at least 95%. Preferred proteins of the subject invention can also be defined in terms of more particular identity and/or similarity ranges. For example, the identity and/or similarity can be 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% as compared to a sequence exemplified or suggested herein. Any number listed above can be used to define the upper and lower limits.

[00103] Unless otherwise specified, as used herein, percent sequence identity and/or similarity of two nucleic acids is determined using the algorithm of Karlin and Altschul, 1990, modified as in Karlin and Altschul 1993. Such an algorithm is incorporated into the NBLAST and XBLAST programs of Altschul *et al.*, 1990. BLAST nucleotide searches are performed with the NBLAST program, score = 100, wordlength = 12. Gapped BLAST can be used as described in Altschul *et al.*, 1997. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (NBLAST and XBLAST) are used. See NCBI/NIH website. To obtain gapped alignments for comparison purposes, the AlignX function of Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., North Bethesda, MD, U.S.A.), was used employing the default parameters. These were: a Gap opening penalty of 15, a Gap extension penalty of 6.66, and a Gap separation penalty range of 8.

[00104] Various properties and three-dimensional features of the protein can also be changed without adversely affecting the activity/functionality of the protein. Conservative amino acid substitutions can be tolerated/made to not adversely affect the activity and/or three-dimensional configuration of the molecule. Amino acids can be placed in the following classes: non-polar, uncharged polar, basic, and acidic. Conservative substitutions whereby

an amino acid of one class is replaced with another amino acid of the same type fall within the scope of the subject invention so long as the substitution is not adverse to the biological activity of the compound. **Table 2** provides a listing of examples of amino acids belonging to each class.

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

[00105] In some instances, non-conservative substitutions can also be made. However, preferred substitutions do not significantly detract from the functional/biological activity of the protein.

[00106] As used herein, reference to “isolated” polynucleotides and/or “purified” proteins refers to these molecules when they are not associated with the other molecules with which they would be found in nature. Thus, reference to “isolated” and/or “purified” signifies the involvement of the “hand of man” as described herein. For example, a bacterial “gene” of the subject invention put into a plant for expression is an “isolated polynucleotide.” Likewise, a protein derived from a bacterial protein and produced by a plant is an “isolated protein.”

[00107] Because of the degeneracy/redundancy of the genetic code, a variety of different DNA sequences can encode the amino acid sequences disclosed herein. It is well within the skill of a person trained in the art to create alternative DNA sequences that encode the same, or essentially the same, proteins. These variant DNA sequences are within the scope of the subject invention. This is also discussed in more detail below in the section entitled “Optimization of sequence for expression in plants.”

[00108] Optimization of sequence for expression in plants. To obtain high expression of heterologous genes in plants it is generally preferred to reengineer the genes so that they are more efficiently expressed in (the cytoplasm of) plant cells. Maize is one such plant where it may be preferred to re-design the heterologous gene(s) prior to transformation to increase the expression level thereof in said plant. Therefore, an additional step in the design of genes encoding a bacterial protein is reengineering of a heterologous gene for optimal expression, using codon bias more closely aligned with the target plant sequence, whether a dicot or

monocot species. Sequences can also be optimized for expression in any of the more particular types of plants discussed elsewhere herein.

[00109] Transgenic hosts. The protein-encoding genes of the subject invention can be introduced into a wide variety of microbial or plant hosts. The subject invention includes transgenic plant cells and transgenic plants. Preferred plants (and plant cells) are corn, *Arabidopsis*, tobacco, soybeans, cotton, canola, rice, wheat, turf, legume forages (e.g., alfalfa and clover), pasture grasses, and the like. Other types of transgenic plants can also be made according to the subject invention, such as fruits, vegetables, ornamental plants, and trees. More generally, dicots and/or monocots can be used in various aspects of the subject invention.

[00110] In preferred embodiments, expression of the gene results, directly or indirectly, in the intracellular production (and maintenance) of the protein(s) of interest. Plants can be rendered herbicide-resistant in this manner. Such hosts can be referred to as transgenic, recombinant, transformed, and/or transfected hosts and/or cells. In some aspects of this invention (when cloning and preparing the gene of interest, for example), microbial (preferably bacterial) cells can be produced and used according to standard techniques, with the benefit of the subject disclosure.

[00111] Plant cells transfected with a polynucleotide of the subject invention can be regenerated into whole plants. The subject invention includes cell cultures including tissue cell cultures, liquid cultures, and plated cultures. Seeds produced by and/or used to generate plants of the subject invention are also included within the scope of the subject invention. Other plant tissues and parts are also included in the subject invention. The subject invention likewise includes methods of producing plants or cells comprising a polynucleotide of the subject invention. One preferred method of producing such plants is by planting a seed of the subject invention.

[00112] Although plants can be preferred, the subject invention also includes production of highly active recombinant AAD-12 in a *Pseudomonas fluorescens* (Pf) host strain, for example. The subject invention includes preferred growth temperatures for maintaining soluble active AAD-12 in this host; a fermentation condition where AAD-12 is produced as more than 40% total cell protein, or at least 10 g/L; a purification process results high recovery of active recombinant AAD-12 from a Pf host; a purification scheme which yields at least 10 g active AAD-12 per kg of cells; a purification scheme which can yield 20 g active

AAD-12 per kg of cells; a formulation process that can store and restore AAD-12 activity in solution; and a lyophilization process that can retain AAD-12 activity for long-term storage and shelf life.

[00113] Insertion of genes to form transgenic hosts. One aspect of the subject invention is the transformation/transfection of plants, plant cells, and other host cells with polynucleotides of the subject invention that express proteins of the subject invention. Plants transformed in this manner can be rendered resistant to a variety of herbicides with different modes of action.

[00114] A wide variety of methods are available for introducing a gene encoding a desired protein into the target host under conditions that allow for stable maintenance and expression of the gene. These methods are well known to those skilled in the art and are described, for example, in U.S. Patent No. 5,135,867.

[00115] Vectors comprising an *AAD-12* polynucleotide are included in the scope of the subject invention. For example, a large number of cloning vectors comprising a replication system in *E. coli* and a marker that permits selection of the transformed cells are available for preparation for the insertion of foreign genes into higher plants. The vectors comprise, for example, pBR322, pUC series, M13mp series, pACYC184, *etc.* Accordingly, the sequence encoding the protein can be inserted into the vector at a suitable restriction site. The resulting plasmid is used for transformation into *E. coli*. The *E. coli* cells are cultivated in a suitable nutrient medium, then harvested and lysed. The plasmid is recovered by purification away from genomic DNA. Sequence analysis, restriction analysis, electrophoresis, and other biochemical-molecular biological methods are generally carried out as methods of analysis. After each manipulation, the DNA sequence used can be restriction digested and joined to the next DNA sequence. Each plasmid sequence can be cloned in the same or other plasmids. Depending on the method of inserting desired genes into the plant, other DNA sequences may be necessary. If, for example, the Ti or Ri plasmid is used for the transformation of the plant cell, then at least the right border, but often the right and the left border of the Ti or Ri plasmid T-DNA, has to be joined as the flanking region of the genes to be inserted. The use of T-DNA for the transformation of plant cells has been intensively researched and described in EP 120 516; Hoekema (1985); Fraley *et al.* (1986); and An *et al.* (1985).

[00116] A large number of techniques are available for inserting DNA into a plant host cell. Those techniques include transformation with T-DNA using *Agrobacterium tumefaciens* or *Agrobacterium rhizogenes* as transformation agent, fusion, injection, biolistics (microparticle

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

[00117] The transformed cells grow inside the plants in the usual manner. They can form germ cells and transmit the transformed trait(s) to progeny plants. Such plants can be grown in the normal manner and crossed with plants that have the same transformed hereditary factors or other hereditary factors. The resulting hybrid individuals have the corresponding phenotypic properties.

[00118] In some preferred embodiments of the invention, genes encoding the bacterial protein are expressed from transcriptional units inserted into the plant genome. Preferably, said transcriptional units are recombinant vectors capable of stable integration into the plant genome and enable selection of transformed plant lines expressing mRNA encoding the proteins.

[00119] Once the inserted DNA has been integrated in the genome, it is relatively stable there (and does not come out again). It normally contains a selection marker that confers on the transformed plant cells resistance to a biocide or an antibiotic, such as kanamycin, G418, bleomycin, hygromycin, or chloramphenicol, *inter alia*. Plant selectable markers also typically can provide resistance to various herbicides such as glufosinate (*e.g.*, *PAT/bar*), glyphosate (*EPSPS*), ALS-inhibitors (*e.g.*, imidazolinone, sulfonylurea, triazolopyrimidine sulfonanilide, *et al.*), bromoxynil, HPPD-inhibitor resistance, PPO-inhibitors, ACC-ase inhibitors, and many others. The individually employed marker should accordingly permit the selection of transformed cells rather than cells that do not contain the inserted DNA. The gene(s) of interest are preferably expressed either by constitutive or inducible promoters in the plant cell. Once expressed, the mRNA is translated into proteins, thereby incorporating amino acids of interest into protein. The genes encoding a protein expressed in the plant cells can be under the control of a constitutive promoter, a tissue-specific promoter, or an inducible promoter.

[00120] Several techniques exist for introducing foreign recombinant vectors into plant cells, and for obtaining plants that stably maintain and express the introduced gene. Such techniques include the introduction of genetic material coated onto microparticles directly into cells (U.S. Patent Nos. 4,945,050 to Cornell and 5,141,131 to DowElanco, now Dow AgroSciences, LLC). In addition, plants may be transformed using *Agrobacterium* technology, *see* U.S. Patent Nos. 5,177,010 to University of Toledo; 5,104,310 to Texas A&M; European Patent Application 0131624B1; European Patent Applications 120516, 159418B1 and 176,112 to Schilperoot; U.S. Patent Nos. 5,149,645, 5,469,976, 5,464,763 and 4,940,838 and 4,693,976 to Schilperoot; European Patent Applications 116718, 290799, 320500, all to Max Planck; European Patent Applications 604662 and 627752, and U.S. Patent No. 5,591,616, to Japan Tobacco; European Patent Applications 0267159 and 0292435, and U.S. Patent No. 5,231,019, all to Ciba Geigy, now Syngenta; U.S. Patent Nos. 5,463,174 and 4,762,785, both to Calgene; and U.S. Patent Nos. 5,004,863 and 5,159,135, both to Agracetus. Other transformation technology includes whiskers technology. *See* U.S. Patent Nos. 5,302,523 and 5,464,765, both to Zeneca, now Syngenta. Other direct DNA delivery transformation technology includes aerosol beam technology. *See* U.S. Patent No. 6,809,232. Electroporation technology has also been used to transform plants. *See* WO 87/06614 to Boyce Thompson Institute; U.S. Patent Nos. 5,472,869 and 5,384,253, both to

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

[00121] As mentioned previously, the manner in which the DNA construct is introduced into the plant host is not critical to this invention. Any method that provides for efficient transformation may be employed. For example, various methods for plant cell transformation are described herein and include the use of Ti or Ri-plasmids and the like to perform *Agrobacterium* mediated transformation. In many instances, it will be desirable to have the construct used for transformation bordered on one or both sides by T-DNA borders, more specifically the right border. This is particularly useful when the construct uses *Agrobacterium tumefaciens* or *Agrobacterium rhizogenes* as a mode for transformation, although T-DNA borders may find use with other modes of transformation. Where *Agrobacterium* is used for plant cell transformation, a vector may be used which may be introduced into the host for homologous recombination with T-DNA or the Ti or Ri plasmid present in the host. Introduction of the vector may be performed via electroporation, tri-parental mating and other techniques for transforming gram-negative bacteria which are known to those skilled in the art. The manner of vector transformation into the *Agrobacterium* host is not critical to this invention. The Ti or Ri plasmid containing the T-DNA for recombination may be capable or incapable of causing gall formation, and is not critical to said invention so long as the vir genes are present in said host.

[00122] In some cases where *Agrobacterium* is used for transformation, the expression construct being within the T-DNA borders will be inserted into a broad spectrum vector such as pRK2 or derivatives thereof as described in Ditta *et al.* (1980) and EPO 0 120 515. Included within the expression construct and the T-DNA will be one or more markers as described herein which allow for selection of transformed *Agrobacterium* and transformed plant cells. The particular marker employed is not essential to this invention, with the preferred marker depending on the host and construction used.

[00123] For transformation of plant cells using *Agrobacterium*, explants may be combined and incubated with the transformed *Agrobacterium* for sufficient time to allow transformation

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

[00124] In addition to numerous technologies for transforming plants, the type of tissue that is contacted with the foreign genes may vary as well. Such tissue would include but would not be limited to embryogenic tissue, callus tissue types I, II, and III, hypocotyl, meristem, root tissue, tissues for expression in phloem, and the like. Almost all plant tissues may be transformed during dedifferentiation using appropriate techniques described herein.

[00125] As mentioned above, a variety of selectable markers can be used, if desired. Preference for a particular marker is at the discretion of the artisan, but any of the following selectable markers may be used along with any other gene not listed herein which could function as a selectable marker. Such selectable markers include but are not limited to aminoglycoside phosphotransferase gene of transposon Tn5 (Aph II) which encodes resistance to the antibiotics kanamycin, neomycin and G41; hygromycin resistance; methotrexate resistance, as well as those genes which encode for resistance or tolerance to glyphosate; phosphinothricin (bialaphos or glufosinate); ALS-inhibiting herbicides (imidazolinones, sulfonylureas and triazolopyrimidine herbicides), ACC-ase inhibitors (e.g., aryloxypropionates or cyclohexanediones), and others such as bromoxynil, and HPPD-inhibitors (e.g., mesotrione) and the like.

[00126] In addition to a selectable marker, it may be desirable to use a reporter gene. In some instances a reporter gene may be used with or without a selectable marker. Reporter genes are genes that are typically not present in the recipient organism or tissue and typically encode for proteins resulting in some phenotypic change or enzymatic property. Examples of such genes are provided in Weising *et al.*, 1988. Preferred reporter genes include the beta-

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

[00127] In addition to plant promoter regulatory elements, promoter regulatory elements from a variety of sources can be used efficiently in plant cells to express foreign genes. For example, promoter regulatory elements of bacterial origin, such as the octopine synthase promoter, the nopaline synthase promoter, the mannopine synthase promoter; promoters of viral origin, such as the cauliflower mosaic virus (35S and 19S), 35T (which is a re-engineered 35S promoter, *see* U.S. Patent No. 6,166,302, especially Example 7E) and the like may be used. Plant promoter regulatory elements include but are not limited to ribulose-1,6-bisphosphate (RUBP) carboxylase small subunit (ssu), beta-conglycinin promoter, beta-phaseolin promoter, ADH promoter, heat-shock promoters, and tissue specific promoters. Other elements such as matrix attachment regions, scaffold attachment regions, introns, enhancers, polyadenylation sequences and the like may be present and thus may improve the transcription efficiency or DNA integration. Such elements may or may not be necessary for DNA function, although they can provide better expression or functioning of the DNA by affecting transcription, mRNA stability, and the like. Such elements may be included in the DNA as desired to obtain optimal performance of the transformed DNA in the plant. Typical elements include but are not limited to Adh-intron 1, Adh-intron 6, the alfalfa mosaic virus coat protein leader sequence, osmotin UTR sequences, the maize streak virus coat protein leader sequence, as well as others available to a skilled artisan. Constitutive promoter regulatory elements may also be used thereby directing continuous gene expression in all cells types and at all times (*e.g.*, actin, ubiquitin, CaMV 35S, and the like). Tissue specific promoter regulatory elements are responsible for gene expression in specific cell or tissue types, such as the leaves or seeds (*e.g.*, zein, oleosin, napin, ACP, globulin and the like) and these may also be used.

[00128] Promoter regulatory elements may also be active (or inactive) during a certain stage of the plant's development as well as active in plant tissues and organs. Examples of such

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

[00129] Plant RNA viral based systems can also be used to express bacterial protein. In so doing, the gene encoding a protein can be inserted into the coat promoter region of a suitable plant virus which will infect the host plant of interest. The protein can then be expressed thus providing protection of the plant from herbicide damage. Plant RNA viral based systems are described in U.S. Patent No. 5,500,360 to Mycogen Plant Sciences, Inc. and U.S. Patent Nos. 5,316,931 and 5,589,367 to Biosource, now Large Scale Biology.

[00130] Means of further increasing tolerance or resistance levels. It is shown herein that plants of the subject invention can be imparted with novel herbicide resistance traits without observable adverse effects on phenotype including yield. Such plants are within the scope of the subject invention. Plants exemplified and suggested herein can withstand 2X, 3X, 4X, and 5X typical application levels, for example, of at least one subject herbicide. Improvements in these tolerance levels are within the scope of this invention. For example, various techniques are known in the art, and can foreseeably be optimized and further developed, for increasing expression of a given gene.

[00131] One such method includes increasing the copy number of the subject AAD-12 genes (in expression cassettes and the like). Transformation events can also be selected for those having multiple copies of the genes.

[00132] Strong promoters and enhancers can be used to "supercharge" expression. Examples of such promoters include the preferred 35T promoter which uses 35S enhancers. 35S, maize ubiquitin, Arabidopsis ubiquitin, A.t. actin, and CSMV promoters are included for such uses. Other strong viral promoters are also preferred. Enhancers include 4 OCS and the 35S double enhancer. Matrix attachment regions (MARs) can also be used to increase transformation efficiencies and transgene expression, for example.

[00133] Shuffling (directed evolution) and transcription factors can also be used for embodiments according to the subject invention.

[00134] Variant proteins can also be designed that differ at the sequence level but that retain the same or similar overall essential three-dimensional structure, surface charge distribution, and the like. See *e.g.* U.S. Patent No. 7,058,515; Larson et al., *Protein Sci.* 2002 11: 2804-2813, "Thoroughly sampling sequence space: Large-scale protein design of structural ensembles."; Cramer et al., *Nature Biotechnology* 15, 436 - 438 (1997), "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling."; Stemmer, W.P.C.1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751; Stemmer, W.P.C.1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-391; Stemmer, W.P.C.1995. Searching sequence space. *Bio/Technology* 13: 549-553; Cramer, A., Cwirla, S. and Stemmer, W.P.C.1996. Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nature Medicine* 2: 100-103; and Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P.C. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology* 14: 315-319.

[00135] The activity of recombinant polynucleotides inserted into plant cells can be dependent upon the influence of endogenous plant DNA adjacent the insert. Thus, another option is taking advantage of events that are known to be excellent locations in a plant genome for insertions. See *e.g.* WO 2005/103266 A1, relating to cry1F and cry1Ac cotton events; the subject AAD-12 gene can be substituted in those genomic loci in place of the cry1F and/or cry1Ac inserts. Thus, targeted homologous recombination, for example, can be used according to the subject invention. This type of technology is the subject of, for example, WO 03/080809 A2 and the corresponding published U.S. application (USPA 20030232410), relating to the use of zinc fingers for targeted recombination. The use of recombinases (cre-lox and flp-frt for example) is also known in the art.

[00136] AAD-12 detoxification is believed to occur in the cytoplasm. Thus, means for further stabilizing this protein and mRNAs (including blocking mRNA degradation) are included in aspects of the subject invention, and art-known techniques can be applied accordingly. The subject proteins can be designed to resist degradation by proteases and the like (protease cleavage sites can be effectively removed by re-engineering the amino acid sequence of the protein). Such embodiments include the use of 5' and 3' stem loop structures like UTRs

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

[00137] Computational design of 5' or 3' UTR most suitable for AAD-12 (synthetic hairpins) can also be conducted within the scope of the subject invention. Computer modeling in general, as well as gene shuffling and directed evolution, are discussed elsewhere herein. More specifically regarding computer modeling and UTRs, computer modeling techniques for use in predicting/evaluating 5' and 3' UTR derivatives of the present invention include, but are not limited to: MFold version 3.1 available from Genetics Corporation Group, Madison, WI (see Zucker et al., Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In *RNA Biochemistry and Biotechnology*, 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker et al., *Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure*. *J. Mol. Biol.* 288, 911-940 (1999); Zucker et al., RNA Secondary Structure Prediction. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* S. Beaucage, D.E. Bergstrom, G.D. Glick, and R.A. Jones eds., John Wiley & Sons, New York, 11.2.1-11.2.10, (2000)), COVE (RNA structure analysis using covariance models (stochastic context free grammar methods)) v.2.4.2 (Eddy & Durbin, *Nucl. Acids Res.* 1994, 22: 2079-2088) which is freely distributed as source code and which can be downloaded by accessing the website genetics.wustl.edu/eddy/software/, and FOLDALIGN, also freely distributed and available for downloading at the website bioinf.au.dk.FOLDALIGN/ (see *Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences*. J. Gorodkin, L. J. Heyer and G. D. Stormo. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, no. 18 pp 3724-3732, 1997; *Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences*. J. Gorodkin, L. J. Heyer, and G. D. Stormo. *ISMB* 5;120-123, 1997).

[00138] Embodiments of the subject invention can be used in conjunction with naturally evolved or chemically induced mutants (mutants can be selected by screening techniques, then transformed with AAD-12 and possibly other genes). Plants of the subject invention can be combined with ALS resistance and/or evolved glyphosate resistance. Aminopyralid resistance, for example, can also be combined or "stacked" with an AAD-12 gene.

[00139] Traditional breeding techniques can also be combined with the subject invention to powerfully combine, introgress, and improve desired traits.

[00140] Further improvements also include use with appropriate safeners to further protect plants and/or to add cross resistance to more herbicides. (Safeners typically act to increase plants immune system by activating/expressing cP450. Safeners are chemical agents that reduce the phytotoxicity of herbicides to crop plants by a physiological or molecular mechanism, without compromising weed control efficacy.)

[00141] Herbicide safeners include benoxacor, cloquintocet, cyometrinil, dichlormid, dicyclonon, dietholate, fenchlorazole, fenclorim, flurazole, fluxofenim, furilazole, isoxadifen, mefenpyr, mephenate, naphthalic anhydride, and oxabetrinil. Plant activators (a new class of compounds that protect plants by activating their defense mechanisms) can also be used in embodiments of the subject invention. These include acibenzolar and probenazole.

[00142] Commercialized safeners can be used for the protection of large-seeded grass crops, such as corn, grain sorghum, and wet-sown rice, against preplant-incorporated or preemergence-applied herbicides of the thiocarbamate and chloroacetanilide families. Safeners also have been developed to protect winter cereal crops such as wheat against postemergence applications of aryloxyphenoxypropionate and sulfonylurea herbicides. The use of safeners for the protection of corn and rice against sulfonylurea, imidazolinone, cyclohexanedione, isoxazole, and triketone herbicides is also well-established. A safener-induced enhancement of herbicide detoxification in safened plants is widely accepted as the major mechanism involved in safener action. Safeners induce cofactors such as glutathione and herbicide-detoxifying enzymes such as glutathione *S*-transferases, cytochrome P450 monooxygenases, and glucosyl transferases. Hatzios KK, Burgos N (2004) "Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners," *Weed Science*: Vol. 52, No. 3 pp. 454-467.

[00143] Use of a cytochrome p450 monooxygenase gene stacked with AAD-12 is one preferred embodiment. There are P450s involved in herbicide metabolism; cP450 can be of mammalian or plant origin, for example. In higher plants, cytochrome P450 monooxygenase (P450) is known to conduct secondary metabolism. It also plays an important role in the oxidative metabolism of xenobiotics in cooperation with NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (reductase). Resistance to some herbicides has been reported as a result of the metabolism by P450 as well as glutathione *S*-transferase. A number of microsomal P450

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

[00144] One preferred embodiment of the foregoing is the use cP450 for resistance to acetochlor (acetochlor-based products include Surpass®, Keystone®, Keystone LA, FulTime® and TopNotch® herbicides) and/or trifluralin (such as Treflan®). Such resistance in soybeans and/or corn is included in some preferred embodiments. For additional guidance regarding such embodiments, *see e.g.* Inui *et al.*, "A selectable marker using cytochrome P450 monooxygenases for Arabidopsis transformation," *Plant Biotechnology* 22, 281–286 (2005) (relating to a selection system for transformation of *Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium tumefaciens* that uses human cytochrome P450 monooxygenases that metabolize herbicides; herbicide tolerant seedlings were transformed and selected with the herbicides acetochlor, amiprofos-methyl, chlorpropham, chlorsulfuron, norflurazon, and pendimethalin); Siminszky *et al.*, "Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides," *PNAS* Vol. 96, Issue 4, 1750-1755, February 16, 1999; Sheldon *et al.*, *Weed Science*: Vol. 48, No. 3, pp. 291–295, "A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*"; and "Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19," *J Agric Food Chem.* 2006 Apr 19;54(8):2985-91 (relating to testing a human cytochrome p450 monooxygenase in rice where the rice plants reportedly showed high tolerance to chloroacetomides (acetochlor, alachlor, metoachlor, pretilachlor, and thenylchlor), oxyacetamides (mefenacet), pyridazinones (norflurazon), 2,6-dinitroanilines (trifluralin and pendimethalin), phosphamidates (amiprofos-methyl, thiocarbamates (pyributicarb), and ureas (chlortoluron)).

[00145] There is also the possibility of altering or using different 2,4-D chemistries to make the subject AAD-12 genes more efficient. Such possible changes include creating better substrates and better leaving groups (higher electronegativity).

[00146] Auxin transport inhibitors (e.g. diflufenzopyr) can also be used to increase herbicide activity with 2,4-D.

[00147] Unless specifically indicated or implied, the terms “a”, “an”, and “the” signify “at least one” as used herein.

[00148] All patents, patent applications, provisional applications, and publications referred to or cited herein are incorporated by reference in their entirety to the extent they are not inconsistent with the explicit teachings of this specification.

[00149] Following are examples that illustrate procedures for practicing the invention. These examples should not be construed as limiting. All percentages are by weight and all solvent mixture proportions are by volume unless otherwise noted.

Example 1 – Method for Identifying Genes That Impart Resistance to 2,4-D *In Planta*

[00150] As a way to identify genes which possess herbicide degrading activities *in planta*, it is possible to mine current public databases such as NCBI (National Center for Biotechnology Information). To begin the process, it is necessary to have a functional gene sequence already identified that encodes a protein with the desired characteristics (*i.e.*, α -ketoglutarate dioxygenase activity). This protein sequence is then used as the input for the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) algorithm to compare against available NCBI protein sequences deposited. Using default settings, this search returns upwards of 100 homologous protein sequences at varying levels. These range from highly identical (85-98%) to very low identity (23-32%) at the amino acid level. Traditionally only sequences with high homology would be expected to retain similar properties to the input sequence. In this case, only sequences with $\leq 50\%$ homology were chosen. As exemplified herein, cloning and recombinantly expressing homologues with as little as 31% amino acid conservation (relative to *tfdA* from *Ralstonia eutropha*) can be used to impart commercial levels of resistance not only to the intended herbicide, but also to substrates never previously tested with these enzymes.

[00151] A single gene (*sdpA*) was identified from the NCBI database (*see* the ncbi.nlm.nih.gov website; accession #AF516752) as a homologue with only 31% amino acid identity to *tfdA*. Percent identity was determined by first translating both the *sdpA* and *tfdA* DNA sequences deposited in the database to proteins, then using ClustalW in the VectorNTI software package to perform the multiple sequence alignment.

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

[00152] 2.1 – Background.

[00153] To obtain higher levels of expression of heterologous genes in plants, it may be preferred to reengineer the protein encoding sequence of the genes so that they are more efficiently expressed in plant cells. Maize is one such plant where it may be preferred to redesign the heterologous protein coding region prior to transformation to increase the expression level of the gene and the level of encoded protein in the plant. Therefore, an additional step in the design of genes encoding a bacterial protein is reengineering of a heterologous gene for optimal expression.

[00154] One reason for the reengineering of a bacterial protein for expression in maize is due to the non-optimal G+C content of the native gene. For example, the very low G+C content of many native bacterial gene(s) (and consequent skewing towards high A+T content) results in the generation of sequences mimicking or duplicating plant gene control sequences that are known to be highly A+T rich. The presence of some A+T-rich sequences within the DNA of gene(s) introduced into plants (*e.g.*, TATA box regions normally found in gene promoters) may result in aberrant transcription of the gene(s). On the other hand, the presence of other regulatory sequences residing in the transcribed mRNA (*e.g.*, polyadenylation signal sequences (AAUAAA), or sequences complementary to small nuclear RNAs involved in pre-mRNA splicing) may lead to RNA instability. Therefore, one goal in the design of genes encoding a bacterial protein for maize expression, more preferably referred to as plant optimized gene(s), is to generate a DNA sequence having a higher G+C content, and preferably one close to that of maize genes coding for metabolic enzymes. Another goal in the design of the plant optimized gene(s) encoding a bacterial protein is to generate a DNA sequence in which the sequence modifications do not hinder translation.

[00155] **Table 3** illustrates how high the G+C content is in maize. For the data in **Table 3**, coding regions of the genes were extracted from GenBank (Release 71) entries, and base compositions were calculated using the MacVector™ program (Accelrys, San Diego, California). Intron sequences were ignored in the calculations.

Table 3: Compilation of G + C contents of protein coding regions of maize genes		
Protein Class ^a	Range % G + C	Mean % G + C ^b
Metabolic Enzymes (76)	44.4-75.3	59.0 (±.8.0)
Structural Proteins (18)	48.6-70.5	63.6 (±.6.7)
Regulatory Proteins (5)	57.2-68.8	62.0 (±.4.9)
Uncharacterized Proteins (9)	41.5-70.3	64.3 (±.7.2)
All Proteins (108)	44.4-75.3	60.8 (±.5.2) ^c

^a Number of genes in class given in parentheses.

^b Standard deviations given in parentheses.

^c Combined groups mean ignored in mean calculation

[00156] Due to the plasticity afforded by the redundancy/degeneracy of the genetic code (*i.e.*, some amino acids are specified by more than one codon), evolution of the genomes in different organisms or classes of organisms has resulted in differential usage of redundant codons. This "codon bias" is reflected in the mean base composition of protein coding regions. For example, organisms with relatively low G+C contents utilize codons having A or T in the third position of redundant codons, whereas those having higher G+C contents utilize codons having G or C in the third position. It is thought that the presence of "minor" codons within an mRNA may reduce the absolute translation rate of that mRNA, especially when the relative abundance of the charged tRNA corresponding to the minor codon is low. An extension of this is that the diminution of translation rate by individual minor codons would be at least additive for multiple minor codons. Therefore, mRNAs having high relative contents of minor codons would have correspondingly low translation rates. This rate would be reflected by subsequent low levels of the encoded protein.

[00157] In engineering genes encoding a bacterial protein for maize (or other plant, such as cotton or soybean) expression, the codon bias of the plant has been determined. The codon bias for maize is the statistical codon distribution that the plant uses for coding its proteins and the preferred codon usage is shown in **Table 4**. After determining the bias, the percent frequency of the codons in the gene(s) of interest is determined. The primary codons preferred by the plant should be determined, as well as the second, third, and fourth choices of preferred codons when multiple choices exist. A new DNA sequence can then be designed which encodes the amino sequence of the bacterial protein, but the new DNA sequence differs from the native bacterial DNA sequence (encoding the protein) by the substitution of the plant (first preferred, second preferred, third preferred, or fourth preferred) codons to specify the amino acid at each position within the protein amino acid sequence. The new

sequence is then analyzed for restriction enzyme sites that might have been created by the modification. The identified sites are further modified by replacing the codons with first, second, third, or fourth choice preferred codons. Other sites in the sequence which could affect transcription or translation of the gene of interest are the exon:intron junctions (5' or 3'), poly A addition signals, or RNA polymerase termination signals. The sequence is further analyzed and modified to reduce the frequency of TA or GC doublets. In addition to the doublets, G or C sequence blocks that have more than about four residues that are the same can affect transcription of the sequence. Therefore, these blocks are also modified by replacing the codons of first or second choice, *etc.* with the next preferred codon of choice.

Table 4. Preferred amino acid codons for proteins expressed in maize

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

[00158] It is preferred that the plant optimized gene(s) encoding a bacterial protein contain about 63% of first choice codons, between about 22% to about 37% second choice codons, and between about 15% to about 0% third or fourth choice codons, wherein the total percentage is 100%. Most preferred the plant optimized gene(s) contains about 63% of first choice codons, at least about 22% second choice codons, about 7.5% third choice codons, and

about 7.5% fourth choice codons, wherein the total percentage is 100%. The method described above enables one skilled in the art to modify gene(s) that are foreign to a particular plant so that the genes are optimally expressed in plants. The method is further illustrated in PCT application WO 97/13402.

[00159] Thus, in order to design plant optimized genes encoding a bacterial protein, a DNA sequence is designed to encode the amino acid sequence of said protein utilizing a redundant genetic code established from a codon bias table compiled from the gene sequences for the particular plant or plants. The resulting DNA sequence has a higher degree of codon diversity, a desirable base composition, can contain strategically placed restriction enzyme recognition sites, and lacks sequences that might interfere with transcription of the gene, or translation of the product mRNA. Thus, synthetic genes that are functionally equivalent to the proteins/genes of the subject invention can be used to transform hosts, including plants. Additional guidance regarding the production of synthetic genes can be found in, for example, U.S. Patent No. 5,380,831.

[00160] 2.2 – AAD-12 Plant rebuild analysis.

[00161] Extensive analysis of the 876 base pairs (bp) of the DNA sequence of the native *AAD-12* coding region (SEQ ID NO:1) revealed the presence of several sequence motifs that are thought to be detrimental to optimal plant expression, as well as a non-optimal codon composition. The protein encoded by SEQ ID NO:1 (*AAD-12*) is presented as SEQ ID NO:2. To improve production of the recombinant protein in monocots as well as dicots, a “plant-optimized” DNA sequence *AAD-12 (v1)* (SEQ ID NO:3) was developed that encodes a protein (SEQ ID NO:4) which is the same as the native SEQ ID NO:2 except for the addition of an alanine residue at the second position (underlined in SEQ ID NO:4). The additional alanine codon (GCT; underlined in SEQ ID NO:3) encodes part of an *NcoI* restriction enzyme recognition site (CCATGG) spanning the ATG translational start codon. Thus, it serves the dual purpose of facilitating subsequent cloning operations while improving the sequence context surrounding the ATG start codon to optimize translation initiation. The proteins encoded by the native and plant-optimized (v1) coding regions are 99.3% identical, differing only at amino acid number 2. In contrast, the native and plant-optimized (v1) DNA sequences of the coding regions are only 79.7% identical. **Table 5** shows the differences in codon compositions of the native (Columns A and D) and plant-optimized sequences

(Columns B and E), and allows comparison to a theoretical plant-optimized sequence (Columns C and F).

Table 5. Codon composition comparisons of coding regions of Native AAD-12, Plant-Optimized version (v1) and a Theoretical Plant-Optimized version.									
		A	B	C			D	E	F
Amino Acid	Codon	Native #	Plant Opt v1 #	Theor. Plant Opt. #	Amino Acid	Codon	Native #	Plant Opt v1 #	Theor. Plant Opt. #
ALA (A)	GCA	1	10	11	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	35	16	15		CTC	1	8	8
	GCG	7	0	0		CTG	23	0	0
	GCT	0	18	17		CTT	0	8	8
ARG (R)	AGA	0	4	5	LYS (K)	TTA	0	0	0
	AGG	0	4	6		TTG	0	8	8
	CGA	0	0	0		AAA	1	1	2
	CGC	15	6	4	MET (M)	AAG	5	5	4
	CGG	3	0	0		ATG	10	10	10
ASN (N)	CGT	0	4	3	PHE (F)	TTC	7	5	5
	AAC	3	2	2		TTT	1	3	3
ASP (D)	AAT	1	2	2	PRO (P)	CCA	0	5	6
	GAC	15	9	9		CCC	9	4	4
CYS (C)	GAT	2	8	8		CCG	5	0	0
	TGC	3	2	2		CCT	0	5	5
END	TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	5	4	3
	TAA	1	0	1		AGT	0	0	0
	TAG	0	0			TCA	0	3	3
	TGA	0	1			TCC	2	3	3
GLN (Q)	CAA	1	8	7		TCG	6	0	0
	CAG	13	6	7		TCT	0	3	3
GLU (E)	GAA	3	4	4	THR (T)	ACA	1	4	5
	GAG	8	7	7		ACC	11	7	7
GLY (G)	GGA	0	8	7		ACG	5	0	0
	GGC	24	7	7		ACT	1	7	6
	GGG	1	3	4	TRP (W)	TGG	8	8	8
	GGT	0	7	7		TAC	4	3	3
HIS (H)	CAC	8	9	9	TYR (Y)	TAT	1	2	2
	CAT	8	7	7	VAL (V)	GTA	0	0	0
ILE (I)	ATA	0	2	2		GTC	6	8	7
	ATC	10	4	5		GTG	18	8	9
	ATT	1	5	4		GTT	0	8	8
	Totals	163	164	163		Totals	130	130	130

[00162]

It is clear from examination of Table 5 that the native and plant-optimized coding regions, while encoding nearly identical proteins, are substantially different from one another. The Plant-Optimized version (v1) closely mimics the codon composition of a theoretical plant-optimized coding region encoding the AAD-12 protein.

[00163] 2.3 Rebuild for *E. coli* Expression

[00164] Specially engineered strains of *Escherichia coli* and associated vector systems are often used to produce relatively large amounts of proteins for biochemical and analytical studies. It is sometimes found that a native gene encoding the desired protein is not well suited for high level expression in *E. coli*, even though the source organism for the gene may be another bacterial genus. In such cases it is possible and desirable to reengineer the protein coding region of the gene to render it more suitable for expression in *E. coli*. *E. coli* Class II genes are defined as those that are highly and continuously expressed during the exponential growth phase of *E. coli* cells. (Henaut, A. and Danchin, A. (1996) in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology*, vol. 2, pp. 2047–2066. Neidhardt, F., Curtiss III, R., Ingraham, J., Lin, E., Low, B., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H. (eds.) American Society for Microbiology, Washington, DC). Through examination of the codon compositions of the coding regions of *E. coli* Class II genes, one can devise an average codon composition for these *E. coli*-Class II gene coding regions. It is thought that a protein coding region having an average codon composition mimicking that of the Class II genes will be favored for expression during the exponential growth phase of *E. coli*. Using these guidelines, a new DNA sequence that encodes the AAD-12 protein (SEQ ID NO:4); including the additional alanine at the second position, as mentioned above), was designed according to the average codon composition of *E. coli* Class II gene coding regions. The initial sequence, whose design was based only on codon composition, was further engineered to include certain restriction enzyme recognition sequences suitable for cloning into *E. coli* expression vectors. Detrimental sequence features such as highly stable stemloop structures were avoided, as were intragenic sequences homologous to the 3' end of the 16S ribosomal RNA (*i.e.* Shine Dalgarno sequences) The *E. coli*-optimized sequence (v2) is disclosed as SEQ ID NO:5 and encodes the protein disclosed in SEQ ID NO:4.

[00165] The native and *E. coli*-optimized (v2) DNA sequences are 84.0% identical, while the plant-optimized (v1) and *E. coli*-optimized (v2) DNA sequences are 76.0% identical. Table 6 presents the codon compositions of the native *AAD-12* coding region (Columns A and D), an *AAD-12* coding region optimized for expression in *E. coli* (v2; Columns B and E) and the codon composition of a theoretical coding region for the AAD-12 protein having an optimal codon composition of *E. coli* Class II genes (Columns C and F).

Table 6. Codon composition comparisons of coding regions of Native *AAD-12*, *E. coli*-Optimized version (v2) and a Theoretical *E. coli* Class II-Optimized version.

		A	B	C			D	E	F
Amino Acid	Codon	Native #	<i>E. coli</i> Opt v2 #	Theor. Class II #	Amino Acid	Codon	Native #	<i>E. coli</i> Opt v2 #	Theor. Class II #
ALA (A)	GCA	1	13	13	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	35	0	0		CTC	1	2	0
	GCG	7	18	17		CTG	23	20	24
	GCT	0	13	14		CTT	0	1	0
ARG (R)	AGA	0	0	0		TTA	0	1	0
	AGG	0	0	0		TTG	0	0	0
	CGA	0	0	0	LYS (K)	AAA	1	4	5
	CGC	15	6	6		AAG	5	2	1
	CGG	3	0	0	MET (M)	ATG	10	10	10
	CGT	0	12	12	PHE (F)	TTC	7	6	6
ASN (N)	AAC	3	4	4		TTT	1	2	2
	AAT	1	0	0	PRO (P)	CCA	0	3	2
ASP (D)	GAC	15	10	9		CCC	9	0	0
	GAT	2	7	8		CCG	5	11	12
CYS (C)	TGC	3	2	2		CCT	0	0	0
	TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	5	4	4
END	TAA	1	1	1		AGT	0	0	0
	TAG	0	0	0		TCA	0	0	0
	TGA	0	0	0		TCC	2	5	4
GLN (Q)	CAA	1	3	3		TCG	6	0	0
	CAG	13	11	11		TCT	0	4	5
GLU (E)	GAA	3	8	8	THR (T)	ACA	1	0	0
	GAG	8	3	3		ACC	11	12	12
GLY (G)	GGA	0	0	0		ACG	5	0	0
	GGC	24	12	11		ACT	1	6	6
	GGG	1	0	0	TRP (W)	TGG	8	8	8
	GGT	0	13	14	TYR (Y)	TAC	4	3	3
HIS (H)	CAC	8	11	11		TAT	1	2	2
	CAT	8	5	5	VAL (V)	GTA	0	6	6
ILE (I)	ATA	0	0	0		GTC	6	0	0
	ATC	10	7	7		GTG	18	8	7
	ATT	1	4	4		GTT	0	10	11
	Totals	163	164	164		Totals	130	130	130

It is clear from examination of Table 6 that the native and *E. coli*-optimized coding regions, while encoding nearly identical proteins, are substantially different from one another. The *E. coli*-Optimized version (v2) closely mimics the codon composition of a theoretical *E. coli*-optimized coding region encoding the AAD-12 protein.

2.4 – Design of a soybean-codon-biased DNA sequence encoding a soybean EPSPS having mutations that confer glyphosate tolerance. This example teaches the design of a new DNA sequence that encodes a mutated soybean 5-enolpyruvoylshikimate 3-phosphate

synthase (EPSPS), but is optimized for expression in soybean cells. The amino acid sequence of a triply-mutated soybean EPSPS is disclosed as SEQ ID NO:5 of WO 2004/009761. The mutated amino acids in the so-disclosed sequence are at residue 183 (threonine of native protein replaced with isoleucine), residue 186 (arginine in native protein replaced with lysine), and residue 187 (proline in native protein replaced with serine). Thus, one can deduce the amino acid sequence of the native soybean EPSPS protein by replacing the substituted amino acids of SEQ ID NO:5 of WO 2004/009761 with the native amino acids at the appropriate positions. Such native protein sequence is disclosed as SEQ ID NO:20 of PCT/US2005/014737 (filed May 2, 2005). A doubly mutated soybean EPSPS protein sequence, containing a mutation at residue 183 (threonine of native protein replaced with isoleucine), and at residue 187 (proline in native protein replaced with serine) is disclosed as SEQ ID NO:21 of PCT/US2005/014737.

[00168]

A codon usage table for soybean (*Glycine max*) protein coding sequences, calculated from 362,096 codons (approximately 870 coding sequences), was obtained from the "kazusa.or.jp/codon" World Wide Web site. Those data were reformatted as displayed in Table 7. Columns D and H of Table 7 present the distributions (in % of usage for all codons for that amino acid) of synonymous codons for each amino acid, as found in the protein coding regions of soybean genes. It is evident that some synonymous codons for some amino acids (an amino acid may be specified by 1, 2, 3, 4, or 6 codons) are present relatively rarely in soybean protein coding regions (for example, compare usage of GCG and GCT codons to specify alanine). A biased soybean codon usage table was calculated from the data in Table 7. Codons found in soybean genes less than about 10% of total occurrences for the particular amino acid were ignored. To balance the distribution of the remaining codon choices for an amino acid, a weighted average representation for each codon was calculated, using the formula:

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

where C1 is the codon in question, C2, C3, etc. represent the remaining synonymous codons, and the % values for the relevant codons are taken from columns D and H of Table 7 (ignoring the rare codon values in bold font). The Weighted % value for each codon is given in Columns C and G of Table 7. TGA was arbitrarily chosen as the translation terminator. The biased codon usage frequencies were then entered into a specialized genetic code table

for use by the OptGene™ gene design program (Ocimum Biosolutions LLC, Indianapolis, Indiana).

Table 7. Synonymous codon representation in soybean protein coding sequences, and calculation of a biased codon representation set for soybean-optimized synthetic gene design.							
A	B	C	D	E	F	G	H
Amino Acid	Codon	Weighted %	Soybean %	Amino Acid	Codon	Weighted %	Soybean %
ALA (A)	GCA	33.1	30.3	LEU (L)	CTA	DNU	9.1
	GCC	24.5	22.5		CTC	22.4	18.1
	GCG	DNU*	8.5		CTG	16.3	13.2
	GCT	42.3	38.7		CTT	31.5	25.5
ARG (R)	AGA	36.0	30.9		TTA	DNU	9.8
	AGG	32.2	27.6		TTG	29.9	24.2
	CGA	DNU	8.2	LYS (K)	AAA	42.5	42.5
	CGC	14.8	12.7		AAG	57.5	57.5
	CGG	DNU	6.0	MET (M)	ATG	100.0	100
	CGT	16.9	14.5		PHE (F)	TTC	49.2
ASN (N)	AAC	50.0	50.0	PRO (P)	TTT	50.8	50.8
	AAT	50.0	50.0		CCA	39.8	36.5
ASP (D)	GAC	38.1	38.1		CCC	20.9	19.2
	GAT	61.9	61.9		CCG	DNU	8.3
CYS (C)	TGC	50.0	50.0	SER (S)	CCT	39.3	36.0
	TGT	50.0	50.0		AGC	16.0	15.1
END	TAA	DNU	40.7		AGT	18.2	17.1
	TAG	DNU	22.7		TCA	21.9	20.6
	TGA	100.0	36.6		TCC	18.0	16.9
GLN (Q)	CAA	55.5	55.5		TCG	DNU	6.1
	CAG	44.5	44.5		TCT	25.8	24.2
GLU (E)	GAA	50.5	50.5	THR (T)	ACA	32.4	29.7
	GAG	49.5	49.5		ACC	30.2	27.7
GLY (G)	GGA	31.9	31.9		ACG	DNU	8.3
	GGC	19.3	19.3		ACT	37.4	34.3
	GGG	18.4	18.4	TRP (W)	TGG	100.0	100
	GGT	30.4	30.4		TYR (Y)	TAC	48.2
HIS (H)	CAC	44.8	44.8	VAL (V)	TAT	51.8	51.8
	CAT	55.2	55.2		GTA	11.5	11.5
ILE (I)	ATA	23.4	23.4		GTC	17.8	17.8
	ATC	29.9	29.9		GTG	32.0	32.0
	ATT	46.7	46.7		GTT	38.7	38.7

*DNU = Do Not Use

[00169] To derive a soybean-optimized DNA sequence encoding the doubly mutated EPSPS protein, the protein sequence of SEQ ID NO:21 from PCT/US2005/014737 was reverse-translated by the OptGene™ program using the soybean-biased genetic code derived above. The initial DNA sequence thus derived was then modified by compensating codon changes (while retaining overall weighted average representation for the codons) to reduce the numbers of CG and TA doublets between adjacent codons, increase the numbers of CT and TG doublets between adjacent codons, remove highly stable intrastrand secondary structures, remove or add restriction enzyme recognition sites, and to remove other sequences that might be detrimental to expression or cloning manipulations of the engineered gene. Further refinements of the sequence were made to eliminate potential plant intron splice sites, long runs of A/T or C/G residues, and other motifs that might interfere with RNA stability, transcription, or translation of the coding region in plant cells. Other changes were made to eliminate long internal Open Reading Frames (frames other than +1). These changes were all made within the constraints of retaining the soybean-biased codon composition as described above, and while preserving the amino acid sequence disclosed as SEQ ID NO:21 of PCT/US2005/014737.

[00170] The soybean-biased DNA sequence that encodes the EPSPS protein of SEQ ID NO:21 is disclosed as bases 1-1575 of SEQ ID NO:22 of PCT/US2005/014737. Synthesis of a DNA fragment comprising SEQ ID NO:22 of PCT/US2005/014737 was performed by a commercial supplier (PicoScript, Houston TX).

Example 3-Cloning of expression and transformation vectors

[00171] 3.1 Construction of E.coli, pET expression vector.

[00172] Using the restriction enzymes corresponding to the sites added with the additional cloning linkers (Xba 1, Xho 1) *AAD-12* (v2) was cut out of the picoscript vector, and ligated into a pET280 streptomycin/spectinomycin resistant vector. Ligated products were then transformed into TOP10F' *E. coli*, and plated on to Luria Broth + 50 µg/ml Streptomycin & Spectinomycin (LB S/S) agar plates.

[00173] To differentiate between *AAD-12* (v2) : pET280 and pCR2.1 : pET280 ligations, approximately 20 isolated colonies were picked into 6 ml of LB-S/S, and grown at 37° C for 4 hours with agitation. Each culture was then spotted onto LB + Kanamycin 50 µg/ml plates, which were incubated at 37° C overnight. Colonies that grew on the LB-K were assumed to

have the pCR2.1 vector ligated in, and were discarded. Plasmids were isolated from the remaining cultures as before, and checked for correctness with digestion by XbaI / XhoI. The final expression construct was given the designation pDAB3222.

[00174] 3.2- Construction of *Pseudomonas* expression vector

[00175] The *AAD-12* (v2) open reading frame was initially cloned into the modified pET expression vector (Novagen), "pET280 S/S", as an XbaI – XhoI fragment. The resulting plasmid pDAB725 was confirmed with restriction enzyme digestion and sequencing reactions. The *AAD-12* (v2) open reading frame from pDAB725 was transferred into the *Pseudomonas* expression vector, pMYC1803, as an XbaI – XhoI fragment. Positive colonies were confirmed via restriction enzyme digestion. The completed construct pDAB739 was transformed into the MB217 and MB324 *Pseudomonas* expression strains.

[00176] 3.3 – Completion of binary vectors.

[00177] The plant optimized gene *AAD-12* (v1) was received from Picoscript (the gene rebuild design was completed (see above) and out-sourced to Picoscript for construction) and sequence verified (SEQ ID NO:3) internally, to confirm that no alterations of the expected sequence were present. The sequencing reactions were carried out with M13 Forward (SEQ ID NO:6) and M13 Reverse (SEQ ID NO:7) primers using the Beckman Coulter "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" reagents as before. Sequence data was analyzed and results indicated that no anomalies were present in the plant optimized *AAD-12* (v1) DNA sequence. The *AAD-12* (v1) gene was cloned into pDAB726 as an Nco I – Sac I fragment. The resulting construct was designated pDAB723, containing: [AtUbi10 promoter: Nt OSM 5'UTR: *AAD-12* (v1): Nt OSM3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR] (verified with a PvuII and a Not I restriction digests). A Not I-Not I fragment containing the described cassette was then cloned into the Not I site of the binary vector pDAB3038. The resulting binary vector, pDAB724, containing the following cassette [AtUbi10 promoter: Nt OSM5'UTR: *AAD-12* (v1): Nt OSM 3'UTR: ORF1 polyA 3'UTR: CsVMV promoter: *PAT*: ORF25/26 3'UTR] was restriction digested (with Bam HI, Nco I, Not I, SacI, and Xmn I) for verification of the correct orientation. The verified completed construct (pDAB724) was used for transformation into *Agrobacterium* (see section 7.2).

[00178] 3.4 - Cloning of additional transformation constructs.

[00179] All other constructs created for transformation into appropriate plant species were built using similar procedures as previously described herein, and other standard molecular

cloning methods (Maniatis *et al.*, 1982). **Table 8** lists all the transformation constructs used with appropriate promoters and features defined, as well as the crop transformed.

Table 8. Binary constructs used in transformation of various plant species.

pDAB #	pDAS #	Species * Transformed into	Gene of interest (GOI)	Promoter	Feature 1	Feature 2	GOI 2	Promoter	Bacterial Selection gene	Bacterial Selection gene 2	Plant Selection gene	Promoter	Trxn Method
724	-	A, Ct, S	AAD12 v1	AtUbi10	NtOsm	-	-	-	Erythromycin	-	pat	CsVMV	Agro binary
3274	-	A	AAD12 v1	AtUbi10	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	-	-	Agro binary
3278	1580	T	AAD12 v1	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	pat	AtUbi10	Agro binary
3285	-	A	AAD12 v1	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	pat	AtUbi10	Agro binary
3759	-	A, Ca, S	AAD12 v1	CsVMV	NtOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Spectinomycin	-	pat	AtUbi10	Agro binary
4101	1863	Cn, R	AAD12 v1	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicillin	-	AHAS v3	OsAct1	Whiskers / Gun
4464	-	S	AAD12 v1	CsVMV	-	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	pat	CsVMV	Agro binary
4468	-	S	AAD12 v1	AtUbi10	-	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	pat	CsVMV	Agro binary
4472	-	S	AAD12 v1	AtUbi3	-	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	pat	CsVMV	Agro binary
4476	-	S	AAD12 v1	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	pat	CsVMV	Agro binary
4480	-	S	AAD12 v1	AtAct2	-	RB7 Mar v2	-	-	Spectinomycin	-	pat	CsVMV	Agro binary

*A = *Arabidopsis*

T = Tobacco

S = Soybean

Ct = Cotton

R = Rice

Cn = Corn

Ca = Canola

CsVMV = Cassava Vein Mosaic Virus Promoter

AtUbi10 = *Arabidopsis thaliana* Ubiquitin 10 PromoterAtUbi3 = *Arabidopsis thaliana* Ubiquitin 3 PromoterAtAct2 = *Arabidopsis thaliana* Actin 2 PromoterRB7 Mar v2 = *Nicotiana tabacum* matrix associated region (MAR)Nt Osm = *Nicotiana tabacum* Osmotin 5' Untranslated Region and the *Nicotiana tabacum* Osmotin 3' Untranslated RegionZmUbi1 = *Zea mays* Ubiquitin 1 Promoter

HptII = hygromycin phosphotransferase

Example 4 - Recombinant AAD-12 (v2) Expression and Purification in *Pseudomonas fluorescens*

[00180] 4.1- *Pseudomonas fluorescens* fermentation

[00181] For shake flask experiment, 200 μ l of *Pseudomonas fluorescens* strain MB324 glycerol stock carried AAD-12 (v2) construct pDAB739 (sec 3.2) was used to inoculate 50 ml fresh LB media supplemented with 30 μ g/ml tetracycline/HCl. The culture (in a 250 ml baffled Erlenmeyer flask) was incubated on a shaker (New Brunswick Scientific Model Innova 44) at 300 rpm and 30 °C for 16 hrs. 20 ml of seed culture was transferred into 1 L *Pseudomonas fluorescens* culture media (Yeast extract, 5 g/L; K₂HPO₄, 5 g/L; (NH₄)₂PO₄, 7.5 g/L; (NH₄)₂SO₄; MgSO₄-7H₂O, 1 g/L; KCl, 0.5 g/L; CaCl₂-2H₂O, 0.5 g/L; NaCitrate-2H₂O, 15 g/L; Glycerol, 95 g/L; Trace element solution, 10 ml/L; Trace element solution: FeCl₃-6H₂O, 5.4 g/L; MnCl₂-4H₂O, 1 g/L; ZnSO₄-7H₂O, 1.45 g/L; CuSO₄-5H₂O, 0.25 g/L; H₃BO₃, 0.1 g/L; (NH₄)₆MO₇O₂₄, 0.1 g/L; concentrated HCl, 13 ml/L) supplemented with 20 μ g/ml tetracycline/HCl and 250 μ l of Pluronic L61(anti-foam) in a 2.8 L baffled Erlenmeyer flask. The cultures were incubated at 30 °C and 300 rpm for 24 hrs. Isopropyl β -D-1-thiogalacto-pyranoside (IPTG) was added to 1 mM final in the cultures and continued to incubate for approximately 48 hrs at 25 °C. Cells were harvested by centrifugation at 7 krpm at 4 °C for 15 min, and cell paste was stored at -80 °C or immediately processed for purification.

[00182] For tank experiments, 1 ml each of the glycerol stock was inoculated a 1 L baffled flask containing 200 ml of LB media supplemented with 30 μ g/ml tetracycline/HCl at 300 rpm and 32 °C for 16-24 hrs. The combined culture from three flasks (600 ml) was then aseptically transferred to a 20 L fermentor (B. Braun Bioreactor Systems) containing 10 L of Dow proprietary defined medium (through Teknova, Hollister, CA) designed to support high cell density growth. Growth temperature was maintained at 32 °C and the pH was controlled at the desired set-point through the addition of aqueous ammonia. Dissolved oxygen was maintained at a positive level in the liquid culture by regulating the sparged air flow and the agitation rates. The fed-batch fermentation process was carried out for approximately 24 hrs till cell density reached 170-200 OD₅₇₅. IPTG was added to 1 mM to induce the recombinant protein expression and the temperature was reduced and maintained to 25 °C using circulation of cold-water supply. The induction phase of the fermentation was allowed to continue for another 24 hrs. Samples (30 ml) were collected for various analyses to determine cell density

and protein expression level at 6, 12, and 18 hrs post-induction time points. At the end of a fermentation run, cells were harvested by centrifugation at 10 krpm for 30 min. The cell pellets were frozen at -80 °C for further processing.

[00183] 4.2- Purification of AAD-12 (v2) for Biochemical Characterization and Antibody Production

[00184] Approximately 100-200 g of frozen (or fresh) *Pseudomonas* cells were thawed and resuspended in 1-2 L of extraction buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.5, and 25 ml of Protease inhibitor cocktail (Sigma cat# P8465). The cells were disrupted using Microfluidizer (model M110L or 110Y) (Microfluidics, Newton, MA) on ice with one pass at 11,000-12,000 psi. The lysate was centrifuged at 24,000 rpm for 20 min. The supernatant was transferred and dialyzed against 10 volumes of 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 overnight at 4 °C, or diafiltrated with this buffer and filtered through a 0.45 µm membrane before applying to the column separations. All subsequent protein separations were performed using Pharmacia AKTA Explorer 100 and operated at 4 °C. Prior to loading, a Q Sepharose Fast Flow column (Pharmacia XK 50/00, 500 ml bed size) was equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 buffer. The sample was applied to the column at 15 ml/min and then washed with this buffer until the eluate OD₂₈₀ returned to baseline. Proteins were eluted with 2 L of linear gradient from 0 to 0.3 M NaCl at a flow rate of 15 ml/min, while 45 ml fractions were collected. Fractions containing AAD-12 activity as determined by the colorimetric enzyme assay and also corresponding to the predicted molecular weight of AAD-12 protein (about 32 kDa band on SDS-PAGE) were pooled. Solid ammonium sulfate to final 0.5 M was added to the sample, and then applied to a Phenyl HP column (Pharmacia XK 50/20, 250 ml bed size) equilibrated in 0.5 M ammonium sulfate in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. This column was washed with the binding buffer at 10 ml/min until the OD₂₈₀ of the eluate returned to baseline, proteins were eluted within 2 column volumes at 10 ml/min by a linear gradient from 0.5 M to 0 Ammonium sulfate in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 12.5 ml fractions were collected. The main peak fractions containing AAD-12 were pooled, and if necessary, concentrated using a MWCO 10 kDa cut-off membrane centrifugal filter device (Millipore). In some cases the sample was further applied to a Superdex 75 gel filtration column (Pharmacia XK 16/60, 110 ml bed size) with PBS buffer at a flow rate of 1 ml/min. Peak fractions containing pure AAD-12 were pooled and stored at -80 °C. In most cases, AAD-12 protein purity is approaching or above 99% after sequential ion-exchange column and

hydrophobic interaction column two-step separation. A typical yield for purified AAD-12 is 12-18 mg/g of wet cells. Bulk protein sample was formulated in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 2 mM DTT, and 1% Trehalose by diafiltration, and lyophilized on the Virtis Freezemobile Model 25EL (Virtis, Cardiner, NY) for long-term storage.

[00185] Protein concentration was initially measured by Bradford assay using Bio-Rad Protein assay kit (cat# 500-0006) with bovine serum albumin as standard. When needed, more accurate protein concentration was determined by using total amino acid hydrolysis. The sample was analyzed in Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) with amino acid calibration standards (cat# PN5061-3330) purchased from Agilent.

[00186] AAD-12 activity was determined through out the processes to ensure no loss of the enzyme activity by each treatment and manipulation, as described in the Example 5 below. Protein purity was monitored by using SDS-PAGE and analytical size exclusion chromatography. Purified protein sample was further verified and confirmed by N-terminal amino acid sequencing, and shown consisting of expected AQTTLQITPT residues at its N-terminus. Short and long-term protein stability was tested by enzymatic activity and by native-PAGE and SDS-PAGE gel analysis under both non-reducing and reducing conditions. And it was noticed that AAD-12 is prone to oligomerization via disulfide bond formation, therefore typically 2 mM DTT was used for protein storage. Phosphate-buffer saline (PBS) and Tris-buffer saline (TBS) were tested for protein lyophilization, with and without the presence of 1% trehalose. Additionally, the endotoxin and DNA contaminant context from purified sample were measured respectively, and the integrity of the AAD-12 protein was also assessed by isoelectric focusing (IEF) analysis.

[00187] Ten milligrams of purified AAD-12 (v2) was delivered to Zymed Laboratories, Inc. (South San Francisco, CA) for rabbit polyclonal antibody production. The rabbit received 5 injections in the period of 5 weeks with each injection containing 0.5 mg of the purified protein suspended in 1 ml of complete Freund's Adjuvant. Sera were tested in both ELISA and Western blotting experiments to confirm specificity and affinity before affinity purification, and horseradish peroxidase (HRP) conjugation (Zymed Lab Inc).

Example 5 – *In vitro* assays of AAD-12 activity

[00188] 5.1 – Assay via colorimetric phenol detection.

[00189] Enzyme activity was measured by colorimetric detection of the product phenol using a protocol modified from that of Fukumori and Hausinger (1993) (*J. Biol. Chem.* 268: 24311-24317) to enable deployment in a 96-well microplate format. The colorimetric assay has been described for use in measuring the activity of dioxygenases cleaving 2,4-D and dichlorprop to release the product 2,4-dichlorophenol. The color yield from several phenols was compared to that of 2,4-dichlorophenol using the detection method previously described to ascertain which phenol products could be readily detected. Phenols and phenol analogs were tested at a final concentration of 100 μM in 0.15 ml 20 mM MOPS pH 6.75 containing 200 μM $\text{NH}_4(\text{FeSO}_4)_2$, 200 μM sodium ascorbate. Pyridinols derived from fluroxypyr and triclopyr produced no significant color. The color yield of 2,4-dichlorophenol was linear and proportional to the concentration of phenol in the assay up to ~ 500 μM . A calibration curve performed under standard assay conditions (160 μl final assay volume) indicated that an absorbance at 510 nm of 0.1 was obtained from 17.2 μM phenol.

[00190] Enzyme assays were performed in a total volume of 0.16 ml 20 mM MOPS pH 6.75 containing 200 μM NH_4FeSO_4 , 200 μM sodium ascorbate, 1 mM α -ketoglutarate, the appropriate substrate (added from a 100 mM stock made up in DMSO), and enzyme. Assays were initiated by addition of the aryloxyalkanoate substrate, enzyme or α -ketoglutarate at time zero. After 5 minutes of incubation at 25° C, the reaction was terminated by addition of 30 μl of a 1:1:1 mix of 50 mM Na EDTA; pH 10 buffer (3.09 g boric acid + 3.73 g KCl + 44 ml 1 N KOH) and 0.2 % 4-aminoantipyrine. Then 10 μl 0.8 % potassium ferricyanide was added and after 5 or 10 min, the absorbance at 510 nm was recorded in a spectrophotometric microplate reader. Blanks contained all reagents except for enzyme to account for the occasional slight contamination of some of the substrates by small amounts of phenols.

[00191] 5.2 – Assay via detection of chloropyridinol

[00192] AAD-12 action on potential substrates such as the herbicide triclopyr containing a substituted pyridine (rather than benzene rings) will release a pyridinol on cleavage of the aryloxyalkanoate bond. Pyridinols were not detected using the aminoantipyrine/ferricyanide phenol detection described in the preceding section. However, it was found that product chloropyridinols absorb strongly in the near UV with λ_{max} of 325 nm at pH 7 (extinction coefficient $\sim 8,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). This was used to create a continuous microplate-based spectrophotometric assay. Assays were performed in a total volume of 0.2 ml 20 mM MOPS pH 6.75 containing 200 μM NH_4FeSO_4 , 200 μM sodium ascorbate, 1 mM α -ketoglutarate,

the appropriate substrate (added from a 100 mM stock made up in DMSO), and enzyme. Assays were initiated by addition of the aryloxyalkanoate substrate, enzyme or α -ketoglutarate at time zero and the increase in absorbance followed for 10 minutes at 325 nm in a microplate reader. The first 2 minutes of the reaction was used to determine initial rates. A calibration curve performed under standard assay conditions (200 μ l final assay volume) indicated that an absorbance at 510 nm of 0.1 was obtained from 11.9 μ M chloropyridinol.

[00193] 5.3 – Colorimetric assay using 2-(2-chloro,4-nitrophenoxy)propionate

[00194] A convenient assay of AAD-12 was devised using 2-(2-chloro,4-nitrophenoxy)propionate (CNPP) as substrate. Cleavage of CNPP by AAD-12 releases 2-chloro,4-nitrophenol. This phenol has a bright yellow absorbance at 410 nm at pH 7 enabling the reaction to be followed continuously or by endpoint analysis. The presence of AAD-12 activity can be monitored visually without the need for addition of further reagents. Microplate-based spectrophotometric assays were performed in a total volume of 0.2 ml 20 mM MOPS pH 6.75 containing 200 μ M NH_4FeSO_4 , 200 μ M sodium ascorbate, 1 mM α -ketoglutarate, the appropriate amount of CNPP (added from a 10 mM stock made up in DMSO), and enzyme. Assays were initiated by addition of CNPP, enzyme, or α -ketoglutarate at time zero and the increase in absorbance followed for 10 min at 410 nm in a microplate reader. The first 2 min of the reaction was used to determine initial rates. A calibration curve performed under standard assay conditions (200 μ l final assay volume) indicated that an absorbance at 410 nm of 0.1 was obtained from 25.1 μ M 2-chloro, 4-nitrophenol. Using this assay, the kinetic constants for CNPP as a substrate were determined to be $K_m = 31 \pm 5.5 \mu\text{M}$ and $k_{\text{cat}} = 16.2 \pm 0.79 \text{ min}^{-1}$.

Example 6 – *In vitro* activity of AAD-12 on various substrates

[00195] 6.1 – AAD-12 (v2) activity on (R,S)- dichlorprop, (R)-dichlorprop, (S)-dichlorprop and 2,4-D

[00196] Using the phenol detection assay described in Example 5.1, four phenoxyalkanoates were assayed in a reaction mix containing 4.4 μ g purified AAD-12 (v2). (R,S)-dichlorprop (R,S-DP) was tested at 1 mM and (R)-dichlorprop, (S)-dichlorprop and 2,4-D were tested at 0.5 mM. The results are shown in **Figure 3**, which illustrates activity of AAD-12 (v2) on 2,4-D and enantiomers of dichlorprop. 4.4 μ g AAD-12 (v2) was incubated with 0.5 mM substrate (1 mM for (R,S)-dichlorprop) and the reaction initiated by addition of α -

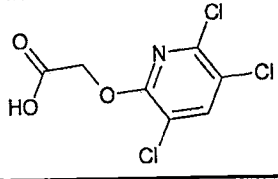
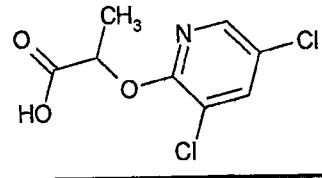
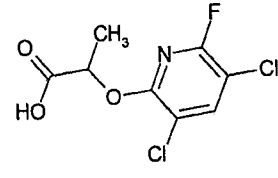
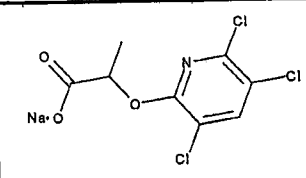
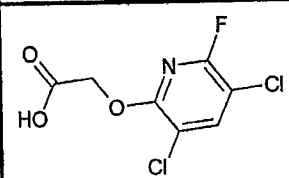
ketoglutarate. After 5 minutes, the reaction was quenched, and the absorbance at 510 nm determined after addition of colorimetric detection reagents. The background value without enzyme was subtracted.

[00197] AAD-12 (v2) has excellent activity on (R,S)-dichlorprop and (S)-dichlorprop and has minimal activity on (R)-dichlorprop. This indicates that AAD-12 (v2) has a clear (S)-enantiomeric preference. The activity of AAD-12 (v2) on 2,4-D was equivalent to that on (S)-dichlorprop indicating that the enzyme can process oxypropionate and oxyacetates effectively.

[00198] 6.2 – AAD-12 (v2) activity on pyridyloxyalkanoates

[00199] Using the pyridinol assay described in Example 5.2, five pyridyloxyalkanoates were assayed at 1 mM in a reaction mix containing 6.8 µg purified AAD-12 (v2). The rates of each reaction were monitored and are presented in Table 9. All five pyridyloxyalkanoates were cleaved to release pyridinols by AAD-12 (v2). The rates for the oxypropionate substrates 116844 and 91767 were somewhat faster than those for the corresponding acetates (triclopyr and 93833 respectively) indicating a preference of AAD-12 (v2) for oxypropionate over oxyacetate side chains. These data show that AAD-12 (v2) is able to effectively degrade pyridyloxyalkanoate herbicides such as triclopyr.

Table 9. Rates of pyridyloxyalkanoate cleavage by AAD-12 (v2). 6.8µg AAD-12 (v2) was incubated with 1 mM substrate, the reaction initiated by addition of α-ketoglutarate and the subsequent increase in absorbance monitored at 325 nm. The background rate of 1.4 mAU/min without α-ketoglutarate was subtracted from the rates with substrate.

STRUCTURE	ID	Rate (mAU/min)	Rate relative to triclopyr
	triclopyr	97	1
	66357	225	2.3
	91767	190	0.8
	116844	257	1.4
	93833	118	0.5

[00200] 6.3 – Kinetic constants of AAD-12 (v2) for 2,4-D, (R,S)-DCP and triclopyr

[00201] The K_m and k_{cat} values of purified AAD-12 (v2) for the herbicides 2,4-D, (R,S)-dichlorprop and triclopyr were determined using the appropriate assay method. Substrate inhibition occurred at high concentrations (>1 mM) of 2,4-D and (R,S)-DCP so concentrations below this were used to fit the data to the Michaelis-Menten equation using

Grafit 4.0 (Erithacus Software, UK). No substrate inhibition was noted for triclopyr up to 2 mM. The kinetic constants are summarized in Table 10. From these data, the rate of AAD-12 (v2) cleavage of triclopyr is ~5% that of 2,4-D, under maximal velocity conditions.

Table 10. Kinetic constants of AAD-12 (v2) for three herbicide substrates				
Substrate	K_m , μM ($\pm\text{SE}$)	k_{cat} , min^{-1} ($\pm\text{SE}$)	Assay method	Substrate inhibition at 2 mM
2,4-D	102 (± 18.4)	54.1 (± 3.1)	Phenol detection	55%
(R,S)-dichlorprop	122 (± 2.7)*	63.4 (± 0.5)	Phenol detection	55%
Triclopyr	241 (± 30)	2.6 (± 0.1)	$\Delta\text{A}325\text{ nm}$	0%

* Because of the (S)-enantiomeric preference of AAD-12, the K_m value was calculated assuming 50% of the racemic mixture was available as a substrate

Example 7 – Transformation into *Arabidopsis* and Selection

[00202] 7.1 – *Arabidopsis thaliana* growth conditions.

[00203] Wildtype *Arabidopsis* seed was suspended in a 0.1% Agarose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) solution. The suspended seed was stored at 4° C for 2 days to complete dormancy requirements and ensure synchronous seed germination (stratification).

[00204] Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) was covered with fine vermiculite and sub-irrigated with Hoagland's solution until wet. The soil mix was allowed to drain for 24 hours. Stratified seed was sown onto the vermiculite and covered with humidity domes (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canada) for 7 days.

[00205] Seeds were germinated and plants were grown in a Conviron (models CMP4030 and CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canada) under long day conditions (16 hours light/8 hours dark) at a light intensity of 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ under constant temperature (22° C) and humidity (40-50%). Plants were initially watered with Hoagland's solution and subsequently with deionized water to keep the soil moist but not wet.

[00206] 7.2 – *Agrobacterium* transformation.

[00207] An LB + agar plate with erythromycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (200mg/L) or spectinomycin (100 mg/L) containing a streaked DH5 α colony was used to provide a colony to inoculate 4 ml mini prep cultures (liquid LB + erythromycin). The cultures were incubated overnight at 37° C with constant agitation. Qiagen (Valencia, CA)

Spin Mini Preps, performed per manufacturer's instructions, were used to purify the plasmid DNA.

[00208] Electro-competent *Agrobacterium tumefaciens* (strains Z707s, EHA101s, and LBA4404s) cells were prepared using a protocol from Weigel and Glazebrook (2002). The competent *Agrobacterium* cells were transformed using an electroporation method adapted from Weigel and Glazebrook (2002). 50 µl of competent agro cells were thawed on ice and 10-25 ng of the desired plasmid was added to the cells. The DNA and cell mix was added to pre-chilled electroporation cuvettes (2 mm). An Eppendorf Electroporator 2510 was used for the transformation with the following conditions, Voltage: 2.4kV, Pulse length: 5msec.

[00209] After electroporation, 1 ml of YEP broth (per liter: 10 g yeast extract, 10 g Bacto-peptone, 5 g NaCl) was added to the cuvette, and the cell-YEP suspension was transferred to a 15 ml culture tube. The cells were incubated at 28° C in a water bath with constant agitation for 4 hours. After incubation, the culture was plated on YEP + agar with erythromycin (200 mg/L) or spectinomycin (100 mg/L) and streptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (250 mg/L). The plates were incubated for 2-4 days at 28° C.

[00210] Colonies were selected and streaked onto fresh YEP + agar with erythromycin (200 mg/L) or spectinomycin (100 mg/L) and streptomycin (250 mg/L) plates and incubated at 28°C for 1-3 days. Colonies were selected for PCR analysis to verify the presence of the gene insert by using vector specific primers. Qiagen Spin Mini Preps, performed per manufacturer's instructions, were used to purify the plasmid DNA from selected *Agrobacterium* colonies with the following exception: 4 ml aliquots of a 15 ml overnight mini prep culture (liquid YEP + erythromycin (200 mg/L) or spectinomycin (100 mg/L)) and streptomycin (250 mg/L)) were used for the DNA purification. An alternative to using Qiagen Spin Mini Prep DNA was lysing the transformed *Agrobacterium* cells, suspended in 10 µl of water, at 100° C for 5 minutes. Plasmid DNA from the binary vector used in the *Agrobacterium* transformation was included as a control. The PCR reaction was completed using Taq DNA polymerase from Takara Mirus Bio Inc. (Madison, Wisconsin) per manufacturer's instructions at 0.5x concentrations. PCR reactions were carried out in a MJ Research Peltier Thermal Cycler programmed with the following conditions; 1) 94° C for 3 minutes, 2) 94° C for 45 seconds, 3) 55° C for 30 seconds, 4) 72° C for 1 minute, for 29 cycles then 1 cycle of 72° C for 10 minutes. The reaction was maintained at 4° C after cycling. The amplification was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and visualized by

ethidium bromide staining. A colony was selected whose PCR product was identical to the plasmid control.

[00211] 7.3 – *Arabidopsis* transformation.

[00212] *Arabidopsis* was transformed using the floral dip method. The selected colony was used to inoculate one or more 15-30 ml pre-cultures of YEP broth containing erythromycin (200 mg/L) or spectinomycin (100 mg/L) and streptomycin (250 mg/L). The culture(s) was incubated overnight at 28° C with constant agitation at 220 rpm. Each pre-culture was used to inoculate two 500 ml cultures of YEP broth containing erythromycin (200 mg/L) or spectinomycin (100 mg/L) and streptomycin (250 mg/L) and the cultures were incubated overnight at 28° C with constant agitation. The cells were then pelleted at approx. 8700x g for 10 minutes at room temperature, and the resulting supernatant discarded. The cell pellet was gently resuspended in 500 ml infiltration media containing: 1/2x Murashige and Skoog salts/Gamborg's B5 vitamins, 10% (w/v) sucrose, 0.044μM benzylamino purine (10 μl/liter of 1 mg/ml stock in DMSO) and 300 μl/liter Silwet L-77. Plants approximately 1 month old were dipped into the media for 15 seconds, being sure to submerge the newest inflorescence. The plants were then laid down on their sides and covered (transparent or opaque) for 24 hours, then washed with water, and placed upright. The plants were grown at 22° C, with a 16-hour light/8-hour dark photoperiod. Approximately 4 weeks after dipping, the seeds were harvested.

[00213] 7.4 – Selection of transformed plants.

[00214] Freshly harvested T₁ seed [*AAD-12 (v1)* gene] was allowed to dry for 7 days at room temperature. T₁ seed was sown in 26.5 x 51-cm germination trays (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), each receiving a 200 mg aliquots of stratified T₁ seed (~10,000 seed) that had previously been suspended in 40 ml of 0.1% agarose solution and stored at 4° C for 2 days to complete dormancy requirements and ensure synchronous seed germination.

[00215] Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) was covered with fine vermiculite and subirrigated with Hoagland's solution until wet, then allowed to gravity drain. Each 40 ml aliquot of stratified seed was sown evenly onto the vermiculite with a pipette, and covered with humidity domes (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canada) for 4-5 days. Domes were removed 1 day prior to initial transformant selection using glufosinate postemergence spray (selecting for the co-transformed *PAT* gene).

[00216] Seven days after planting (DAP) and again 11 DAP, T₁ plants (cotyledon and 2-4-leaf stage, respectively) were sprayed with a 0.2% solution of Liberty herbicide (200 g ai/L glufosinate, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) at a spray volume of 10 ml/tray (703 L/ha) using a DeVilbiss compressed air spray tip to deliver an effective rate of 280 g ai/ha glufosinate per application. Survivors (plants actively growing) were identified 4-7 days after the final spraying and transplanted individually into 3-inch pots prepared with potting media (Metro Mix 360). Transplanted plants were covered with humidity domes for 3-4 days and placed in a 22° C growth chamber as before or moved to directly to the greenhouse. Domes were subsequently removed and plants reared in the greenhouse (22±5° C, 50±30% RH, 14 h light:10 dark, minimum 500 µE/m²s⁻¹ natural + supplemental light) at least 1 day prior to testing for the ability of *AAD-12* (v1) (plant optimized gene) to provide phenoxy auxin herbicide resistance.

[00217] T₁ plants were then randomly assigned to various rates of 2,4-D. For *Arabidopsis*, 50 g ae/ha 2,4-D is an effective dose to distinguish sensitive plants from ones with meaningful levels of resistance. Elevated rates were also applied to determine relative levels of resistance (50, 200, 800, or 3200g ae/ha). Tables 10 and 11 show comparisons drawn to an aryloxyalkanoate herbicide resistance gene (*AAD-1* (v3)) previously described in PCT/US2005/014737.

[00218] All auxin herbicide applications were made using the DeVilbiss sprayer as described above to apply 703 L/ha spray volume (0.4 ml solution/3-inch pot) or applied by track sprayer in a 187 L/ha spray volume. 2,4-D used was either technical grade (Sigma, St. Louis, MO) dissolved in DMSO and diluted in water (<1% DMSO final concentration) or the commercial dimethylamine salt formulation (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO). Dichlorprop used was commercial grade formulated as potassium salt of R-dichlorprop (600 g ai/L, AH Marks). As herbicide rates increased beyond 800 g ae/ha, the pH of the spray solution became exceedingly acidic, burning the leaves of young, tender *Arabidopsis* plants and complicating evaluation of the primary effects of the herbicides. It became standard practice to apply these high rates of herbicides in 200 mM HEPES buffer, pH 7.5.

[00219] Some T₁ individuals were subjected to alternative commercial herbicides instead of a phenoxy auxin. One point of interest was determining whether the pyridyloxyacetate auxin herbicides, triclopyr and fluroxypyr, could be effectively degraded *in planta*. Herbicides

were applied to T₁ plants with use of a track sprayer in a 187 L/ha spray volume. T₁ plants that exhibited tolerance to 2,4-D DMA were further accessed in the T₂ generation.

[00220] 7.5 – Results of selection of transformed plants.

[00221] The first *Arabidopsis* transformations were conducted using *AAD-12 (v1)* (plant optimized gene). T₁ transformants were first selected from the background of untransformed seed using a glufosinate selection scheme. Over 300,000 T₁ seed were screened and 316 glufosinate resistant plants were identified (PAT gene), equating to a transformation/selection frequency of 0.10% which lies in the normal range of selection frequency of constructs where PAT + Liberty are used for selection. T₁ plants selected above were subsequently transplanted to individual pots and sprayed with various rates of commercial aryloxyalkanoate herbicides. Table 11 compares the response of *AAD-12 (v1)* and control genes to impart 2,4-D resistance to *Arabidopsis* T₁ transformants. Response is presented in terms of % visual injury 2 WAT. Data are presented as a histogram of individuals exhibiting little or no injury (<20%), moderate injury (20-40%), or severe injury (>40%). Since each T₁ is an independent transformation event, one can expect significant variation of individual T₁ responses within a given rate. An arithmetic mean and standard deviation is presented for each treatment. The range in individual response is also indicated in the last column for each rate and transformation. *PAT/CryIF*-transformed *Arabidopsis* served as an auxin-sensitive transformed control. The *AAD-12 (v1)* gene imparted herbicide resistance to individual T₁ *Arabidopsis* plants. Within a given treatment, the level of plant response varied greatly and can be attributed to the fact each plant represents an independent transformation event. Of important note, at each 2,4-D rate tested, there were individuals that were unaffected while some were severely affected. An overall population injury average by rate is presented in Table 11 simply to demonstrate the significant difference between the plants transformed with *AAD-12 (v1)* versus the wildtype or *PAT/CryIF*-transformed controls. Injury levels tend to be greater and the frequency of uninjured plants was lower at elevated rates up to 3,200 g ae/ha (or 6x field rate). Also at these high rates, the spray solution becomes highly acidic unless buffered. *Arabidopsis* grown mostly in the growth chamber has a very thin cuticle and severe burning effects can complicate testing at these elevated rates. Nonetheless, many individuals have survived 3,200 g ae/ha 2,4-D with little or no injury.

Table 11. *AAD-12* (v1) transformed T₁ *Arabidopsis* response to a range of 2,4-D rates applied postemergence, compared to an *AAD-1* v3 (T₄) homozygous resistant population, or a *Pat-Cry1F* transformed, auxin-sensitive control.

AAD-12 (v1) gene T ₁ transformants	% Injury			% Injury	
	Averages	<20%	20-40%	>40%	Std Dev
Untreated control-buffer	6	0	0	0	0
50 g ae/ha 2,4-D	6	0	2	16	24
200 g ae/ha 2,4-D	6	1	1	11	18
800 g ae/ha 2,4-D	5	2	1	15	20
3200 g ae/ha 2,4-D	8	0	0	6	6
PAT/Cry1F (transformed control)	% Injury			% Injury	
	Averages	<20%	20-40%	>40%	Std Dev
Untreated control-buffer	10	0	0	0	0
50 g ae/ha 2,4-D	4	1	5	31	16
200 g ae/ha 2,4-D	0	0	10	70	2
800 g ae/ha 2,4-D	0	0	10	81	8
3200 g ae/ha 2,4-D	0	0	10	91	2
Homozygous AAD-1 (v3) gene T ₄ plants	% Injury			% Injury	
	Averages	<20%	20-40%	>40%	Std Dev
Untreated control-buffer	10	0	0	0	0
50 g ae/ha 2,4-D	10	0	0	0	0
200 g ae/ha 2,4-D	10	0	0	0	0
800 g ae/ha 2,4-D	10	0	0	0	0
3200g ae/ha 2,4-D	9	1	0	2	6

[00222] Table 12 shows a similarly conducted dose response of T₁ *Arabidopsis* to the phenoxypropionic acid, dichlorprop. The data shows that the herbicidally active (R-) isomer of dichlorprop does not serve as a suitable substrate for AAD-12 (v1). The fact that AAD-1 will metabolize R-dichlorprop well enough to impart commercially acceptable tolerance is one distinguishing characteristic that separates the two genes. (Table 12). AAD-1 and AAD-12 are considered R- and S-specific α -ketoglutarate dioxygenases, respectively.

Table 12. T₁ *Arabidopsis* response to a range of R-dichlorprop rates applied postemergence.

AAD-12 v1 gene	% Injury			% Injury	
	Averages	<20%	20-40%	>40%	Std Dev
Untreated control	6	0	0	0	0
50 g ae/ha R-dichlorprop	0	0	8	63	7
200 g ae/ha R-dichlorprop	0	0	8	85	10
800 g ae/ha R-dichlorprop	0	0	8	96	4
3200 g ae/ha R-dichlorprop	0	0	8	98	2

PAT/Cry1F Averages	% Injury			% Injury Ave	Std Dev
	<20%	20-40%	>40%		
Untreated control	10	0	0	0	0
50 g ae/ha R-dichlorprop	0	10	0	27	2
200 g ae/ha R-dichlorprop	0	0	10	69	3
800 g ae/ha R-dichlorprop	0	0	10	83	6
3200 g ae/ha R-dichlorprop	0	0	10	90	2

Homozygous AAD-1 (v3) gene T ₄ plants	% Injury			% Injury Ave	Std Dev
	<20%	20-40%	>40%		
Untreated control	10	0	0	0	0
50g ae/ha R-dichlorprop	10	0	0	0	0
200 g ae/ha R-dichlorprop	10	0	0	0	0
800 g ae/ha R-dichlorprop	10	0	0	0	0
3200 g ae/ha R-dichlorprop	10	0	0	0	0

[00223] 7.6 – AAD-12 (v1) as a selectable marker.

[00224] The ability to use AAD-12 (v1) as a selectable marker using 2,4-D as the selection agent was analyzed initially with *Arabidopsis* transformed as described above. Approximately 50 T₄ generation *Arabidopsis* seed (homozygous for AAD-12 (v1)) were spiked into approximately 5,000 wildtype (sensitive) seed. Several treatments were compared, each tray of plants receiving either one or two application timings of 2,4-D in one of the following treatment schemes: 7 DAP, 11 DAP, or 7 followed by 11 DAP. Since all individuals also contained the PAT gene in the same transformation vector, AAD-12 selected with 2,4-D could be directly compared to PAT selected with glufosinate.

[00225] Treatments were applied with a DeVilbiss spray tip as previously describd. Plants were identified as Resistant or Sensitive 17 DAP. The optimum treatment was 75 g ae/ha 2,4-D applied 7 and 11 days after planting (DAP), was equally effective in selection frequency, and resulted in less herbicidal injury to the transformed individuals than the Liberty selection scheme. These results indicate AAD-12 (v1) can be effectively used as an alternative selectable marker for a population of transformed *Arabidopsis*.

[00226] 7.7 – Heritability.

[00227] A variety of T₁ events were self-pollinated to produce T₂ seed. These seed were progeny tested by applying 2,4-D (200 g ae/ha) to 100 random T₂ siblings. Each individual T₂ plant was transplanted to 7.5-cm square pots prior to spray application (track sprayer at 187 L/ha applications rate). Seventy-five percent of the T₁ families (T₂ plants) segregated in the anticipated 3 Resistant:1 Sensitive model for a dominantly inherited single locus with Mendelian inheritance as determined by Chi square analysis (P > 0.05).

[00228] Seed were collected from 12 to 20 T₂ individuals (T₃ seed). Twenty-five T₃ siblings from each of eight randomly-selected T₂ families were progeny tested as previously described. Approximately one-third of the T₂ families anticipated to be homozygous (non-segregating populations) have been identified in each line. These data show *AAD-12 (v1)* is stably integrated and inherited in a Mendelian fashion to at least three generations.

[00229] 7.8 – Additional foliar applications herbicide resistance in *AAD-12 Arabidopsis*.

[00230] The ability of *AAD-12 (v1)* to provide resistance to other aryloxyalkanoate auxin herbicides in transgenic *Arabidopsis* was determined by foliar application of various substrates. T₂ generation *Arabidopsis* seed was stratified, and sown into selection trays much like that of *Arabidopsis* (Example 6.4). A transformed-control line containing *PAT* and the insect resistance gene *Cry1F* was planted in a similar manner. Seedlings were transferred to individual 3-inch pots in the greenhouse. All plants were sprayed with the use of a track sprayer set at 187 L/ha. The plants were sprayed with a range of pyridyloxyacetate herbicides: 280-2240 g ae/ha triclopyr (Garlon 3A, Dow AgroSciences) and 280-2240 g ae/ha fluroxypyr (Starane, Dow AgroSciences); and the 2,4-D metabolite resulting from *AAD-12* activity, 2,4-dichlorophenol (DCP, Sigma) (at a molar equivalent to 280-2240 g ae/ha of 2,4-D, technical grade DCP was used). All applications were formulated in water. Each treatment was replicated 3-4 times. Plants were evaluated at 3 and 14 days after treatment.

[00231] There is no effect of the 2,4-D metabolite, 2,4-dichlorophenol (DCP), on transgenic non-*AAD-12* control *Arabidopsis* (*Pat/Cry1F*). *AAD-12*-transformed plants were also clearly protected from the triclopyr and fluroxypyr herbicide injury that was seen in the transformed non-resistant controls (see Table 13). These results confirm that *AAD-12 (v1)* in *Arabidopsis* provides resistance to the pyridyloxyacetic auxins tested. This is the first report of an enzyme with significant activity on pyridyloxyacetic acid herbicides. No other 2,4-D degrading enzyme has been reported with similar activity.

Table 13. Comparison of T ₂ <i>AAD-12 (v1)</i> and transformed control <i>Arabidopsis</i> plant response to various foliar-applied auxinic herbicides.		
Pyridyloxyacetic auxins		
Herbicide Treatment	Ave % Injury 14DAT	
	Segregating T ₂ <i>AAD-12 (v1)</i> plants (pDAB724.01.120)	Pat/Cry1f - Control
280 g ae/ha Triclopyr	0	52
560 g ae/ha Triclopyr	3	58
1120 g ae/ha Triclopyr	0	75*

Table 13. Comparison of T₂ AAD-12 (v1) and transformed control *Arabidopsis* plant response to various foliar-applied auxinic herbicides.

2240 g ae/ha Triclopyr	3	75*
280 g ae/ha Fluroxypyr	0	75*
560 g ae/ha Fluroxypyr	2	75*
1120 g ae/ha Fluroxypyr	3	75*
2240 g ae/ha Fluroxypyr	5	75*
Inactive DCP metabolite		
280 g ae/ha 2,4-DCP	0	0
560 g ae/ha 2,4-DCP	0	0
1120 g ae/ha 2,4-DCP	0	0
2240 g ae/ha 2,4-DCP	0	0

* Plants in this experiment were stunted and severely epinastic, but remained green and did not receive injury ratings > 75%.

[00232] 7.9 – Molecular analysis of AAD-12 (v1) *Arabidopsis*.

[00233] Invader Assay (methods of Third Wave Agbio Kit Procedures) for *PAT* gene copy number analysis was performed with total DNA obtained from Qiagen DNeasy kit on multiple *AAD-12* (v1) homozygous lines to determine stable integration of the plant transformation unit containing *PAT* and *AAD-12* (v1). Analysis assumed direct physical linkage of these genes as they were contained on the same plasmid.

[00234] Results showed that all 2,4-D resistant plants assayed, contained *PAT* (and thus by inference, *AAD-12* (v1)). Copy number analysis showed total inserts ranged from 1 to 5 copies. This correlates, too, with the *AAD-12* (v1) protein expression data indicating that the presence of the enzyme yields significantly high levels of resistance to all commercially available phenoxyacetic and pyridyloxyacetic acids.

[00235] 7.10 – *Arabidopsis* transformed with molecular stack of AAD-12 (v1) and a glyphosate resistance gene.

[00236] T₁ *Arabidopsis* seed was produced, as previously described, containing the pDAB3759 plasmid (*AAD-12* (v1) + *EPSPS*) which encodes a putative glyphosate resistance trait. T₁ transformants were selected using *AAD-12* (v1) as the selectable marker as described in example 7.6. T₁ plants (individually transformed events) were recovered from the first selection attempt and transferred to three-inch pots in the greenhouse as previously described. Three different control *Arabidopsis* lines were also tested: wildtype Columbia-0, *AAD-12* (v1) + *PAT* T₄ homozygous lines (pDAB724-transformed), and *PAT* + *CryIF* homozygous

line (transformed control). The pDAB3759 and pDAB724 transformed plants were pre-selected at the seedling stage for 2,4-D tolerance. Four days after transplanting, plants were evenly divided for foliar treatment by track sprayer as previously described with 0, 26.25, 105, 420, or 1680 g ae/ha glyphosate (Glyphomax Plus, Dow AgroSciences) in water. All treatments were replicated 5 to 20 times. Plants were evaluated 7 and 14 days after treatment. [00237] Initial resistance assessment indicated plants tolerant to 2,4-D were subsequently tolerant to glyphosate when compared to the response of the three control lines. These results indicate that resistance can be imparted to plants to two herbicides with differening modes of action, including 2,4-D and glyphosate tolerance, allowing application of both herbicides postemergence. Additionally, AAD-12 + 2,4-D was used effectively as a selectable marker for a true resistance selection.

Table 14. T₁ *Arabidopsis* response to a range of glyphosate rates applied postemergence (14 DAT).

AAD-12 v1 gene + EPSPS + HptII (pDAB3759) (Averages)	% Injury			% Injury	
	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std Dev
Untreated control	5	0	0	0	0
26.25 g ae/ha glyphosate	13	2	1	11	16
105 g ae/ha glyphosate	10	1	5	34	38
420 g ae/ha glyphosate	5	6	5	44	37
1680 g ae/ha glyphosate	0	0	16	85	9
PAT/Cry1F					
Averages	% Injury			% Injury	
	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std Dev
Untreated control	5	0	0	0	0
26.25 g ae/ha glyphosate	0	0	5	67	7
105 g ae/ha glyphosate	0	0	5	100	0
420 g ae/ha glyphosate	0	0	5	100	0
1680 g ae/ha glyphosate	0	0	5	100	0
Wildtype (Col-0)					
Averages	% Injury			% Injury	
	<20%	20-40%	>40%	Ave	Std Dev
Untreated control	5	0	0	0	0
26.25 g ae/ha glyphosate	0	0	5	75	13
105 g ae/ha glyphosate	0	0	5	100	0
420 g ae/ha glyphosate	0	0	5	100	0
1680 g ae/ha glyphosate	0	0	5	100	0

pDAB724 T ₄ (PAT + AAD-12) Averages	% Injury		% Injury		Ave	Std Dev
	<20%	20-40%	>40%			
Untreated control	5	0	0		0	0
26.25 g ae/ha glyphosate	0	0	5		66	8
105 g ae/ha glyphosate	0	0	5		100	0
420 g ae/ha glyphosate	0	0	5		100	0
1680 g ae/ha glyphosate	0	0	5		100	0

[00238] 7.11 – AAD-12 Arabidopsis genetically stacked with AAD-1 to give wider spectrum of herbicide tolerance.

[00239] AAD-12 (v1) (pDAB724) and AAD-1 (v3) (pDAB721) plants were reciprocally crossed and F₁ seed was collected. Eight F₁ seeds were planted and allowed to grow to produce seed. Tissue samples were taken from the eight F₁ plants and subjected to Western analysis to confirm the presence of both genes. It was concluded that all 8 plants tested expressed both AAD-1 and AAD-12 proteins. The seed was bulked and allowed to dry for a week before planting.

[00240] One hundred F₂ seeds were sown and 280 g ai/ha glufosinate was applied. Ninety-six F₂ plants survived glufosinate selection fitting an expected segregation ration for two independently assorting loci for glufosinate resistance (15 R : 1S). Glufosinate resistant plants were then treated with 560 g ae/ha R-dichlorprop + 560 g ae/ha triclopyr, applied to the plants under the same spray regimen as used for the other testing. Plants were graded at 3 and 14 DAT. Sixty-three of the 96 plants that survived glufosinate selection also survived the herbicide application. These data are consistent with an expected segregation pattern (9R: 6S) of two independently assorting dominant traits where each gene gives resistance to only one of the auxinic herbicides (either R-dichlorprop or triclopyr). The results indicate that AAD-12 (pDAB724) can be successfully stacked with AAD-1 (pDAB721), thus increasing the spectrum herbicides that may be applied to the crop of interest [(2,4-D + R-dichlorprop) and (2,4-D + fluroxypyr + triclopyr), respectively]. This could be useful to bring 2,4-D tolerance to a very sensitive species through conventional stacking of two separate 2,4-D resistance genes. Additionally, if either gene were used as a selectable marker for a third and fourth gene of interest through independent transformation activities, then each gene pair could be brought together through conventional breeding activities and subsequently selected in the F₁ generation through paired sprays with herbicides that are exclusive between the AAD-1 and

AAD-12 enzymes (as shown with R-dichlorprop and triclopyr for AAD-1 and AAD-12, respectively, above).

[00241] Other AAD stacks are also within the scope of the subject invention. The TfdA protein discussed elsewhere herein (Streber *et al.*), for example, can be used together with the subject AAD-12 genes to impart novel spectrums of herbicide resistance in transgenic plants of the subject invention.

Example 8 – WHISKERS-mediated transformation of corn using imazethapyr selection

[00242] 8.1 – Cloning of *AAD-12 (v1)*.

[00243] The *AAD-12 (v1)* gene was cut out of the intermediate vector pDAB3283 as an NcoI/SacI fragment. This was ligated directionally into the similarly cut pDAB3403 vector containing the ZmUbi1 monocot promoter. The two fragments were ligated together using T4 DNA ligase and transformed into DH5 α cells. Minipreps were performed on the resulting colonies using Qiagen's QIA Spin mini prep kit, and the colonies were digested to check for orientation. This first intermediate construct (pDAB4100) contains the ZmUbi1 : *AAD-12 (v1)* cassette. This construct was digested with NotI and PvuI to liberate the gene cassette and digest the unwanted backbone. This was ligated to NotI cut pDAB2212, which contains the AHAS selectable marker driven by the Rice Actin promoter OsAct1. The final construct was designated pDAB4101 or pDAS1863, and contains ZmUbi1/*AAD-12 (v1)*/ZmPer5::OsAct1/AHAS /LZmLip.

[00244] 8.2 – Callus/suspension initiation.

[00245] To obtain immature embryos for callus culture initiation, F₁ crosses between greenhouse-grown Hi-II parents A and B (Armstrong *et al.* 1991) were performed. When embryos were 1.0-1.2 mm in size (approximately 9-10 days post-pollination), ears were harvested and surface sterilized by scrubbing with Liqui-Nox® soap, immersed in 70% ethanol for 2-3 minutes, then immersed in 20% commercial bleach (0.1% sodium hypochlorite) for 30 minutes.

[00246] Ears were rinsed in sterile, distilled water, and immature zygotic embryos were aseptically excised and cultured on 15Ag10 medium (N6 Medium (Chu *et al.*, 1975), 1.0 mg/L 2,4-D, 20 g/L sucrose, 100 mg/L casein hydrolysate (enzymatic digest), 25 mM L-proline, 10 mg/L AgNO₃, 2.5 g/L Gelrite, pH 5.8) for 2-3 weeks with the scutellum facing away from the medium. Tissue showing the proper morphology (Welter *et al.*, 1995) was

selectively transferred at biweekly intervals onto fresh 15Ag10 medium for about 6 weeks, then transferred to 4 medium (N6 Medium, 1.0 mg/L 2,4-D, 20 g/L sucrose, 100 mg/L casein hydrolysate (enzymatic digest), 6 mM L-proline, 2.5 g/L Gelrite, pH 5.8) at bi-weekly intervals for approximately 2 months.

[00247] To initiate embryogenic suspension cultures, approximately 3 ml packed cell volume (PCV) of callus tissue originating from a single embryo was added to approximately 30 ml of H9CP+ liquid medium (MS basal salt mixture (Murashige and Skoog, 1962), modified MS Vitamins containing 10-fold less nicotinic acid and 5-fold higher thiamine-HCl, 2.0 mg/L 2,4-D, 2.0 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA), 30 g/L sucrose, 200 mg/L casein hydrolysate (acid digest), 100 mg/L *myo*-inositol, 6 mM L-proline, 5% v/v coconut water (added just before subculture), pH 6.0). Suspension cultures were maintained under dark conditions in 125 ml Erlenmeyer flasks in a temperature-controlled shaker set at 125 rpm at 28° C. Cell lines typically became established within 2 to 3 months after initiation. During establishment, suspensions were subcultured every 3.5 days by adding 3 ml PCV of cells and 7 ml of conditioned medium to 20 ml of fresh H9CP+ liquid medium using a wide-bore pipette. Once the tissue started doubling in growth, suspensions were scaled-up and maintained in 500 ml flasks whereby 12 ml PCV of cells and 28 ml conditioned medium was transferred into 80 ml H9CP+ medium. Once the suspensions were fully established, they were cryopreserved for future use.

[00248] 8.3 – Cryopreservation and thawing of suspensions.

[00249] Two days post-subculture, 4 ml PCV of suspension cells and 4 ml of conditioned medium were added to 8 ml of cryoprotectant (dissolved in H9CP+ medium without coconut water, 1 M glycerol, 1 M DMSO, 2 M sucrose, filter sterilized) and allowed to shake at 125 rpm at 4° C for 1 hour in a 125 ml flask. After 1 hour 4.5 ml was added to a chilled 5.0 ml Corning cryo vial. Once filled individual vials were held for 15 minutes at 4° C in a controlled rate freezer, then allowed to freeze at a rate of -0.5° C/minute until reaching a final temperature of -40° C. After reaching the final temperature, vials were transferred to boxes within racks inside a Cryoplus 4 storage unit (Forma Scientific) filled with liquid nitrogen vapors.

[00250] For thawing, vials were removed from the storage unit and placed in a closed dry ice container, then plunged into a water bath held at 40-45° C until “boiling” subsided. When thawed, contents were poured over a stack of ~8 sterile 70 mm Whatman filter papers (No. 4)

in covered 100x25 mm Petri dishes. Liquid was allowed to absorb into the filters for several minutes, then the top filter containing the cells was transferred onto GN6 medium (N6 medium, 2.0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 2.5 g/L Gelrite, pH 5.8) for 1 week. After 1 week, only tissue with promising morphology was transferred off the filter paper directly onto fresh GN6 medium. This tissue was subcultured every 7-14 days until 1 to 3 grams was available for suspension initiation into approximately 30 ml H9CP+ medium in 125 ml Erlenmeyer flasks. Three milliliters PCV was subcultured into fresh H9CP+ medium every 3.5 days until a total of 12 ml PCV was obtained, at which point subculture took place as described previously.

[00251] 8.4 – Stable Transformation

[00252] Approximately 24 hours prior to transformation, 12 ml PCV of previously cryopreserved embryogenic maize suspension cells plus 28 ml of conditioned medium was subcultured into 80 ml of GN6 liquid medium (GN6 medium lacking Gelrite) in a 500 ml Erlenmeyer flask, and placed on a shaker at 125 rpm at 28° C. This was repeated 2 times using the same cell line such that a total of 36 ml PCV was distributed across 3 flasks. After 24 hours the GN6 liquid media was removed and replaced with 72 ml GN6 S/M osmotic medium (N6 Medium, 2.0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 45.5 g/L sorbitol, 45.5 g/L mannitol, 100 mg/L *myo*-inositol, pH 6.0) per flask in order to plasmolyze the cells. The flasks were placed on a shaker shaken at 125 RPM in the dark for 30-35 minutes at 28°C, and during this time a 50 mg/ml suspension of silicon carbide whiskers was prepared by adding the appropriate volume 8.1 ml of GN6 S/M liquid medium to ~405 mg of pre-autoclaved, sterile silicon carbide whiskers (Advanced Composite Materials, Inc.).

[00253] After incubation in GN6 S/M, the contents of each flask were pooled into a 250 ml centrifuge bottle. Once all cells settled to the bottom, all but ~14 ml of GN6 S/M liquid was drawn off and collected in a sterile 1-L flask for future use. The pre-wetted suspension of whiskers was vortexed for 60 seconds on maximum speed and 8.1 ml was then added to the bottle, to which 170 µg DNA was added as a last step. The bottle was immediately placed in a modified Red Devil 5400 commercial paint mixer and agitated for 10 seconds. After agitation, the cocktail of cells, media, whiskers and DNA was added to the contents of the 1-L flask along with 125 ml fresh GN6 liquid medium to reduce the osmoticant. The cells were allowed to recover on a shaker at 125 RPM for 2 hours at 28°C before being filtered onto

Whatman #4 filter paper (5.5 cm) using a glass cell collector unit that was connected to a house vacuum line.

[00254] Approximately 2 ml of dispersed suspension was pipetted onto the surface of the filter as the vacuum was drawn. Filters were placed onto 60 x 20 mm plates of GN6 medium. Plates were cultured for 1 week at 28° C in a dark box.

[00255] After 1 week, filter papers were transferred to 60x20 mm plates of GN6 (3P) medium (N6 Medium, 2.0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 100 mg/L *myo*-inositol, 3 µM imazethapyr from Pursuit® DG, 2.5 g/L Gelrite, pH 5.8). Plates were placed in boxes and cultured for an additional week.

[00256] Two weeks post-transformation, the tissue was embedded by scraping all cells on the plate into 3.0 ml of melted GN6 agarose medium (N6 medium, 2.0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 100 mg/L *myo*-inositol, 7 g/L Sea Plaque agarose, pH 5.8, autoclaved for only 10 minutes at 121°C) containing 3 µM imazethapyr from Pursuit® DG. The tissue was broken up and the 3 ml of agarose and tissue were evenly poured onto the surface of a 100 x 15 mm plate of GN6 (3P). This was repeated for all remaining plates. Once embedded, plates were individually sealed with Nescofilm® or Parafilm M®, and then cultured until putative isolates appeared.

[00257] 8.4.1- Protocol for Isolate recovery and regeneration.

[00258] Putatively transformed events were isolated off the Pursuit®-containing embedded plates approximately 9 weeks post-transformation by transferring to fresh selection medium of the same concentration in 60 x 20 mm plates. If sustained growth was evident after approximately 2-3 weeks, the event was deemed to be resistant and was submitted for molecular analysis.

[00259] Regeneration was initiated by transferring callus tissue to a cytokinin-based induction medium, 28 (3P), containing 3 µM imazethapyr from Pursuit® DG, MS salts and vitamins, 30.0 g/L sucrose, 5 mg/L BAP, 0.25 mg/L 2,4-D, 2.5 g/L Gelrite; pH 5.7. Cells were allowed to grow in low light (13 µEm⁻²s⁻¹) for one week, then higher light (40 µEm⁻²s⁻¹) for another week, before being transferred to regeneration medium, 36 (3P), which was identical to 28 (3P) except that it lacked plant growth regulators. Small (3-5 cm) plantlets were removed and placed into 150 x 25-mm culture tubes containing selection-free SHGA medium (Schenk and Hildebrandt basal salts and vitamins, 1972; 1 g/L *myo*-inositol, 10 g/L sucrose, 2.0 g/L

Gelrite, pH 5.8). Once plantlets developed a sufficient root and shoot system, they were transplanted to soil in the greenhouse.

[00260] From 4 experiments, full plantlets, comprised of a shoot and root, were formed *in vitro* on the embedded selection plates under dark conditions without undergoing a traditional callus phase. Leaf tissue from nine of these “early regenerators” were submitted for coding region PCR and Plant Transcription Unit (PTU) PCR for the *AAD-12* gene and gene cassette, respectively. All had an intact *AAD-12* coding region, while 3 did not have a full-length PTU (Table 15). These “early regenerators” were identified as 4101 events to differentiate them from the traditionally-derived events, which were identified as “1283” events. Plants from 19 additional events, obtained via standard selection and regeneration, were sent to the greenhouse, grown to maturity and cross-pollinated with a proprietary inbred line in order to produce T₁ seed. Some of the events appear to be clones of one another due to similar banding patterns following Southern blot, so only 14 unique events were represented. T₀ plants from events were tolerant 70 g/ha imazethapyr. Invader analysis (*AHAS* gene) indicated instertion complexity ranging from 1 to >10 copies. Thirteen events contained the compete coding region for *AAD-12*; however, further anaylsis indicated the complete plant transformation unit had not been incorporated for nine events. None of the compromised 1863 events were advanced beyond the T1 stage and further characterization utilized the 4101 events.

[00261] 8.5– Molecular Analysis: Maize Materials and Methods.

[00262] 8.5.1 – Tissue harvesting DNA isolation and quantification. Fresh tissue is placed into tubes and lyophilized at 4° C for 2 days. After the tissue is fully dried, a tungsten bead (Valenite) is placed in the tube and the samples are subjected to 1 minute of dry grinding using a Kelco bead mill. The standard DNeasy DNA isolation procedure is then followed (Qiagen, DNeasy 69109). An aliquot of the extracted DNA is then stained with Pico Green (Molecular Probes P7589) and read in the fluorometer (BioTek) with known standards to obtain the concentration in ng/μl.

[00263] 8.5.2 – Invader assay analysis. The DNA samples are diluted to 20 ng/μl then denatured by incubation in a thermocycler at 95° C for 10 minutes. Signal Probe mix is then prepared using the provided oligo mix and MgCl₂ (Third Wave Technologies). An aliquot of 7.5 μl is placed in each well of the Invader assay plate followed by an aliquot of 7.5 μl of controls, standards, and 20 ng/μl diluted unknown samples. Each well is overlaid with 15 μl

of mineral oil (Sigma). The plates are then incubated at 63° C for 1 hour and read on the fluorometer (Biotek). Calculation of % signal over background for the target probe divided by the % signal over background internal control probe will calculate the ratio. The ratio of known copy standards developed and validated with Southern blot analysis is used to identify the estimated copy of the unknown events.

[00264] 8.5.3 – Polymerase chain reaction. A total of 100 ng of total DNA is used as the template. 20 mM of each primer is used with the Takara Ex Taq PCR Polymerase kit (Mirus TAKRR001A). Primers for the *AAD-12* (v1) PTU are Forward – GAACAGTTAGACATGGTCTAAAGG (SEQ ID NO:8) and Reverse – GCTGCAACACTGATAAATGCCAACTGG (SEQ ID NO:9). The PCR reaction is carried out in the 9700 Geneamp thermocycler (Applied Biosystems), by subjecting the samples to 94° C for 3 minutes and 35 cycles of 94° C for 30 seconds, 63° C for 30 seconds, and 72° C for 1 minute and 45 seconds followed by 72° C for 10 minutes.

[00265] Primers for *AAD-12* (v1) Coding Region PCR are Forward – ATGGCTCAGACCACTCTCCAAA (SEQ ID NO:10) and Reverse – AGCTGCATCCATGCCAGGGA (SEQ ID NO:11). The PCR reaction is carried out in the 9700 Geneamp thermocycler (Applied Biosystems), by subjecting the samples to 94° C for 3 minutes and 35 cycles of 94° C for 30 seconds, 65° C for 30 seconds, and 72° C for 1 minute and 45 seconds followed by 72° C for 10 minutes. PCR products are analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with EtBr.

[00266] 8.5.4 – Southern blot analysis.

[00267] Southern blot analysis is performed with genomic DNA obtained from Qiagen DNeasy kit. A total of 2 µg of genomic leaf DNA or 10 µg of genomic callus DNA is subjected to an overnight digestion using BSM I and SWA I restriction enzymes to obtain PTU data .

[00268] After the overnight digestion an aliquot of ~100 ng is run on a 1% gel to ensure complete digestion. After this assurance the samples are run on a large 0.85 % agarose gel overnight at 40 volts. The gel is then denatured in 0.2 M NaOH, 0.6 M NaCl for 30 minutes. The gel is then neutralized in 0.5 M Tris HCl, 1.5 M NaCl pH of 7.5 for 30 minutes. A gel apparatus containing 20x SSC is then set up to obtain a gravity gel to nylon membrane (Millipore INYC00010) transfer overnight. After the overnight transfer the membrane is then subjected to UV light via a crosslinker (Stratagene UV stratalinker 1800) at 1200 X100

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

[00269]

8.6 – Postemergence herbicide tolerance in AAD-12 transformed T₀ Corn.

[00270]

Four T₀ events were allowed to acclimate in the greenhouse and were grown until 2-4 new, normal looking leaves had emerged from the whorl (i.e., plants had transitioned from tissue culture to greenhouse growing conditions). Plants were grown at 27° C under 16 hour light:8 hour dark conditions in the greenhouse. Plants were then treated with commercial formulations of either Pursuit® (imazethapyr) or 2,4-D Amine 4. Pursuit® was sprayed to demonstrate the function of the selectable marker gene present within the events tested. Herbicide applications were made with a track sprayer at a spray volume of 187 L/ha, 50-cm spray height. Plants were sprayed with either a lethal dose of imazethapyr (70 g ae/ha) or a rate of 2,4-D DMA salt capable of significant injury to untransformed corn lines (2240 g ae/ha). A lethal dose is defined as the rate that causes >95% injury to the Hi-II inbred. Hi-II is the genetic background of the transformants of the present invention.

[00271]

Several individuals were safened from the herbicides to which the respective genes were to provide resistance. The individual clone '001' from event "001" (a.k.a., 4101(0)-001-001), however, did incur minor injury but recovered by 14 DAT. Three of the four events were moved forward and individuals were crossed with 5XH751 and taken to the next generation. Each herbicide tolerant plant was positive for the presence of the *AAD-12* coding region (PCR assay) or the presence of the *AHAS* gene (Invader assay) for 2,4-D and imazethapyr-tolerant plants, respectively. AAD-12 protein was detected in all 2,4-D tolerant T₀ plants events containing an intact coding region. The copy number of the transgene(s)

(*AHAS*, and by inference *AAD-12*) varied significantly from 1 to 15 copies. Individual T_0 plants were grown to maturity and cross-pollinated with a proprietary inbred line in order to produce T_1 seed.

Table 15. Characterization of T_0 corn plants transformed with <i>AAD-12</i> .						
Event	Spray Treatment	% Injury (14 DAT)	AAD-12 ELISA (ppm TSP)	AAD12 PCR (Coding Region)	AAD12 PCR (PTU)	AHAS Copy # (Invader)
4101(0)003.001	2240 g ae/ha 2,4-D	0	146.9	+	+	1
4101(0)003.003	2240 g ae/ha 2,4-D	0	153.5	+	+	1
4101(0)005.001	2240 g ae/ha 2,4-D	0	539.7	+	+	9
4101(0)005.0012	0 g ae/ha 2,4-D	0	562.9	+	+	7
4101(0)001.001	70 g ae/ha imazethapyr	5	170.7	+	+	6
4101(0)002.001	0 g ae/ha imazethapyr	0	105.6	+	-	2
4101(0)002.002	70 g ae/ha imazethapyr	0	105.3	+	-	2
4101(0)003.002	70 g ae/ha imazethapyr	0	0	+	band smaller than expected	15

[00272] 8.7 – Verification of high 2,4-D tolerance in T_1 corn.

[00273] T_1 *AAD-12* (*vi*) seed were planted into 3-inch pots containing Metro Mix media and at 2 leaf stage were sprayed with 70 g ae/ha imazethapyr to eliminate nulls. Surviving plants were transplanted to 1-gallon pots containing Metro Mix media and placed in the same growth conditions as before. At V3-V4 stage the plants were sprayed in the track sprayer set to 187 L/ha at either 560 or 2240 g ae/ha 2,4-D DMA. Plants were graded at 3 and 14 DAT and compared to 5XH751 x Hi II control plants. A grading scale of 0-10 (no injury to extreme auxin injury) was developed to distinguish brace root injury. Brace Root grades were taken on 14DAT to show 2,4-D tolerance. 2,4-D causes brace root malformation, and is a consistent indicator of auxinic herbicide injury in corn. Brace root data (as seen in the table below) demonstrates that 2 of the 3 events tested were robustly tolerant to 2240 g ae/ha 2,4-D DMA. Event “pDAB4101(0)001.001” was apparently unstable; however, the other two events were robustly tolerant to 2,4-D and 2,4-D + imazethapyr or 2,4-D + glyphosate (see Table 16).

Table 16. Brace Root injury of <i>AAD-12</i> (<i>vl</i>) transformed T ₁ plants and Untransformed control corn plants. A scale of 0-10, 10 being the highest, was used for grading the 2,4-D DMA injury. Results are a visual average of four replications per treatment.				
Herbicide	Untransformed Control	<i>AAD-12</i> (<i>vl</i>) pDAB4101(0)003.003	<i>AAD-12</i> (<i>vl</i>) pDAB4101(0)001.001	<i>AAD-12</i> (<i>vl</i>) pDAB4101(0)005.001
	Average Brace Root Injury (0-10 Scale)			
0 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	0	0
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	9	1	8	0

[00274] 8.8 – *AAD-12* (*vl*) heritability in corn.

[00275] A progeny test was also conducted on seven *AAD-12* (*vl*) T₁ families that had been crossed with 5XH751. The seeds were planted in three-inch pots as described above. At the 3 leaf stage all plants were sprayed with 70 g ae/ha imazethapyr in the track sprayer as previously described. After 14 DAT, resistant and sensitive plants were counted. Four out of the six lines tested segregated as a single locus, dominant Mendelian trait (1R:1S) as determined by Chi square analysis. Surviving plants were subsequently sprayed with 2,4-D and all plants were deemed tolerant to 2,4-D (rates ≥ 560 g ae/ha). *AAD-12* is heritable as a robust aryloxyalkanoate auxin resistance gene in multiple species when reciprocally crossed to a commercial hybrid.

[00276] 8.9 – Stacking of *AAD-12* (*vl*) to increase herbicide spectrum

[00277] *AAD-12* (*vl*) (pDAB4101) and elite Roundup Ready inbred (BE1146RR) were reciprocally crossed and F₁ seed was collected. The seed from two F₁ lines were planted and treated with 70 g ae/ha imazethapyr at the V2 stage to eliminate nulls. To the surviving plants, reps were separated and either treated with 1120 g ae/ha 2,4-D DMA + 70 g ae/ha imazethapyr (to confirm presence of AHAS gene) or 1120 g ae/ha 2,4-D DMA + 1680 g ae/ha glyphosate (to confirm the presence of the Round Up Ready gene) in a track sprayer calibrated to 187 L/ha. Plants were graded 3 and 16 DAT. Spray data showed that *AAD-12* (*vl*) can be conventionally stacked with a glyphosate tolerance gene (such as the Roundup CP4-EPSPS gene) or other herbicide tolerance genes to provide an increased spectrum of herbicides that may be applied safely to corn. Likewise imidazolinone + 2,4-D + glyphosate

tolerance was observed in F₁ plants and showed no negative phenotype by the molecular or breeding stack combinations of these multiple transgenes.

Table 17. Data demonstrating increase herbicide tolerance spectrum resulting from an F₁ stack of *AAD-12 (v1)* and BE1146RR (an elite glyphosate tolerant inbred abbreviated as AF).

Herbicide	Untransformed Control	2P782 (Roundup Ready Control)	<i>AAD-12 (v1)</i> pDAB4101(0) 003.R003.AF	<i>AAD-12 (v1)</i> pDAB4101(0) 005.R001.AF
Average % Injury 16DAT				
0 g ae/ha 2,4-D DMA	0	0	0	0
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	21	19	0	0
1120 g ae/ha 2,4-D DMA + 70 g ae/ha imazethapyr	100	100	5	1
01120 g ae/ha 2,4-D DMA + 1680 g ae/ha glyphosate	100	71	2	5

[00278]

8.10- Field tolerance of pDAB4101 transformed corn plants to 2,4-D, triclopyr and fluroxypyr herbicides.

[00279]

Field level tolerance trials were conducted on two *AAD-12 (v1)* pDAB4101 events (4101(0)003.R.003.AF and 4101(0)005.R001.AF) and one Roundup Ready (RR) control hybrid (2P782) at Fowler, Indiana and Wayside, Mississippi. Seeds were planted with cone planter on 40-inch row spacing at Wayside and 30 inch spacing at Fowler. The experimental design was a randomized complete block design with 3 replications. Herbicide treatments were 2,4-D (dimethylamine salt) at 1120, 2240 and 4480 g ae/ha, triclopyr at 840 g ae/ha, fluroxypyr at 280 g ae/ha and an untreated control. The *AAD-12 (v1)* events contained the *AHAS* gene as a selectable marker. The F₂ corn events were segregating so the *AAD-12 (v1)* plants were treated with imazethapyr at 70 g ae/ha to remove the null plants. Herbicide treatments were applied when corn reached the V6 stage using compressed air backpack sprayer delivering 187 L/ha carrier volume at 130-200 kpa pressure. Visual injury ratings were taken at 7, 14 and 21 days after treatment. Brace root injury ratings were taken at 28DAT on a scale of 0-10 with 0-1 being slight brace root fusing, 1-3 being moderate brace root swelling/wandering and root proliferation, 3-5 being moderate brace root fusing, 5-9 severe brace root fusing and malformation and 10 being total inhibition of brace roots.

[00280]

AAD-12 (v1) event response to 2,4-D, triclopyr, and fluroxypyr at 14 days after treatment are shown in Table 18. Crop injury was most severe at 14 DAT. The RR control

corn (2P782) was severely injured (44% at 14 DAT) by 2,4-D at 4480 g ae/ha, which is 8 times (8X) the normal field use rate. The *AAD-12 (v1)* events all demonstrated excellent tolerance to 2,4-D at 14 DAT with 0% injury at the 1, 2 and 4X rates, respectively. The control corn (2P782) was severely injured (31% at 14 DAT) by the 2X rate of triclopyr (840 g ae/ha). *AAD-12 (v1)* events demonstrated tolerance at 2X rates of triclopyr with an average of 3% injury at 14 DAT across the two events. Fluroxypyr at 280 g ae/ha caused 11% visual injury to the wild-type corn at 14 DAT. *AAD-12 (v1)* events demonstrated increased tolerance with an average of 8% injury at 5 DAT.

[00281] Applications of auxinic herbicides to corn in the V6 growth stage can cause malformation of the brace roots. Table 18 shows the severity of the brace root injury caused by 2,4-D, triclopyr, and fluroxypyr. Triclopyr at 840 g ae/ha caused the most severe brace root fusing and malformation resulting in an average brace root injury score of 7 in the 2P782 control-type corn. Both *AAD-12 (v1)* corn events showed no brace root injury from the triclopyr treatment. Brace root injury in 2P782 corn increased with increasing rates of 2,4-D. At 4480 g ae/ha of 2,4-D, the *AAD-12* events showed no brace root injury; whereas, severe brace root fusing and malformation was seen in the 2P782 hybrid. Fluroxypyr caused only moderate brace root swelling and wandering in the wild-type corn with the *AAD-12 (v1)* events showing no brace root injury.

[00282] This data clearly shows that *AAD-12(v1)* conveys high level tolerance in corn to 2,4-D, triclopyr and fluroxypyr at rates far exceeding those commercially used and that cause non-*AAD-12 (v1)* corn severe visual and brace root injury.

Table 18. Visual Injury of *AAD-12* events and wild-type corn following foliar applications of 2,4-D, triclopyr and fluroxypyr under field conditions.

Treatment	Rate (g ae/ha)	%Visual Injury 14DAT		
		AAD-12 4101(0)003.R.003.AF	AAD- 124101(0)005.001.AF	2P782 control
Untreated	0	0	0	0
2,4-D	1120	0	0	9
2,4-D	2240	0	1	20
2,4-D	4480	0	1	34
Fluroxypyr	280	1	5	11
Triclopyr	840	3	4	31
Dicamba	840	8	8	11

Table 19. Brace root injury ratings for AAD-12 and wild-type corn plants in response to 2,4-D, triclopyr and fluroxypyr under field conditions.				
Brace Root Injury Rating (0-10 scale) 28DAT				
Treatment	Rate (g ae/ha)	AAD-12 event 4101(0)003.R.003.AF	AAD-12 event 4101(0)005.001.AF	Wild- type NK603
Untreated	0	0	0	0
2,4-D	1120	0	0	3
2,4-D	2240	0	0	5
2,4-D	4480	0	0	6
Fluroxypyr	280	0	0	2
Triclopyr	840	0	0	7
Dicamba	840	1	1	1

Example 9. Protein detection from transformed plants via antibody

[00283]

9.1 – Extracting AAD-12 (v1) from plant leaves.

Approximately 50 to 100 mg of leaf tissue was cut into small pieces (or 4 single-hole-punched leaf discs) and put into 2-ml cluster tubes containing 2 stainless steel BB beads (4.5 mm; Daisy Co., cat. #145462-000). Five hundred microliters of plant extraction buffer (PBS containing 0.05 % Tween 20 and 1% Bovine serum albumin) was added to each sample. The tubes were capped and secured in the Geno/Grinder (Model 2000-115, Certiprep, Metuchen, NJ) and shaken for 6 min with setting at 1x of 500 rpm. Tubes were centrifuged at 5000x g for 10 min and supernatant containing the soluble proteins were analyzed for AAD-12 (v1) using Western Blots and ELISA.

[00284]

9.2 – Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA).

[00285]

The assay was conducted at room temperature unless otherwise stated. One hundred micro-liter of purified anti-AAD-12 antibody (0.5 µg/ml) was coated on 96-well microtiter well and incubated at 4° C for 16 hours. The plate was washed four times with washing buffer (100 mM phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) containing 0.05% Tween 20) using a plate washer, followed by blocking with 4% skim milk dissolved in PBS for 1 hour. After washing, 100 µL standard AAD-12 of known concentrations or plant extracts from different samples were incubated in the wells. For standard curve, purified AAD-12 was diluted 2-fold serially from 52 to 0.813 ng/ml in triplicates. Plant extracts were diluted 5, 10, 20, and 40-fold in PBS and analyzed in duplicates. After 1 hour incubation, the plate was washed as above. One hundred micro-liter anti-AAD-12 antibody-HRP conjugate (0.5 ug/ml) was incubated in each well for 1 hour before washing. One hundred micro-liter HRP substrate, 1-

Step™ Ultra TMB-ELISA (Pierce, Rockford, IL), was incubated in each well for 10 minutes before the reaction was stopped by adding 100 µL 0.4N H₂SO₄. The OD of each well was measured using a microplate reader at 450 nm. To determine the concentrations of AAD-12 (v1) in plant extract, the OD value of duplicates were averaged and extrapolated from the standard curve using the Softmax® Pro ver. 4.0 (Molecular Devices).

[00286] For comparison, each sample was normalized with its fresh weight and percent expression was calculated.

[00287] 9.3 – Western blotting analysis.

[00288] Plant extracts or AAD-12 standards (5 and 0.5 µg/ml) were incubated with Laemmli sample buffer at 95° C for 10 minutes and electrophoretically separated in 8-16% Tris-Glycine Precast gel. Proteins were then electro-transferred onto nitrocellulose membrane using standard protocol. After blocking in 4% skim milk in PBS, AAD-12 (v1) protein was detected by anti-AAD-12 antiserum followed by goat anti-rabbit/HRP conjugates. The detected protein was visualized by chemiluminescence substrate ECL Western Analysis Reagent (Amersham, NJ).

Example 10 – Tobacco Transformation

[00289] Tobacco transformation with *Agrobacterium tumefaciens* was carried out by a method similar, but not identical, to published methods (Horsch *et al.*, 1988). To provide source tissue for the transformation, tobacco seed (*Nicotiana tabacum* cv. KY160) was surface sterilized and planted on the surface of TOB-medium, which is a hormone-free Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962) solidified with agar. Plants were grown for 6-8 weeks in a lighted incubator room at 28-30° C and leaves collected sterily for use in the transformation protocol. Pieces of approximately one square centimeter were sterily cut from these leaves, excluding the midrib. Cultures of the *Agrobacterium* strains (EHA101S containing pDAB3278, aka pDAS1580, AAD-12 (v1) + PAT), grown overnight in a flask on a shaker set at 250 rpm at 28° C, were pelleted in a centrifuge and resuspended in sterile Murashige & Skoog salts, and adjusted to a final optical density of 0.5 at 600 nm. Leaf pieces were dipped in this bacterial suspension for approximately 30 seconds, then blotted dry on sterile paper towels and placed right side up on TOB+ medium (Murashige and Skoog medium containing 1 mg/L indole acetic acid and 2.5 mg/L benzyladenine) and incubated in the dark at 28° C. Two days later the leaf pieces were moved to TOB+ medium containing

250 mg/L cefotaxime (Agri-Bio, North Miami, Florida) and 5 mg/L glufosinate ammonium (active ingredient in Basta, Bayer Crop Sciences) and incubated at 28-30°C in the light. Leaf pieces were moved to fresh TOB+ medium with cefotaxime and Basta twice per week for the first two weeks and once per week thereafter. Four to six weeks after the leaf pieces were treated with the bacteria, small plants arising from transformed foci were removed from this tissue preparation and planted into medium TOB-containing 250 mg/L cefotaxime and 10 mg/L Basta in Phytatray™ II vessels (Sigma). These plantlets were grown in a lighted incubator room. After 3 weeks, stem cuttings were taken and re-rooted in the same media. Plants were ready to send out to the greenhouse after 2-3 additional weeks.

[00290] Plants were moved into the greenhouse by washing the agar from the roots, transplanting into soil in 13.75 cm square pots, placing the pot into a Ziploc® bag (SC Johnson & Son, Inc.), placing tap water into the bottom of the bag, and placing in indirect light in a 30° C greenhouse for one week. After 3-7 days, the bag was opened; the plants were fertilized and allowed to grow in the open bag until the plants were greenhouse-acclimated, at which time the bag was removed. Plants were grown under ordinary warm greenhouse conditions (30° C, 16 hour day, 8 hour night, minimum natural + supplemental light = 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$).

[00291] Prior to propagation, T₀ plants were sampled for DNA analysis to determine the insert copy number. The *PAT* gene which was molecularly linked to *AAD-12* (*v1*) was assayed for convenience. Fresh tissue was placed into tubes and lyophilized at 4° C for 2 days. After the tissue was fully dried, a tungsten bead (Valenite) was placed in the tube and the samples were subjected to 1 minute of dry grinding using a Kelco bead mill. The standard DNeasy DNA isolation procedure was then followed (Qiagen, DNeasy 69109). An aliquot of the extracted DNA was then stained with Pico Green (Molecular Probes P7589) and read in the fluorometer (BioTek) with known standards to obtain the concentration in ng/ μl .

[00292] The DNA samples were diluted to 9 ng/ μl and then denatured by incubation in a thermocycler at 95° C for 10 minutes. Signal Probe mix was then prepared using the provided oligo mix and MgCl₂ (Third Wave Technologies). An aliquot of 7.5 μl was placed in each well of the Invader assay plate followed by an aliquot of 7.5 μl of controls, standards, and 20 ng/ μl diluted unknown samples. Each well was overlaid with 15 μl of mineral oil (Sigma). The plates were then incubated at 63° C for 1.5 hours and read on the fluorometer (Biotek). Calculation of % signal over background for the target probe divided by the %

signal over background internal control probe will calculate the ratio. The ratio of known copy standards developed and validated with southern blot analysis was used to identify the estimated copy of the unknown events.

[00293] All events were also assayed for the presence of the *AAD-12 (v1)* gene by PCR using the same extracted DNA samples. A total of 100 ng of total DNA was used as template. 20 mM of each primer was used with the Takara Ex Taq PCR Polymerase kit. Primers for the Plant Transcription Unit (PTU) PCR *AAD-12* were (SdpacodF: ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:12) and (SdpacodR: CGGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO:13). The PCR reaction was carried out in the 9700 Geneamp thermocycler (Applied Biosystems), by subjecting the samples to 94° C for 3 minutes and 35 cycles of 94° C for 30 seconds, 64° C for 30 seconds, and 72° C for 1 minute and 45 seconds followed by 72° C for 10 minutes. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with EtBr. Four to 12 clonal lineages from each of 18 PCR positive events with 1-3 copies of PAT gene (and presumably *AAD-12 (v1)* since these genes are physically linked) were regenerated and moved to the greenhouse.

[00294] 10.1 Postemergence herbicide tolerance in *AAD-12 (v1)* transformed T₀ tobacco

[00295] T₀ plants from each of the 19 events were challenged with a wide range of 2,4-D, triclopyr, or fluroxypyr sprayed on plants that were 3-4 inches tall. Spray applications were made as previously described using a track sprayer at a spray volume of 187 L/ha. 2,4-D dimethylamine salt (Riverside Corp) was applied at 0, 140, 560, or 2240 g ae/ha to representative clones from each event mixed in deionized water. Fluroxypyr was likewise applied at 35, 140, or 560 g ae/ha. Triclopyr was applied at 70, 280, or 1120 g ae/ha. Each treatment was replicated 1-3 times. Injury ratings were recorded 3 and 14 DAT. Every event tested was more tolerant to 2,4-D than the untransformed control line KY160. In several events, some initial auxinic herbicide-related epinasty occurred at doses of 560 g ae/ha 2,4-D or less. Some events were uninjured at 2,4-D applied at 2240 g ae/ha (equivalent to 4X field rate). On the whole, *AAD-12 (v1)* events were more sensitive to fluroxypyr, followed by triclopyr, and least affected by 2,4-D. The quality of the events with respect to magnitude of resistance was discerned using T₀ plant responses to 560 g ae/ha fluroxypyr. Events were categorized into "low" (>40% injury 14 DAT), "medium" (20-40% injury), "high" (<20% injury). Some events were inconsistent in response among replicates and were deemed "variable."

Table 20. Tobacco T0 events transformed with pDAS1580 (*AAD-12* (*v1*) + *PAT*)

#	Plant ID	Copy #	PTU PCR	Full PTU and	Full PTU and	Relative Herbicide Tolerance [@]
Tube		<i>PAT</i>	<i>AAD-12</i>	Under 2	1 copy	
1	1580[1]-001	6	+			Not tested
2	1580[1]-002	8	+			Not tested
3	1580[1]-003	10	+			Not tested
4	1580[1]-004	1	+	*	*	High
5	1580[1]-005	2	+	*		Variable
6	1580[1]-006	6	+			Not tested
7	1580[1]-007	4	+			Not tested
8	1580[1]-008	3	+			Variable
9	1580[1]-009	4	+			Not tested
10	1580[1]-010	8	+			Not tested
11	1580[1]-011	3	+			High
12	1580[1]-012	12	+			Not tested
13	1580[1]-013	13	+			Not tested
14	1580[1]-014	4	+			Not tested
15	1580[1]-015	2	+	*		High
16	1580[1]-016	1 ?	+	*	*	High
17	1580[1]-017	3	+			High
18	1580[1]-018	1	+	*	*	Variable
19	1580[1]-019	1	+	*	*	Variable
20	1580[1]-020	1	+	*	*	Not tested
21	1580[1]-021	1	+	*	*	Not tested
22	1580[1]-022	3	+			Variable
23	1580[1]-023	1	+	*	*	Variable
24	1580[1]-024	1	+	*	*	Variable
25	1580[1]-025	5	+			Not tested
26	1580[1]-026	3	+			Variable
27	1580[1]-027	3	+			Low
28	1580[1]-028	4	+			Not tested
29	1580[1]-029	3	+			Variable
30	1580[1]-030	1	+	*	*	High
31	1580[1]-031	1	+	*	*	High
32	1580[1]-032	2	+	*		High

@ Distinguishing herbicide tolerance performance of events required assessment of relative tolerance when treated with 560 g ae/ha fluroxypyr where tolerance was variable across events.

[00296] 10.2 Verification of high 2,4-D tolerance in T₁ tobacco.

[00297] Two to four T₀ individuals surviving high rates of 2,4-D and fluroxypyr were saved from each event and allowed to self fertilize in the greenhouse to give rise to T₁ seed. The T₁ seed was stratified, and sown into selection trays much like that of *Arabidopsis* (Example 7.4), followed by selective removal of untransformed nulls in this segregating population with 560 g ai/ha glufosinate (*PAT* gene selection). Survivors were transferred to individual 3-

inch pots in the greenhouse. These lines provided high levels of resistance to 2,4-D in the T₀ generation. Improved consistency of response is anticipated in T₁ plants not having come directly from tissue culture. These plants were compared against wildtype KY160 tobacco. All plants were sprayed with a track sprayer set at 187 L/ha. The plants were sprayed from a range of 140 - 2240 g ae/ha 2,4-D dimethylamine salt (DMA), 70-1120 g ae/ha triclopyr or 35-560 g ae/ha fluroxypyr. All applications were formulated in water. Each treatment was replicated 2-4 times. Plants were evaluated at 3 and 14 days after treatment. Plants were assigned injury rating with respect to stunting, chlorosis, and necrosis. The T₁ generation is segregating, so some variable response is expected due to difference in zygosity.

[00298] No injury was observed at 4X field rate (2240 g ae/ha) for 2,4-D or below. Some injury was observed with triclopyr treatments in one event line, but the greatest injury was observed with fluroxypyr. The fluroxypyr injury was short-lived and new growth on one event was nearly indistinguishable from the untreated control by 14 DAT (Table 21). It is important to note that untransformed tobacco is exceedingly sensitive to fluroxypyr. These results indicated commercial level 2,4-D tolerance can be provided by *AAD-12 (v1)*, even in a very auxin-sensitive dicot crop like tobacco. These results also show resistance can be imparted to the pyridyloxyacetic acid herbicides, triclopyr and fluroxypyr. Having the ability to prescribe treatments in an herbicide tolerant crop protected by *AAD-12* with various active ingredients having varying spectra of weed control is extremely useful to growers.

Table 21. Assessment of cross tolerance of <i>AAD-12 (v1)</i> T ₁ tobacco plants' response to various phenoxy and pyridyloxy auxin herbicides.			
Herbicide	KY160 – Wildtype	1580(1)-004 (high tolerance in T ₀ generation)	1580(1)-018 (high tolerance in T ₀ generation)
	Average % Injury of Replicates 14 DAT		
140 g ae/ha 2,4-D DMA	45	0	0
560 g ae/ha 2,4-D DMA	60	0	0
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	73	0	0
70 g ae/ha triclopyr	40	0	5
280 g ae/ha triclopyr	65	0	5
1120 g ae/ha triclopyr	80	0	8
35 g ae/ha fluroxypyr	85	0	8
140 g ae/ha fluroxypyr	93	0	10
560 g ae/ha fluroxypyr	100	3	18

[00299] 10.3 AAD-12 (v1) heritability in tobacco

[00300] A 100 plant progeny test was also conducted on seven T₁ lines of AAD-12 (v1) lines. The seeds were stratified, sown, and transplanted with respect to the procedure above with the exception that null plants were not removed by Liberty selection. All plants were then sprayed with 560 g ae/ha 2,4-D DMA as previously described. After 14 DAT, resistant and sensitive plants were counted. Five out of the seven lines tested segregated as a single locus, dominant Mendelian trait (3R:1S) as determined by Chi square analysis. AAD-12 is heritable as a robust aryloxyalkanoate auxin resistance gene in multiple species.

10.4 -- Field tolerance of pDAS1580 tobacco plants to 2,4-D, dichloprop, triclopyr and fluroxypyr herbicides.

[00301] Field level tolerance trials were conducted on three AAD-12 (v1) lines (events pDAS1580-[1]-018.001, pDAS1580-[1]-004.001 and pDAS1580-[1]-020.016) and one wild-type line (KY160) at field stations in Indiana and Mississippi. Tobacco transplants were grown in the greenhouse by planting T₁ seed in 72 well transplant flats (Hummert International) containing Metro 360 media according to growing conditions indicated above. The null plants were selectively removed by Liberty selection as previously described. The transplant plants were transported to the field stations and planted at either 14 or 24 inches apart using industrial vegetable planters. Drip irrigation at the Mississippi site and overhead irrigation at the Indiana site were used to keep plants growing vigorously.

[00302] The experimental design was a split plot design with 4 replications. The main plot was herbicide treatment and the sub-plot was tobacco line. The herbicide treatments were 2,4-D (dimethylamine salt) at 280, 560, 1120, 2240 and 4480 g ae/ha, triclopyr at 840 g ae/ha, fluroxypyr at 280 g ae/ha and an untreated control. Plots were one row by 25-30 ft. Herbicide treatments were applied 3-4 weeks after transplanting using compressed air backpack sprayer delivering 187 L/ha carrier volume at 130-200 kpa pressure. Visual rating of injury, growth inhibition, and epinasty were taken at 7, 14 and 21 days after treatment.

[00303] AAD-12 (v1) event response to 2,4-D, triclopyr, and fluroxypyr are shown in Table 22. The non-transformed tobacco line was severely injured (63% at 14 DAT) by 2,4-D at 560 g ae/ha which is considered the 1X field application rate. The AAD-12 (v1) lines all demonstrated excellent tolerance to 2,4-D at 14 DAT with average injury of 1, 4, and 4% injury observed at the 2, 4 and 8X rates, respectively. The non-transformed tobacco line was severely injured (53% at 14 DAT) by the 2X rate of triclopyr (840 g ae/ha); whereas, AAD-

12 (v1) lines demonstrated tolerance with an average of 5% injury at 14 DAT across the three lines. Fluroxypyr at 280 g ae/ha caused severe injury (99%) to the non-transformed line at 14 DAT. AAD-12 (v1) lines demonstrated increased tolerance with an average of 11% injury at 14 DAT.

[00304] These results indicate that AAD-12 (v1) transformed event lines displayed a high level of tolerance to 2,4-D, triclopyr and fluroxypyr at multiples of commercial use rates that were lethal or caused severe epinastic malformations to non-transformed tobacco under representative field conditions.

Table 22. AAD-12 (v1) tobacco plants response to 2,4-D, triclopyr, and fluroxypyr under field conditions.

Herbicide Treatment		Average % Injury across locations at 14 DAT			
Active Ingredient	Rate	Wild type	pDAS1580-[1]-004.001	pDAS1580-[1]-020.016	pDAS1580-[1]-018.001
2,4-D	280 GM AE/HA	48	0	0	0
2,4-D	560 GM AE/HA	63	0	0	2
2,4-D	1120 GM AE/HA	78	1	1	2
2,4-D	2240 GM AE/HA	87	4	4	4
2,4-D	4480 GM AE/HA	92	4	4	4
Triclopyr	840 GM AE/HA	53	5	5	4
Fluroxypyr	280 GM AE/HA	99	11	11	12

[00305] 10.5 AAD-12 (v1) protection against elevated 2,4-D rates

[00306] Results showing AAD-12 (v1) protection against elevated rates of 2,4-D DMA in the greenhouse are shown in Table 23. T₁ AAD-12 (v1) plants from an event segregating 3R:1S when selected with 560 g ai/ha Liberty using the same protocol as previously described. T₁ AAD-1 (v3) seed was also planted for transformed tobacco controls (see PCT/US2005/014737). Untransformed KY160 was served as the sensitive control. Plants were sprayed using a track sprayer set to 187 L/ha at 140, 560, 2240, 8960, and 35840 g ae/ha 2,4-D DMA and rated 3 and 14 DAT.

[00307] AAD-12 (v1) and AAD-1 (v3) both effectively protected tobacco against 2,4-D injury at doses up to 4X commercial use rates. AAD-12 (v1), however, clearly demonstrated a marked advantage over AAD-1 (v3) by protecting up to 64X the standard field rates.

Table 23. Results demonstrating protection provided by <i>AAD-12</i> (v1) and <i>AAD-1</i> (v3) against elevated rates of 2,4-D.			
	KY160 control	<i>AAD-1</i> (v3)	<i>AAD-12</i> (v1)
Treatment	Average % injury 14 DAT		
2240 g ae/ha 2,4-D	95	4	0
8960 g ae/ha 2,4-D	99	9	0
35840 g ae/ha 2,4-D	100	32	4

[00308]

10.6 Stacking of *AAD-12* to increase herbicide spectrum

[00309]

Homozygous *AAD-12* (v1) (pDAS1580) and *AAD-1* (v3) (pDAB721) plants (see PCT/US2005/014737 for the latter) were both reciprocally crossed and F₁ seed was collected. The F₁ seed from two reciprocal crosses of each gene were stratified and treated 4 reps of each cross were treated under the same spray regime as used for the other testing with one of the following treatments: 70, 140, 280 g ae/ha fluroxypyr (selective for the *AAD-12* (v1) gene); 280, 560, 1120 g ae/ha R-dichloroprop (selective for the *AAD-1* (v3) gene); or 560, 1120, 2240 g ae/ha 2,4-D DMA (to confirm 2,4-D tolerance). Homozygous T₂ plants of each gene were also planted for use as controls. Plants were graded at 3 and 14 DAT. Spray results are shown in Table 24.

[00310]

The results confirm that *AAD-12* (v1) can be successfully stacked with *AAD-1* (v3), thus increasing the spectrum herbicides that may be applied to the crop of interest (phenoxyacetic acids + phenoxypropionic acids vs phenoxyacetic acids + pyridyloxyacetic acids for *AAD-1* and *AAD-12*, respectively). The complementary nature of herbicide cross resistance patterns allows convenient use of these two genes as complementary and stackable field-selectable markers. In crops where tolerance with a single gene may be marginal, one skilled in the art recognizes that one can increase tolerance by stacking a second tolerance gene for the same herbicide. Such can be done using the same gene with the same or different promoters; however, as observed here, stacking and tracking two complementary traits can be facilitated by the distinguishing cross protection to phenoxypropionic acids [from *AAD-1* (v3)] or pyridyloxyacetic acids [*AAD-12* (v1)]

Table 24. Comparison of auxinic herbicide cross tolerance of *AAD-12 (v1)* (pDAS1580) and *AAD-1 (v3)* (pDAB721) T₂ plants compared to AAD-12 x AAD-1 F₁ cross and to wildtype.

<u>Treatment</u>	KY160 wildtype control	<i>AAD-12 (v1)</i> (pDAS1580)	<i>AAD-1 (v3)</i> (pDAB721)	<i>AAD-12 (v1)</i> x <i>AAD (v3)</i> F ₁
	Average % injury 14 DAT			
560 g ae/ha 2,4-D	63	0	0	0
1120 g ae/ha 2,4-D	80	0	4	0
2240 g ae/ha 2,4-D	90	0	2	0
280 g ae/ha R-dichlorprop	25	15	0	0
560 g ae/ha R-dichlorprop	60	50	0	0
1120 g ae/ha R-dichlorprop	80	70	3	0
70 g ae/ha fluroxypyr	40	0	40	0
140 g ae/ha fluroxypyr	65	0	60	0
280 g ae/ha fluroxypyr	75	3	75	3

Example 11 - Soybean Transformation

[00311] Soybean improvement via gene transfer techniques has been accomplished for such traits as herbicide tolerance (Padgett *et al.*, 1995), amino acid modification (Falco *et al.*, 1995), and insect resistance (Parrott *et al.*, 1994). Introduction of foreign traits into crop species requires methods that will allow for routine production of transgenic lines using selectable marker sequences, containing simple inserts. The transgenes should be inherited as a single functional locus in order to simplify breeding. Delivery of foreign genes into cultivated soybean by microprojectile bombardment of zygotic embryo axes (McCabe *et al.*, 1988) or somatic embryogenic cultures (Finer and McMullen, 1991), and *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary explants (Hinchee *et al.*, 1988) or zygotic embryos (Chee *et al.*, 1989) have been reported.

[00312] Transformants derived from *Agrobacterium*-mediated transformations tend to possess simple inserts with low copy number (Birch, 1991). There are benefits and disadvantages associated with each of the three target tissues investigated for gene transfer into soybean,

zygotic embryonic axis (Chee *et al.*, 1989; McCabe *et al.*, 1988), cotyledon (Hinchee *et al.*, 1988) and somatic embryogenic cultures (Finer and McMullen, 1991). The latter have been extensively investigated as a target tissue for direct gene transfer. Embryogenic cultures tend to be quite prolific and can be maintained over a prolonged period. However, sterility and chromosomal aberrations of the primary transformants have been associated with age of the embryogenic suspensions (Singh *et al.*, 1998) and thus continuous initiation of new cultures appears to be necessary for soybean transformation systems utilizing this tissue. This system needs a high level of 2,4-D, 40 mg/L concentration, to initiate the embryogenic callus and this poses a fundamental problem in using the *AAD-12 (v1)* gene since the transformed locus could not be developed further with 2,4-D in the medium. So, the meristem based transformation is ideal for the development of 2,4-D resistant plant using *AAD-12 (v1)*.

[00313] 11.1 Gateway cloning of binary constructs

[00314] The *AAD-12 (v1)* coding sequence was cloned into five different Gateway Donor vectors containing different plant promoters. The resulting *AAD-12 (v1)* plant expression cassettes were subsequently cloned into a Gateway Destination Binary vector via the LR Clonase reaction (Invitrogen Corporation, Carlsbad Ca, Cat # 11791-019).

[00315] An NcoI – SacI fragment containing the *AAD-12 (v1)* coding sequence was digested from DASPICO12 and ligated into corresponding NcoI – SacI restriction sites within the following Gateway Donor vectors: pDAB3912 (attL1 // CsVMV promoter // AtuORF23 3'UTR // attL2); pDAB3916 (attL1 // AtUbi10 promoter // AtuORF23 3'UTR // attL2); pDAB4458 (attL1 // AtUbi3 promoter // AtuORF23 3'UTR // attL2); pDAB4459 (attL1 // ZmUbi1 promoter // AtuORF23 3'UTR // attL2); and pDAB4460 (attL1 // AtAct2 promoter // AtuORF23 3'UTR // attL2). The resulting constructs containing the following plant expression cassettes were designated: pDAB4463 (attL1 // CsVMV promoter // *AAD-12 (v1)* // AtuORF23 3'UTR // attL2); pDAB4467 (attL1 // AtUbi10 promoter // *AAD-12 (v1)* // AtuORF23 3'UTR // attL2); pDAB4471 (attL1 // AtUbi3 promoter // *AAD-12 (v1)* // AtuORF23 3'UTR // attL2); pDAB4475 (attL1 // ZmUbi1 promoter // *AAD-12 (v1)* // AtuORF23 3'UTR // attL2); and pDAB4479 (attL1 // AtAct2 promoter // *AAD-12 (v1)* // AtuORF23 3'UTR // attL2). These constructs were confirmed via restriction enzyme digestion and sequencing.

[00316] The plant expression cassettes were recombined into the Gateway Destination Binary vector pDAB4484 (RB7 MARv3 // attR1 – ccdB – chloramphenicol resistance – attR2 //

CsVMV promoter // PATv6 // AtuORF1 3'UTR) via the Gateway LR Clonase reaction. Gateway Technology uses lambda phage-based site-specific recombination instead of restriction endonuclease and ligase to insert a gene of interest into an expression vector. Invitrogen Corporation, Gateway Technology: A Universal Technology to Clone DNA Sequences for Functional Analysis and Expression in multiple Systems, Technical Manual, Catalog #'s 12535-019 and 12535-027, Gateway Technology Version E, 9/22/2003, #25-022. The DNA recombination sequences (attL, and attR,) and the LR Clonase enzyme mixture allows any DNA fragment flanked by a recombination site to be transferred into any vector containing a corresponding site. The attL1 site of the donor vector corresponds with attR1 of the binary vector. Likewise, the attL2 site of the donor vector corresponds with attR2 of the binary vector. Using the Gateway Technology the plant expression cassette (from the donor vector) which is flanked by the attL sites can be recombined into the attR sites of the binary vector. The resulting constructs containing the following plant expression cassettes were labeled as: pDAB4464 (RB7 MARv3 // CsVMV promoter // *AAD-12 (v1)* // AtuORF23 3'UTR // CsVMV promoter // PATv6 // AtuORF1 3'UTR); pDAB4468 (RB7 MARv3 // AtUbi10 promoter // *AAD-12 (v1)* // AtuORF23 3'UTR // CsVMV promoter // PATv6 // AtuORF1 3'UTR); pDAB4472 (RB7 MARv3 // AtUbi3 promoter // *AAD-12 (v1)* // AtuORF23 3'UTR // CsVMV promoter // PATv6 // AtuORF1 3'UTR); pDAB4476 (RB7 MARv3 // ZmUbi1 promoter // *AAD-12 (v1)* // AtuORF23 3'UTR // CsVMV promoter // PATv6 // AtuORF1 3'UTR); and pDAB4480 (RB7 MARv3 // AtAct2 promoter // *AAD-12 (v1)* // AtuORF23 3'UTR // CsVMV promoter // PATv6 // AtuORF1 3'UTR) (see Table 8). These constructs were confirmed via restriction enzyme digestion and sequencing.

[00317] 11.2 Transformation Method 1: cotyledonary node transformation of soybean mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

[00318] The first reports of soybean transformation targeted meristematic cells in the cotyledonary node region (Hinchee *et al.*, 1988) and shoot multiplication from apical meristems (McCabe *et al.*, 1988). In the *A. tumefaciens*-based cotyledonary node method, explant preparation and culture media composition stimulate proliferation of auxiliary meristems in the node (Hinchee *et al.*, 1988). It remains unclear whether a truly dedifferentiated, but totipotent, callus culture is initiated by these treatments. The recovery of multiple clones of a transformation event from a single explant and the infrequent recovery of chimeric plants (Clemente *et al.*, 2000; Olhoft *et al.*, 2003) indicates a single cell origin

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

[00319] 11.2.1 – Plant transformation production of AAD-12 (v1) tolerant phenotypes. Seed derived explants of “Maverick” and the *Agrobacterium* mediated cot-node transformation protocol was used to produce AAD-12 (v1) transgenic plants.

[00320] 11.2.2– *Agrobacterium* preparation and inoculation

[00321] *Agrobacterium* strain EHA101 (Hood *et al.* 1986), carrying each of five binary pDAB vectors (Table 8) was used to initiate transformation. Each binary vector contains the AAD-12 (v1) gene and a plant-selectable gene (*PAT*) cassette within the T-DNA region. Each gene is driven by the promoters listed in Table 8 and these plasmids were mobilized into the EHA101 strain of *Agrobacterium* by electroporation. The selected colonies were then analyzed for the integration of genes before the *Agrobacterium* treatment of the soybean explants. Maverick seeds were used in all transformation experiments and the seeds were obtained from University of Missouri, Columbia, MO.

[00322] *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) using the *PAT* gene as a selectable marker coupled with the herbicide glufosinate as a selective agent was carried out followed a modified procedure of Zeng *et al.* (2004). The seeds were germinated on B5 basal medium (Gamborg *et al.* 1968) solidified with 3 g/L Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.); added l-cysteine to the co-cultivation medium at 400 mg/L and co-cultivation

lasted 5 days (Olhoft and Somers 2001); shoot initiation, shoot elongation, and rooting media were supplemented with 50 mg/L cefotaxime, 50 mg/L timentin, 50 mg/L vancomycin, and solidified with 3 g/L Phytigel. Selected shoots were then transferred to the rooting medium. The optimal selection scheme was the use of glufosinate at 8 mg/L across the first and second shoot initiation stages in the medium and 3–4 mg/L during shoot elongation in the medium.

[00323] Prior to transferring elongated shoots (3–5 cm) to rooting medium, the excised end of the internodes were dipped in 1 mg/L indole 3-butyric acid for 1–3 min to promote rooting (Khan et al. 1994). The shoots struck roots in 25×100 mm glass culture tubes containing rooting medium and then they were transferred to soil mix for acclimatization of plantlets in Metro-mix 200 (Hummert International, Earth City, Mo.) in open Magenta boxes in Conviron. Glufosinate, the active ingredient of Liberty herbicide (Bayer Crop Science), was used for selection during shoot initiation and elongation. The rooted plantlets were acclimated in open Magenta boxes for several weeks before they were screened and transferred to the greenhouse for further acclimation and establishment.

[00324] 11.2.3 - Assay of putatively transformed plantlets, and analyses established T₀ plants in the greenhouse.

[00325] The terminal leaflets of selected leaves of these plantlets were leaf painted with 50 mg/L of glufosinate twice with a week interval to observe the results to screen for putative transformants. The screened plantlets were then transferred to the greenhouse and after acclimation the leaves were painted with glufosinate again to confirm the tolerance status of these plantlets in the GH and deemed to be putative transformants.

[00326] Plants that are transferred to the greenhouse can be assayed for the presence of an active *PAT* gene further with a non-destructive manner by painting a section of leaf of the T₀ primary transformant, or progeny thereof, with a glufosinate solution [0.05-2% v/v Liberty Herbicide, preferably 0.25-1.0% (v/v), =500-2000 ppm glufosinate, Bayer Crop Science]. Depending on the concentration used, assessment for glufosinate injury can be made 1-7 days after treatment. Plants can also be tested for 2,4-D tolerance in a non-destructive manner by selective application of a 2,4-D solution in water (0.25-1% v/v commercial 2,4-D dimethylamine salt formulation, preferably 0.5% v/v = 2280 ppm 2,4-D ae) to the terminal leaflet of the newly expanding trifoliolate one or two, preferably two, nodes below the youngest emerging trifoliolate. This assay allows assessment of 2,4-D sensitive plants 6 hours to several days after application by assessment of leaf flipping or rotation >90 degrees from

the plane of the adjacent leaflets. Plants tolerant to 2,4-D will not respond to 2,4-D. T₀ plants will be allowed to self fertilize in the greenhouse to give rise to T₁ seed. T₁ plants (and to the extent enough T₀ plant clones are produced) will be sprayed with a range of herbicide doses to determine the level of herbicide protection afforded by *AAD-12* (v1) and *PAT* genes in transgenic soybean. Rates of 2,4-D used on T₀ plants will typically comprise one or two selective rates in the range of 100-1120 g ae/ha using a track sprayer as previously described. T₁ plants will be treated with a wider herbicide dose ranging from 50-3200 g ae/ha 2,4-D. Likewise, T₀ and T₁ plants can be screened for glufosinate resistance by postemergence treatment with 200-800 and 50-3200 g ae/ha glufosinate, respectively. Glyphosate resistance (in plants transformed with constructs that contain EPSPS) or another glyphosate tolerance gene can be assessed in the T₁ generation by postemergence applications of glyphosate with a dose range from 280-2240 g ae/ha glyphosate. Analysis of protein expression will occur as described in below. Individual T₀ plants were assessed for the presence of the coding region of the gene of interest (*AAD-12* (v1) or *PAT* v6) and copy number. Determination of the inheritance of *AAD-12* (v1) will be made using T₁ and T₂ progeny segregation with respect to herbicide tolerance as described in previous examples.

[00327] A subset of the initial transformants were assessed in the T₀ generation according to the methods above. Any plant confirmed as having the *AAD-12* (v1) coding region, regardless of the promoter driving the gene did not respond to the 2,4-D leaf painting whereas wildtype Maverick soybeans did (Table Sec 11.2.3). *PAT*-only transformed plants responded the same at wildtype plants to leaf paint applications of 2,4-D

[00328] 2,4-D was applied to a subset of the plants that were of similar size to the wildtype control plants with either 560 or 1120 g ae 2,4-D. All *AAD-12* (v1)-containing plants were clearly resistant to the herbicide application versus the wildtype Maverick soybeans. A slight level of injury (2 DAT) was observed for two *AAD-12* (v1) plants, however, injury was temporary and no injury was observed 7 DAT. Wildtype control plants were severely injured 7-14 DAT at 560 g ae/ha 2,4-D and killed at 1120 g ae/ha. These data are consistent with the fact that *AAD-12* (v1) can impart high tolerance (>2X field rates) to a sensitive crop like soybeans. The screened plants were then sampled for molecular and biochemical analyses for the confirmation of the *AAD12* (v1) genes integration, copy number, and their gene expression levels as described below and reported in Table 25.

Table 25. T₀ soybean response to 2,4-D leaf paint and 2,4-D spray application.

Table 25. T ₀ soybean response to 2,4-D leaf paint and 2,4-D spray application.															
Construct (pDAB#)	Leaf flip assay														
	Gene	Promoter	Event	LEAF PAINTED	Node		Spray POST over the top with 2,4-D (g aei/ha)		Stage at appl (# nodes)	ELISA] (ng/mL)	Southern Copy number	PCR coding region	% injury 2 DAT	% injury 7 DAT	% injury 14 DAT
					N-1	N-2									
4464	AAD-12	CsVMV	D-1-14	N-1	0		0	>10	5246.83	2	+	X	X	0	
4464	AAD-12	CsVMV	D-2-9	N-2		0	0	>10	204.27	1	+	X	X	0	
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-7	N-2		0	0	>10	4.65	1	+	0	0	0	
4468	AAD-12	AtUbi10	D-4-11B	N-2		0	0	8	1452.84	2	+	0	0	0	
4468	AAD-12	AtUbi10	D-4-16	N-2		0	0	>10	653.21	2	+	X	X	0	
4480	AAD-12	AtAct2	D-9-1	N-2		0	0	>10	248.33	3 or 4	+	X	X	0	
4464	AAD-12	CsVMV	D-2-14	N-2		0	560	7	4917.43	2	+	0	0	0	
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-5	N-2		0	560	8	365.75	1	+	0	0	0	
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-6	N-1	0		560	5	714.79	3	+	0	0	0	
4472	AAD-12	AtUbi3	D-5-2	N-1	0		560	6	0.58	1	+	5	0	0	
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-9	N-2		0	1120	6	2657.26	3	+	0	0	0	
4468	AAD-12	AtUbi10	D-4-17	N-2		0	1120	7	286.14	5	+	5	0	0	
4499	PAT	CsVMV	D-2-3	N-2		1	0	>10	2.36	5	+	X	X	0	
Maverick	WT		WT-10	NT		1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Maverick	WT		WT-2	NT		1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Maverick	WT		WT-3	NT			0	4	ND	ND	ND	0	0	0	
Maverick	WT		WT-4	NT			0	4	ND	ND	ND	0	0	0	
Maverick	WT		WT-5	NT			560	4	ND	ND	ND	50	60	60	
Maverick	WT		WT-6	NT			560	4	ND	ND	ND	70	90	80	
Maverick	WT		WT-7	NT			560	4	ND	ND	ND	70	80	80	
Maverick	WT		WT-10	NT			1120	4	ND	ND	ND	70	90	100	
Maverick	WT		WT-8	NT			1120	4	ND	ND	ND	70	95	100	
Maverick	WT		WT-9	NT			1120	4	ND	ND	ND	70	95	100	
					1=Flip 0=No Flip			ND=Not determined							

[00329] 11.2.4- Molecular Analyses: Soybean

[00330] 11.2.4.1- Tissue harvesting DNA isolation and quantification. Fresh tissue is placed into tubes and lyophilized at 4° C for 2 days. After the tissue is fully dried, a tungsten bead (Valenite) is placed in the tube and the samples are subjected to 1 minute of dry grinding using a Kelco bead mill. The standard DNeasy DNA isolation procedure is then followed (Qiagen, DNeasy 69109). An aliquot of the extracted DNA is then stained with Pico Green (Molecular Probes P7589) and read in the fluorometer (BioTek) with known standards to obtain the concentration in ng/ μ L.

[00331] 11.2.4.2- Polymerase chain reaction. A total of 100 ng of total DNA is used as the template. 20 mM of each primer is used with the Takara Ex Taq PCR Polymerase kit (Mirus TAKRR001A). Primers for the *AAD-12* (v1) PTU are (Forward – ATAATGCCAGC CTGTAAACGCC) (SEQ ID NO:8) and (Reverse – CTCAAGCATATGAATGACCT CGA) (SEQ ID NO:9). The PCR reaction is carried out in the 9700 Geneamp thermocycler (Applied Biosystems), by subjecting the samples to 94° C for 3 minutes and 35 cycles of 94° C for 30 seconds, 63° C for 30 seconds, and 72° C for 1 minute and 45 seconds followed by 72° C for 10 minutes. Primers for Coding Region PCR AAD-12 (v1) are (Forward – ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEQ ID NO:10) and (Reverse – CGGGC AGGCCTAACTCCACCAA) (SEQ ID NO:11). The PCR reaction is carried out in the 9700 Geneamp thermocycler (Applied Biosystems), by subjecting the samples to 94° C for 3 minutes and 35 cycles of 94° C for 30 seconds, 65° C for 30 seconds, and 72° C for 1 minute and 45 seconds followed by 72° C for 10 minutes. PCR products are analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with EtBr.

[00332] 11.2.4.3- Southern blot analysis. Southern blot analysis is performed with total DNA obtained from Qiagen DNeasy kit. A total of 10 μ g of genomic DNA is subjected to an overnight digestion to obtain integration data. After the overnight digestion an aliquot of ~100 ng is run on a 1% gel to ensure complete digestion. After this assurance the samples are run on a large 0.85 % agarose gel overnight at 40 volts. The gel is then denatured in 0.2 M NaOH, 0.6 M NaCl for 30 minutes. The gel is then neutralized in 0.5 M Tris HCl, 1.5 M NaCl pH of 7.5 for 30 minutes. A gel apparatus containing 20x SSC is then set up to obtain a gravity gel to nylon membrane (Millipore INYC00010) transfer overnight. After the overnight transfer the membrane is then subjected to UV light via a crosslinker (Stratagene

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

[00333] 11.2.5 – Biochemical Analyses: Soybean

[00334] 11.2.5.1 – Tissue Sampling and Extracting AAD-12 (v1) protein from soybean leaves.

Approximately 50 to 100 mg of leaf tissue was sampled from the N-2 leaves that were 2,4-D leaf painted, but after 1 DAT. The terminal N-2 leaflet was removed and either cut into small pieces or 2-single-hole- punched leaf discs (~0.5 cm in diameter) and were frozen on dry ice instantly. Further protein analysis (ELISA and Western analysis) was completed according to methods described in Example 9.

[00335] 11.2.6 – T₁ Progeny evaluation. T₀ plants will be allowed to self fertilize to derive T₁ families. Progeny testing (segregation analysis) will be assayed using glufosinate at 560 g ai/ha as the selection agent applied at the V1-V2 growth stage. Surviving plants will be further assayed for 2,4-D tolerance at one or more growth stages from V2-V6. Seed will be produced through self fertilization to allow broader herbicide testing on the transgenic soybean.

[00336] *AAD-12 (v1)* transgenic Maverick soybean plants have been generated thorough *Agrobacterium*- mediated cot-node transformation system. The T₀ plants obtained tolerated up to 2X levels of 2,4-D field applications and developed fertile seeds. The frequency of fertile transgenic soybean plants was up to 5.9%. The integration of the *AAD1-12 (v1)* gene into the soybean genome was confirmed by Southern blot analysis. This analysis indicated that most of the transgenic plants contained a low copy number. The plants screened with

AAD-12 (v1) antibodies showed positive for ELISA and the appropriate band in Western analysis.

[00337] 11.3 Transformation Method 2: Aerosol-beam mediated transformation of embryogenic soybean callus tissue.

[00338] Culture of embryogenic soybean callus tissue and subsequent beaming can be accomplished as described in U.S. Patent No. 6,809,232 (Held *et al.*) to create transformants using one or more constructs in Table 8.

[00339] 11.4 Transformation Method 3. Biolistic bombardment of Soybean

[00340] This can be accomplished using mature seed derived embryonic axes meristem (McCabe *et al.* (1988)). Following established methods of biolistic bombardment, one can expect recovery of transformed soyben plants. Once plants are regenerated and evaluation of events could occur as described in Example 11.2.

[00341] 11.5 Transformation Method 4. Whiskers mediated transformation.

[00342] Whisker preparation and whisker transformation can anticipated according to methods described previously by Terakawa *et al.* (2005)). Following established methods of biolistic bombardment, one can expect recovery of transformed soyben plants. Once plants are regenerated and evaluation of events could occur as described in Example 11.2.

[00343] Maverick seeds were surface-sterilized in 70% ethanol for 1 min followed by immersion in 1% sodium hypochlorite for 20 min. and then rinsed three times in sterile distilled water. The seeds were soaked in distilled water for 18–20 h. The embryonic axes were excised from seeds, and the apical meristems were exposed by removing the primary leaves. The embryonic axes were positioned in the bombardment medium [BM: MS (Murashige and Skoog 1962) basal salts medium, 3% sucrose and 0.8% phytigel Sigma, pH 5.7] with the apical region directed upwards in 5-cm culture dishes containing 12 ml culture medium.

[00344] 11.6 Transformation Method 5. Particle bombardment-mediated transformation for embryogenic callus tissue can be optimized for according to previous methods (Khalafalla *et al.*, 2005; El-Shemy *et al.*, 2004, 2006). Regenrated plants can also be assessed according to Example 11.2.

Example 12–*AAD-12 (v1)* in Cotton

[00345] 12.1 – Cotton transformation protocol.

[00346] Cotton seeds (Co310 genotype) are surface-sterilized in 95% ethanol for 1 minute, rinsed, sterilized with 50% commercial bleach for twenty minutes, and then rinsed 3 times with sterile distilled water before being germinated on G-media (Table 26) in Magenta GA-7 vessels and maintained under high light intensity of 40-60 $\mu\text{E}/\text{m}^2$, with the photoperiod set at 16 hours of light and 8 hours dark at 28° C.

[00347] Cotyledon segments (~5mm) square are isolated from 7-10 day old seedlings into liquid M liquid media (Table 26) in Petri plates (Nunc, item #0875728). Cut segments are treated with an *Agrobacterium* solution (for 30 minutes) then transferred to semi-solid M-media (Table 26) and undergo co-cultivation for 2-3 days. Following co-cultivation, segments are transferred to MG media (Table 26). Carbenicillin is the antibiotic used to kill the *Agrobacterium* and glufosinate-ammonium is the selection agent that would allow growth of only those cells that contain the transferred gene.

[00348] Agrobacterium preparation. Inoculate 35ml of Y media (Table 26) (containing streptomycin (100 mg/ml stock) and erythromycin (100 mg/ml stock)), with one loop of bacteria to grow overnight in the dark at 28° C, while shaking at 150 rpm. The next day, pour the *Agrobacterium* solution into a sterile oakridge tube (Nalge-Nunc, 3139-0050), and centrifuge for in Beckman J2-21 at 8,000 rpm for 5 minutes. Pour off the supernatant and resuspend the pellet in 25 ml of M liquid (Table 26) and vortex. Place an aliquot into a glass culture tube (Fisher, 14-961-27) for Klett reading (Klett-Summerson, model 800-3). Dilute the new suspension using M liquid media to a Klett-meter reading of 10^8 colony forming units per ml with a total volume of 40 ml.

[00349] After three weeks, callus from the cotyledon segments is isolated and transferred to fresh MG media. The callus is transferred for an additional 3 weeks on MG media. In a side-by-side comparison, MG media can be supplemented with dichlorprop (added to the media at a concentration of 0.01 and 0.05mg/L) to supplement for the degradation of the 2,4-D, since dichlorprop is not a substrate for the AAD-12 enzyme, however dichlorprop is more active on cotton than 2,4-D. In a separate comparison, segments which were plated on MG media containing no growth regulator compared to standard MG media, showed reduced callusing, but there still is callus growth. Callus is then transferred to CG-media (Table 26), and transferred again to fresh selection medium after three weeks. After another three weeks the callus tissue is transferred to D media (Table 26) lacking plant growth regulators for embryogenic callus induction. After 4-8 weeks on this media, embryogenic callus is formed,



and can be distinguished from the non-embryogenic callus by its yellowish-white color and granular cells. Embryos start to regenerate soon after and are distinct green in color. Cotton can take time to regenerate and form embryos, one of the ways to speed up this process is to stress the tissue. Dessication is a common way to accomplish this, via changes in the microenvironment of the tissue and plate, by using less culture media and/or adopting various modes of plate enclosure (taping versus parafilm).

[00350] Larger, well-developed embryos are isolated and transferred to DK media (Table 26) for embryo development. After 3 weeks (or when the embryos have developed), germinated embryos are transferred to fresh media for shoot and root development. After 4-8 weeks, any well-developed plants are transferred into soil and grown to maturity. Following a couple of months, the plant has grown to a point that it can be sprayed to determine if it has resistance to 2,4-D.

[00351] 12.2 – Cell transformation.

[00352] Several experiments were initiated in which cotyledon segments were treated with *Agrobacterium* containing pDAB724. Over 2000 of the resulting segments were treated using various auxin options for the proliferation of pDAB724 cotton callus, either: 0.1 or 0.5mg/L R-dichlorprop, standard 2,4-D concentration and no auxin treatment. The callus was selected on glufosinate-ammonium, due to the inclusion of the *PAT* gene in the construct. Callus line analysis in the form of PCR and Invader will be used to determine if and to be sure the gene was present at the callus stage; then callus lines that are embryogenic will be sent for Western analysis, essentially as described in section 11.2.3. Embryogenic cotton callus was stressed using dessication techniques to improve the quality and quantity of the tissue recovered.

[00353] Almost 200 callus events have been screened for intact PTU and expression using Western analysis for the *AAD-12 (v1)* gene. Below is a subset of the data for some of the cotton callus that has been tested.

Construct	Line Number	AAD-12 PTU	AAD-12 Invader	AAD-12 ng/ml
pDAB724	1	+	+	79.89
pDAB724	2	+	+	17.34
pDAB724	3	+	+	544.80
pDAB724	4	+	+	32.63
pDAB724	5	+	+	82.77
pDAB724	83	+	+	795.50
pDAB724	84	+	+	613.35
pDAB724	85	+	+	1077.75
pDAB724	86	+	+	437.74
pDAB724	87	+	+	286.51
pDAB724	88	+	+	517.59
pDAB724	89	+	+	1250.70

[00354] 12.3 – Plant regeneration.

[00355] *AAD-12 (v1)* cotton lines that have produced plants according to the above protocol will be sent to the greenhouse. To demonstrate the *AAD-12 (v1)* gene provides resistance to 2,4-D in cotton, both the *AAD-12 (v1)* cotton plant and wild-type cotton plants will be sprayed with a track sprayer delivering 560 g ae/ha 2,4-D at a spray volume of 187 L/ha. The plants will be evaluated at 3 and 14 days after treatment. Plants surviving a selective rate of 2,4-D will be self pollinated to create T₁ seed or outcrossed with an elite cotton line to produce F₁ seed. The subsequent seed produced will be planted and evaluated for herbicide

resistance as previously described. AAD-12 (v1) events can be combined with other desired HT or IR traits as described in experiments 18, 19, 22, and 23.

Example 13 – *Agrobacterium* Transformation of Other Crops

[00356] In light of the subject disclosure, additional crops can be transformed according to the subject invention using techniques that are known in the art. For *Agrobacterium*-mediated transformation of rye, *see, e.g.*, Popelka and Altpeter (2003). For *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean, *see, e.g.*, Hinchee *et al.*, 1988. For *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum, *see, e.g.*, Zhao *et al.*, 2000. For *Agrobacterium*-mediated transformation of barley, *see, e.g.*, Tingay *et al.*, 1997. For *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat, *see, e.g.*, Cheng *et al.*, 1997. For *Agrobacterium*-mediated transformation of rice, *see, e.g.*, Hiei *et al.*, 1997.

[00357] The Latin names for these and other plants are given below. It should be clear that these and other (non-*Agrobacterium*) transformation techniques can be used to transform AAD-12 (v1), for example, into these and other plants, including but not limited to Maize (*Zea mays*), Wheat (*Triticum* spp.), Rice (*Oryza* spp. and *Zizania* spp.), Barley (*Hordeum* spp.), Cotton (*Abroma augusta* and *Gossypium* spp.), Soybean (*Glycine max*), Sugar and table beets (*Beta* spp.), Sugar cane (*Arenga pinnata*), Tomato (*Lycopersicon esculentum* and other spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* and other spp., and *Cyphomandra betacea*), Potato (*Solanum tuberosum*), Sweet potato (*Ipomoea batatas*), Rye (*Secale* spp.), Peppers (*Capsicum annuum*, *sinense*, and *frutescens*), Lettuce (*Lactuca sativa*, *perennis*, and *pulchella*), Cabbage (*Brassica* spp.), Celery (*Apium graveolens*), Eggplant (*Solanum melongena*), Peanut (*Arachis hypogaea*), Sorghum (all *Sorghum* species), Alfalfa (*Medicago sativa*), Carrot (*Daucus carota*), Beans (*Phaseolus* spp. and other genera), Oats (*Avena sativa* and *strigosa*), Peas (*Pisum*, *Vigna*, and *Tetragonolobus* spp.), Sunflower (*Helianthus annuus*), Squash (*Cucurbita* spp.), Cucumber (*Cucumis sativa*), Tobacco (*Nicotiana* spp.), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), Turfgrass (*Lolium*, *Agrostis*, *Poa*, *Cynodon*, and other genera), Clover (*Trifolium*), Vetch (*Vicia*). Such plants, with AAD-12 (v1) genes, for example, are included in the subject invention.

[00358] AAD-12 (v1) has the potential to increase the applicability of key auxinic herbicides for in-season use in many deciduous and evergreen timber cropping systems. Triclopyr, 2,4-D, and/or fluroxypyr resistant timber species would increase the flexibility of over-the-top use of these herbicides without injury concerns. These species would include, but not limited

to: Alder (*Alnus spp.*), ash (*Fraxinus spp.*), aspen and poplar species (*Populus spp.*), beech (*Fagus spp.*), birch (*Betula spp.*), cherry (*Prunus spp.*), eucalyptus (*Eucalyptus spp.*), hickory (*Carya spp.*), maple (*Acer spp.*), oak (*Quercus spp.*), and pine (*Pinus spp.*). Use of auxin resistance for the selective weed control in ornamental and fruit-bearing species is also within the scope of this invention. Examples could include, but not be limited to, rose (*Rosa spp.*), burning bush (*Euonymus spp.*), petunia (*Petunia spp.*), begonia (*Begonia spp.*), rhododendron (*Rhododendron spp.*), crabapple or apple (*Malus spp.*), pear (*Pyrus spp.*), peach (*Prunus spp.*), and marigolds (*Tagetes spp.*).

Example 14 – Further Evidence of Surprising Results: AAD-12 vs. AAD-2

[00359] 14.1 – AAD-2 (v1) initial cloning.

[00360] Another gene was identified from the NCBI database (see the ncbi.nlm.nih.gov website; accession #AP005940) as a homologue with only 44% amino acid identity to *tfdA*. This gene is referred to herein as AAD-2 (v1) for consistency. Percent identity was determined by first translating both the AAD-2 and *tfdA* DNA sequences (SEQ ID NO:12 of PCT/US2005/014737 and GENBANK Accession No. M16730, respectively) to proteins (SEQ ID NO:13 of PCT/US2005/014737 and GENBANK Accession No. M16730, respectively), then using ClustalW in the VectorNTI software package to perform the multiple sequence alignment.

[00361] The strain of *Bradyrhizobium japonicum* containing the AAD-2 (v1) gene was obtained from Northern Regional Research Laboratory (NRRL, strain #B4450). The lyophilized strain was revived according to NRRL protocol and stored at -80° C in 20% glycerol for internal use as Dow Bacterial strain DB 663. From this freezer stock, a plate of Tryptic Soy Agar was then struck out with a loopful of cells for isolation, and incubated at 28° C for 3 days. A single colony was used to inoculate 100 ml of Tryptic Soy Broth in a 500 ml tri-baffled flask, which was incubated overnight at 28° C on a floor shaker at 150 rpm. From this, total DNA was isolated with the gram negative protocol of Qiagen's DNeasy kit (Qiagen cat. #69504). The following primers were designed to amplify the target gene from genomic DNA, Forward: 5' ACT AGT AAC AAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA CGA T 3' [(brjap 5'(speI) SEQ ID NO:14 of PCT/US2005/014737 (added Spe I restriction site and Ribosome Binding Site (RBS))] and Reverse: 5' TTC TCG AGC TAT CAC TCC GCC GCC

TGC TGC TGC 3' [(br jap 3' (xhoI) SEQ ID NO:15 of PCT/US2005/014737 (added a Xho I site)].

[00362] Fifty microliter reactions were set up as follows: Fail Safe Buffer 25 µl, ea. primer 1 µl (50 ng/µl), gDNA 1 µl (200 ng/µl), H₂O 21 µl, Taq polymerase 1 µl (2.5 units/µl). Three Fail Safe Buffers—A, B, and C—were used in three separate reactions. PCR was then carried out under the following conditions: 95° C 3.0 minutes heat denature cycle; 95° C 1.0 minute, 50° C 1.0 minute, 72° C 1.5 minutes, for 30 cycles; followed by a final cycle of 72° C 5 minutes, using the FailSafe PCR System (Epicenter cat. #FS99100). The resulting ~1 kb PCR product was cloned into pCR 2.1 (Invitrogen cat. #K4550-40) following the included protocol, with chemically competent TOP10F' *E. coli* as the host strain, for verification of nucleotide sequence.

[00363] Ten of the resulting white colonies were picked into 3 µl Luria Broth + 1000 µg/ml Ampicillin (LB Amp), and grown overnight at 37° C with agitation. Plasmids were purified from each culture using Nucleospin Plus Plasmid Miniprep Kit (BD Biosciences cat. #K3063-2) and following included protocol. Restriction digestion of the isolated DNA's was completed to confirm the presence of the PCR product in the pCR2.1 vector. Plasmid DNA was digested with the restriction enzyme EcoRI (New England Biolabs cat. #R0101S). Sequencing was carried out with Beckman CEQ Quick Start Kit (Beckman Coulter cat. #608120) using M13 Forward [5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'] (SEQ ID NO:6) and Reverse [5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'] (SEQ ID NO:7) primers, per manufacturers instructions. This gene sequence and its corresponding protein was given a new general designation *AAD-2 (v1)* for internal consistency.

[00364] 14.2 – Completion of *AAD-2 (v1)* binary vector.

[00365] The *AAD-2 (v1)* gene was PCR amplified from pDAB3202. During the PCR reaction alterations were made within the primers to introduce the AflIII and SacI restriction sites in the 5' primer and 3' primer, respectively. See PCT/US2005/014737. The primers "NcoI of Brady" [5' TAT ACC ACA TGT CGA TCG CCA TCC GGC AGC TT 3'] (SEQ ID NO:14) and "SacI of Brady" [5' GAG CTC CTA TCA CTC CGC CGC CTG CTG CTG CAC 3'] (SEQ ID NO:15) were used to amplify a DNA fragment using the Fail Safe PCR System (Epicentre). The PCR product was cloned into the pCR2.1 TOPO TA cloning vector (Invitrogen) and sequence verified with M13 Forward and M13 Reverse primers using the Beckman Coulter "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" sequencing

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

[00366] 14.3 – Evaluation of transformed *Arabidopsis*.

[00367] Freshly harvested T₁ seed transformed with a plant optimized *AAD-12* (v1) or native *AAD-2* (v1) gene were planted and selected for resistance to glufosinate as previously described. Plants were then randomly assigned to various rates of 2,4-D (50-3200 g ae/ha). Herbicide applications were applied by track sprayer in a 187 L/ha spray volume. 2,4-D used was the commercial dimethylamine salt formulation (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO) mixed in 200 mM Tris buffer (pH 9.0) or 200 mM HEPES buffer (pH7.5).

[00368] *AAD-12* (v1) and *AAD-2* (v1) did provide detectable 2,4-D resistance versus the transformed and untransformed control lines; however, individual constructs were widely variable in their ability to impart 2,4-D resistance to individual T₁ *Arabidopsis* plants. Surprisingly, *AAD-2* (v1) and *AAD-2* (v2) transformants were far less resistant to 2,4-D than the *AAD-12* (v1) gene, both from a frequency of highly tolerant plants as well as overall average injury. No plants transformed with *AAD-2* (v1) survived 200 g ae/ha 2,4-D relatively uninjured (<20% visual injury), and overall population injury was about 83% (see PCT/US2005/014737). Conversely, *AAD-12* (v1) had a population injury average of about 6% when treated with 3,200 g ae/ha 2,4-D (Table 11). Tolerance improved slightly for plant-optimized *AAD-2* (v2) versus the native gene; however, comparison of both *AAD-12* and *AAD-2* plant optimized genes indicates a significant advantage for *AAD-12* (v1) *in planta*.

[00369] These results are unexpected given that the *in vitro* comparison of *AAD-2* (v1) (see PCT/US2005/014737) and *AAD-12* (v2) indicated both were highly efficacious at degrading 2,4-D and both shared an S-type specificity with respect to chiral aryloxyalkanoate substrates. *AAD-2* (v1) is expressed in individual T₁ plants to varying levels; however, little protection

from 2,4-D injury is afforded by this expressed protein. No substantial difference was evident in protein expression level (*in planta*) for the native and plant optimized *AAD-2* genes (see PCT/US2005/014737). These data corroborate earlier findings that make the functional expression of *AAD-12* (*v1*) *in planta*, and resulting herbicide resistance to 2,4-D and pyridyloxyacetate herbicides, unexpected.

Example 15 – Preplant Burndown Applications

[00370] This and the following Examples are specific examples of novel herbicide uses made possible by the subject *AAD-12* invention.

[00371] Preplant burndown herbicide applications are intended to kill weeds that have emerged over winter or early spring prior to planting a given crop. Typically these applications are applied in no-till or reduced tillage management systems where physical removal of weeds is not completed prior to planting. An herbicide program, therefore, must control a very wide spectrum of broadleaf and grass weeds present at the time of planting. Glyphosate, gramoxone, and glufosinate are examples of non-selective, non-residual herbicides widely used for preplant burndown herbicide applications. Some weeds, however, are difficult to control at this time of the season due to one or more of the following: inherent insensitivity of the weed species or biotype to the herbicide, relatively large size of winter annual weeds, and cool weather conditions limiting herbicide uptake and activity. Several herbicide options are available to tankmix with these herbicides to increase spectrum and activity on weeds where the non-selective herbicides are weak. An example would be 2,4-D tankmix applications with glyphosate to assist in the control of *Conyza canadensis* (horseweed). Glyphosate can be used from 420 to 1680 g ae/ha, more typically 560 to 840 g ae/ha, for the preplant burndown control of most weeds present; however, 280 – 1120 g ae/ha of 2,4-D can be applied to aid in control of many broadleaf weed species (e.g., horseweed). 2,4-D is an herbicide of choice because it is effective on a very wide range of broadleaf weeds, effective even at low temperatures, and extremely inexpensive. However, if the subsequent crop is a sensitive dicot crop, 2,4-D residues in the soil (although short-lived) can negatively impact the crop. Soybeans are a sensitive crop and require a minimum time period of 7 days (for 280 g ae/ha 2,4-D rate) to at least 30 days (for 2,4-D applications of 1120 g ae/ha) to occur between burndown applications and planting. 2,4-D is prohibited as a burndown treatment prior to cotton planting (see federal labels, most are available through

CPR, 2005 or online at cdms.net/manuf/manuf.asp). With *AAD-12 (v1)* transformed cotton or soybeans, these crops should be able to survive 2,4-D residues in the soil from burndown applications applied right up to and even after planting before emergence of the crop. The increased flexibility and reduced cost of tankmix (or commercial premix) partners will improve weed control options and increase the robustness of burndown applications in important no-till and reduced tillage situations. This example is one of many options that will be available. Those skilled in the art of weed control will note a variety of other applications including, but not limited to gramoxone + 2,4-D or glufosinate + 2,4-D by utilizing products described in federal herbicide labels (CPR, 2005) and uses described in Agrilience Crop Protection Guide (2005), as examples. Those skilled in the art will also recognize that the above example can be applied to any 2,4-D-sensitive (or other phenoxy auxin herbicide) crop that would be protected by the *AAD-12 (v1)* gene if stably transformed. Likewise, the unique attributes of *AAD-12* allowing degradation of triclopyr and fluroxypyr increase utility by allowing substitution or tank mixes of 70-1120 or 35-560 g ae/ha of triclopyr and fluroxypyr, respectively, to increase spectrum and/or increase the ability to control perennial or viney weed species.

Example 16 – In-Crop Use of Phenoxy Auxins Herbicides in Soybeans, Cotton, and Other Dicot Crops Transformed Only with *AAD-12 (v1)*

[00372] *AAD-12 (v1)* can enable the use of phenoxy auxin herbicides (*e.g.*, 2,4-D and MCPA) and pyridyloxy auxins (triclopyr and fluroxypyr) for the control of a wide spectrum of broadleaf weeds directly in crops normally sensitive to 2,4-D. Application of 2,4-D at 280 to 2240 g ae/ha would control most broadleaf weed species present in agronomic environments. More typically, 560 – 1120 g ae/ha is used. For triclopyr, application rates would typically range from 70-1120 g ae/ha, more typically 140-420 g ae/ha. For fluroxypyr, application rates would typically range from 35-560 g ae/ha, more typically 70-280 ae/ha.

[00373] An advantage to this additional tool is the extremely low cost of the broadleaf herbicide component and potential short-lived residual weed control provided by higher rates of 2,4-D, triclopyr, and fluroxypyr when used at higher rates, whereas a non-residual herbicide like glyphosate would provide no control of later germinating weeds. This tool also provides a mechanism to combine herbicide modes of action with the convenience of HTC as an integrated herbicide resistance and weed shift management strategy.

[00374] A further advantage this tool provides is the ability to tankmix broad spectrum broadleaf weed control herbicides (e.g., 2,4-D, triclopyr and fluroxypyr) with commonly used residual weed control herbicides. These herbicides are typically applied prior to or at planting, but often are less effective on emerged, established weeds that may exist in the field prior to planting. By extending the utility of these aryloxy auxin herbicides to include at-plant, preemergence, or pre-plant applications, the flexibility of residual weed control programs increases. One skilled in the art would recognize the residual herbicide program will differ based on the crop of interest, but typical programs would include herbicides of the chloracetamide and dinitroaniline herbicide families, but also including herbicides such as clomazone, sulfentrazone, and a variety of ALS-inhibiting PPO-inhibiting, and HPPD-inhibiting herbicides.

[00375] Further benefits could include tolerance to 2,4-D, triclopyr or fluroxypyr required before planting following aryloxyacetic acid auxin herbicide application (*see* previous example); and fewer problems from contamination injury to dicot crops resulting from incompletely cleaned bulk tanks that had contained 2,4-D, triclopyr or fluroxypyr. Dicamba (and many other herbicides) can still be used for the subsequent control of *AAD-12 (v1)*-transformed dicot crop volunteers.

[00376] Those skilled in the art will also recognize that the above example can be applied to any 2,4-D-sensitive (or other aryloxy auxin herbicide) crop that would be protected by the *AAD-12 (v1)* gene if stably transformed. One skilled in the art of weed control will now recognize that use of various commercial phenoxy or pyridyloxy auxin herbicides alone or in combination with a herbicide is enabled by *AAD-12 (v1)* transformation. Specific rates of other herbicides representative of these chemistries can be determined by the herbicide labels compiled in the CPR (Crop Protection Reference) book or similar compilation or any commercial or academic crop protection references such as the Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-12 (v1)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 17 - In-Crop Use of Phenoxy Auxin and Pyridyloxy Auxin Herbicides in *AAD-12 (v1)* Only Transformed Corn, Rice, and Other Monocot Species

[00377] In an analogous fashion, transformation of grass species (such as, but not limited to, corn, rice, wheat, barley, or turf and pasture grasses) with *AAD-12 (v1)* would allow the use of highly efficacious phenoxy and pyridyloxy auxins in crops where normally selectivity is not certain. Most grass species have a natural tolerance to auxinic herbicides such as the phenoxy auxins (i.e., 2,4-D,). However, a relatively low level of crop selectivity has resulted in diminished utility in these crops due to a shortened window of application timing or unacceptable injury risk. *AAD-12 (v1)*-transformed monocot crops would, therefore, enable the use of a similar combination of treatments described for dicot crops such as the application of 2,4-D at 280 to 2240 g ae/ha to control most broadleaf weed species. More typically, 560 – 1120 g ae/ha is used. For triclopyr, application rates would typically range from 70-1120 g ae/ha, more typically 140-420 g ae/ha. For fluroxypyr, application rates would typically range from 35-560 g ae/ha, more typically 70-280 ae/ha.

[00378] An advantage to this additional tool is the extremely low cost of the broadleaf herbicide component and potential short-lived residual weed control provided by higher rates of 2,4-D, triclopyr, or fluroxypyr. In contrast, a non-residual herbicide like glyphosate would provide no control of later-germinating weeds. This tool would also provide a mechanism to rotate herbicide modes of action with the convenience of HTC as an integrated-herbicide-resistance and weed-shift-management strategy in a glyphosate tolerant crop/*AAD-12 (v1)* HTC combination strategy, whether one rotates crops species or not.

[00379] A further advantage this tool provides is the ability to tankmix broad spectrum broadleaf weed control herbicides (e.g., 2,4-D, triclopyr and fluroxypyr) with commonly used residual weed control herbicides. These herbicides are typically applied prior to or at planting, but often are less effective on emerged, established weeds that may exist in the field prior to planting. By extending the utility of these aryloxy auxin herbicides to include at-plant, preemergence, or pre-plant applications, the flexibility of residual weed control programs increases. One skilled in the art would recognize the residual herbicide program will differ based on the crop of interest, but typical programs would include herbicides of the chloracetmide and dinitroaniline herbicide families, but also including herbicides such as clomazone, sulfentrazone, and a variety of ALS-inhibiting PPO-inhibiting, and HPPD-inhibiting herbicides.

[00380] The increased tolerance of corn, rice, and other monocots to the phenoxy or pyridyloxy auxins shall enable use of these herbicides in-crop without growth stage

restrictions or the potential for crop leaning, unfurling phenomena such as "rat-tailing," crop leaning, growth regulator-induced stalk brittleness in corn, or deformed brace roots. Each alternative herbicide enabled for use in HTC's by *AAD-12 (v1)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 18 – *AAD-12 (v1)* Stacked With Glyphosate Tolerance Trait in Any Crop

[00381] The vast majority of cotton, canola, corn, and soybean acres planted in North America contain a glyphosate tolerance (GT) trait, and adoption of GT corn is on the rise. Additional GT crops (e.g., wheat, rice, sugar beet, and turf) have been under development but have not been commercially released to date. Many other glyphosate resistant species are in experimental to development stage (e.g., alfalfa, sugar cane, sunflower, beets, peas, carrot, cucumber, lettuce, onion, strawberry, tomato, and tobacco; forestry species like poplar and sweetgum; and horticultural species like marigold, petunia, and begonias; isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005 on the World Wide Web). GTC's are valuable tools for the sheer breadth of weeds controlled and convenience and cost effectiveness provided by this system. However, glyphosate's utility as a now-standard base treatment is selecting for glyphosate resistant weeds. Furthermore, weeds that glyphosate is inherently less efficacious on are shifting to the predominant species in fields where glyphosate-only chemical programs are being practiced. By stacking *AAD-12 (v1)* with a GT trait, either through conventional breeding or jointly as a novel transformation event, weed control efficacy, flexibility, and ability to manage weed shifts and herbicide resistance development could be improved. As mentioned in previous examples, by transforming crops with *AAD-12 (v1)*, monocot crops will have a higher margin of phenoxy or pyridyloxy auxin safety, and phenoxy auxins can be selectively applied in dicot crops. Several scenarios for improved weed control options can be envisioned where *AAD-12 (v1)* and a GT trait are stacked in any monocot or dicot crop species:

- a) Glyphosate can be applied at a standard postemergent application rate (420 to 2160 g ae/ha, preferably 560 to 840 g ae/ha) for the control of most grass and broadleaf weed species. For the control of glyphosate resistant broadleaf weeds like *Conyza canadensis* or weeds inherently difficult to control with glyphosate (e.g., *Commelina* spp, *Ipomoea* spp, etc), 280-2240 g ae/ha (preferably 560-1120 g ae/ha) 2,4-D can be applied sequentially, tank mixed,

or as a premix with glyphosate to provide effective control. For triclopyr, application rates would typically range from 70-1120 g ae/ha, more typically 140-420 g ae/ha. For fluroxypyr, application rates would typically range from 35-560 g ae/ha, more typically 70-280 ae/ha.

- b) Currently, glyphosate rates applied in GTC's generally range from 560 to 2240 g ae/ha per application timing. Glyphosate is far more efficacious on grass species than broadleaf weed species. *AAD-12 (v1)* + GT stacked traits would allow grass-effective rates of glyphosate (105-840 g ae/ha, more preferably 210-420 g ae/ha). 2,4-D (at 280-2240 g ae/ha, more preferably 560-1120 g ae/ha) could then be applied sequentially, tank mixed, or as a premix with grass-effective rates of glyphosate to provide necessary broadleaf weed control. Triclopyr and fluroxypyr at rates mentioned above would be acceptable components in the treatment regimen. The low rate of glyphosate would also provide some benefit to the broadleaf weed control; however, primary control would be from the 2,4-D, triclopyr, or fluroxypyr.

[00382] One skilled in the art of weed control will recognize that use of one or more commercial aryloxy auxin herbicides alone or in combination (sequentially or independently) is enabled by *AAD-12 (v1)* transformation into crops. Specific rates of other herbicides representative of these chemistries can be determined by the herbicide labels compiled in the CPR (Crop Protection Reference) book or similar compilation, labels compiled online (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp), or any commercial or academic crop protection guides such as the Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Each alternative herbicide enabled for use in HTC's by *AAD-12 (v1)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 19 - *AAD-12 (v1)* Stacked with Glufosinate Tolerance Trait in Any Crop

[00383] Glufosinate tolerance (*PAT* or *bar*) is currently present in a number of crops planted in North America either as a selectable marker for an input trait like insect resistance proteins or specifically as an HTC trait. Crops include, but are not limited to, glufosinate tolerant canola, corn, and cotton. Additional glufosinate tolerant crops (e.g., rice, sugar beet, soybeans, and turf) have been under development but have not been commercially released to date. Glufosinate, like glyphosate, is a relatively non-selective, broad spectrum grass and

broadleaf herbicide. Glufosinate's mode of action differs from glyphosate. It is faster acting, resulting in desiccation and "burning" of treated leaves 24-48 hours after herbicide application. This is advantageous for the appearance of rapid weed control. However, this also limits translocation of glufosinate to meristematic regions of target plants resulting in poorer weed control as evidenced by relative weed control performance ratings of the two compounds in many species (Agrilience, 2005).

[00384] By stacking *AAD-12 (v1)* with a glufosinate tolerance trait, either through conventional breeding or jointly as a novel transformation event, weed control efficacy, flexibility, and ability to manage weed shifts and herbicide resistance development could be improved. Several scenarios for improved weed control options can be envisioned where *AAD-12 (v1)* and a glufosinate tolerance trait are stacked in any monocot or dicot crop species:

- a) Glufosinate can be applied at a standard postemergent application rate (200 to 1700 g ae/ha, preferably 350 to 500 g ae/ha) for the control of many grass and broadleaf weed species. To date, no glufosinate-resistant weeds have been confirmed; however, glufosinate has a greater number of weeds that are inherently more tolerant than does glyphosate.
- i) Inherently tolerant broadleaf weed species (e.g., *Cirsium arvensis*, *Apocynum cannabinum*, and *Conyza canadensis*) could be controlled by tank mixing 280-2240 g ae/ha, more preferably 560-2240 g ae/ha, 2,4-D for effective control of these more difficult-to-control perennial species and to improve the robustness of control on annual broadleaf weed species. Triclopyr and fluroxypyr would be acceptable components to consider in the weed control regimen. For triclopyr, application rates would typically range from 70-1120 g ae/ha, more typically 140-420 g ae/ha. For fluroxypyr, application rates would typically range from 35-560 g ae/ha, more typically 70-280 ae/ha.
- b) A multiple combination of glufosinate (200-500 g ae/ha) +/- 2,4-D (280-1120 g ae/ha) +/- triclopyr or fluroxypyr (at rates listed above), for example, could provide more robust, overlapping weed control spectrum. Additionally, the overlapping spectrum provides an additional mechanism for the management or delay of herbicide resistant weeds.

[00385] One skilled in the art of weed control will recognize that use of one or more commercial aryloxyacetic auxin herbicides alone or in combination (sequentially or independently) is enabled by *AAD-12 (v1)* transformation into crops. Specific rates of other herbicides representative of these chemistries can be determined by the herbicide labels compiled in the CPR (Crop Protection Reference) book or similar compilation, labels compiled online (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp), or any commercial or academic crop protection guides such as the Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-12 (v1)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 20 - *AAD-12 (v1)* Stacked with *AHAS* Trait in Any Crop

[00386] Imidazolinone herbicide tolerance (*AHAS*, *et al.*) is currently present in a number of crops planted in North America including, but not limited to, corn, rice, and wheat. Additional imidazolinone tolerant crops (e.g., cotton and sugar beet) have been under development but have not been commercially released to date. Many imidazolinone herbicides (e.g., imazamox, imazethapyr, imazaquin, and imazapic) are currently used selectively in various conventional crops. The use of imazethapyr, imazamox, and the non-selective imazapyr has been enabled through imidazolinone tolerance traits like *AHAS et al.* This chemistry class also has significant soil residual activity, thus being able to provide weed control extended beyond the application timing, unlike glyphosate or glufosinate-based systems. However, the spectrum of weeds controlled by imidazolinone herbicides is not as broad as glyphosate (Agrilience, 2005). Additionally, imidazolinone herbicides have a mode of action (inhibition of acetolactate synthase, ALS) to which many weeds have developed resistance (Heap, 2005). By stacking *AAD-12 (v1)* with an imidazolinone tolerance trait, either through conventional breeding or jointly as a novel transformation event, weed control efficacy, flexibility, and ability to manage weed shifts and herbicide resistance development could be improved. As mentioned in previous examples, by transforming crops with *AAD-12 (v1)*, monocot crops will have a higher margin of phenoxy or pyridyloxy auxin safety, and these auxins can be selectively applied in dicot crops. Several scenarios for improved weed control options can be envisioned where *AAD-12 (v1)* and an imidazolinone tolerance trait are stacked in any monocot or dicot crop species:

- a) Imazethapyr can be applied at a standard postemergent application rate of (35 to 280 g ae/ha, preferably 70-140 g ae/ha) for the control of many grass and broadleaf weed species.
 - i) ALS-inhibitor resistant broadleaf weeds like *Amaranthus rudis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album* (among others, Heap, 2005) could be controlled by tank mixing 280-2240 g ae/ha, more preferably 560-1120 g ae/ha, 2,4-D. For triclopyr, application rates would typically range from 70-1120 g ae/ha, more typically 140-420 g ae/ha. For fluroxypyr, application rates would typically range from 35-560 g ae/ha, more typically 70-280 ae/ha.
 - ii) Inherently more tolerant broadleaf species to imidazolinone herbicides like *Ipomoea spp.* can also be controlled by tank mixing 280-2240 g ae/ha, more preferably 560-1120 g ae/ha, 2,4-D. See rates above for triclopyr or fluroxypyr.
- b) A mulitple combination of imazethapyr (35 to 280 g ae/ha, preferably 70-140 g ae/ha) +/- 2,4-D (280-1120 g ae/ha) +/- triclopyr or fluroxypyr (at rates listed above), for example, could provide more robust, overlapping weed control spectrum. Additionally, the overlapping spectrum provides an additional mechanism for the management or delay of herbicide resistant weeds.

[00387] One skilled in the art of weed control will recognize that use of any of various commercial imidazolinone herbicides, phenoxyacetic or pyridyloxyacetic auxin herbicides, alone or in multiple combinations, is enabled by *AAD-12 (v1)* transformation and stacking with any imidazolinone tolerance trait either by conventional breeding or genetic engineering. Specific rates of other herbicides representative of these chemistries can be determined by the herbicide labels compiled in the CPR (Crop Protection Reference) book or similar compilation, labels compiled online (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp), or any commercial or academic crop protection guides such as the Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Each alternative herbicide enabled for use in HTC's by *AAD-12 (v1)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 21 – *AAD-12 (v1)* in Rice

[00388] 21.1 – Media description.

- a) Imazethapyr can be applied at a standard postemergent application rate of (35 to 280 g ae/ha, preferably 70-140 g ae/ha) for the control of many grass and broadleaf weed species.
 - i) ALS-inhibitor resistant broadleaf weeds like *Amaranthus rudis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album* (among others, Heap, 2005) could be controlled by tank mixing 280-2240 g ae/ha, more preferably 560-1120 g ae/ha, 2,4-D. For triclopyr, application rates would typically range from 70-1120 g ae/ha, more typically 140-420 g ae/ha. For fluroxypyr, application rates would typically range from 35-560 g ae/ha, more typically 70-280 ae/ha.
 - ii) Inherently more tolerant broadleaf species to imidazolinone herbicides like *Ipomoea spp.* can also be controlled by tank mixing 280-2240 g ae/ha, more preferably 560-1120 g ae/ha, 2,4-D. See rates above for triclopyr or fluroxypyr.
- b) A mulitple combination of imazethapyr (35 to 280 g ae/ha, preferably 70-140 g ae/ha) +/- 2,4-D (280-1120 g ae/ha) +/- triclopyr or fluroxypyr (at rates listed above), for example, could provide more robust, overlapping weed control spectrum. Additionally, the overlapping spectrum provides an additional mechanism for the management or delay of herbicide resistant weeds.

[00387]

One skilled in the art of weed control will recognize that use of any of various commercial imidazolinone herbicides, phenoxyacetic or pyridyloxyacetic auxin herbicides, alone or in multiple combinations, is enabled by *AAD-12 (v1)* transformation and stacking with any imidazolinone tolerance trait either by conventional breeding or genetic engineering. Specific rates of other herbicides representative of these chemistries can be determined by the herbicide labels compiled in the CPR (Crop Protection Reference) book or similar compilation, labels compiled online (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp), or any commercial or academic crop protection guides such as the Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Each alternative herbicide enabled for use in HTC's by *AAD-12 (v1)*, whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 21 – *AAD-12 (v1)* in Rice

[00388]

21.1 – Media description.

[00389] Culture media employed were adjusted to pH 5.8 with 1 M KOH and solidified with 2.5 g/L Phytigel (Sigma). Embryogenic calli were cultured in 100 x 20 mm Petri dishes containing 40 ml semi-solid medium. Rice plantlets were grown on 50 ml medium in Magenta boxes. Cell suspensions were maintained in 125-ml conical flasks containing 35 ml liquid medium and rotated at 125 rpm. Induction and maintenance of embryogenic cultures took place in the dark at 25–26° C, and plant regeneration and whole-plant culture took place in a 16-h photoperiod (Zhang *et al.* 1996).

[00390] Induction and maintenance of embryogenic callus took place on NB basal medium as described previously (Li *et al.* 1993), but adapted to contain 500 mg/L glutamine. Suspension cultures were initiated and maintained in SZ liquid medium (Zhang *et al.* 1998) with the inclusion of 30 g/L sucrose in place of maltose. Osmotic medium (NBO) consisted of NB medium with the addition of 0.256 M each of mannitol and sorbitol. Hygromycin-B-resistant callus was selected on NB medium supplemented with 50 mg/L hygromycin B for 3–4 weeks. Pre-regeneration took place on medium (PRH50) consisting of NB medium without 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), but with the addition of 2 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP), 1 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA), 5 mg/L abscisic acid (ABA) and 50 mg/L hygromycin B for 1 week. Regeneration of plantlets followed via culture on regeneration medium (RNH50) comprising NB medium without 2,4-D, and supplemented with 3 mg/L BAP, 0.5 mg/L NAA, and 50 mg/L hygromycin B until shoots regenerated. Shoots were transferred to rooting medium with half-strength Murashige and Skoog basal salts and Gamborg's B5 vitamins, supplemented with 1% sucrose and 50 mg/L hygromycin B (1/2MSH50).

[00391] 21.2 – Tissue culture development.

[00392] Mature desiccated seeds of *Oryza sativa* L. japonica cv. Taipei 309 were sterilized as described in Zhang *et al.* 1996. Embryogenic tissues were induced by culturing sterile mature rice seeds on NB medium in the dark. The primary callus approximately 1 mm in diameter, was removed from the scutellum and used to initiate cell suspension in SZ liquid medium. Suspensions were then maintained as described in Zhang 1995. Suspension-derived embryogenic tissues were removed from liquid culture 3–5 days after the previous subculture and placed on NBO osmotic medium to form a circle about 2.5 cm across in a Petri dish and cultured for 4 h prior to bombardment. Sixteen to 20 h after bombardment, tissues were transferred from NBO medium onto NBH50 hygromycin B selection medium, ensuring that

the bombarded surface was facing upward, and incubated in the dark for 14–17 days. Newly formed callus was then separated from the original bombarded explants and placed nearby on the same medium. Following an additional 8–12 days, relatively compact, opaque callus was visually identified, and transferred to PRH50 pre-regeneration medium for 7 days in the dark. Growing callus, which became more compact and opaque was then subcultured onto RNH50 regeneration medium for a period of 14–21 days under a 16-h photoperiod. Regenerating shoots were transferred to Magenta boxes containing ½ MSH50 medium. Multiple plants regenerated from a single explant are considered siblings and were treated as one independent plant line. A plant was scored as positive for the *hph* gene if it produced thick, white roots and grew vigorously on ½ MSH50 medium. Once plantlets had reached the top of Magenta boxes, they were transferred to soil in a 6-cm pot under 100% humidity for a week, then moved to a growth chamber with a 14-h light period at 30° C and in the dark at 21° C for 2–3 weeks before transplanting into 13-cm pots in the greenhouse. Seeds were collected and dried at 37° C for one week. prior to storage.

[00393] 21.3 – Microprojectile bombardment.

[00394] All bombardments were conducted with the Biolistic PDS-1000/He™ system (Bio-Rad, Laboratories, Inc.). Three milligrams of 1.0 micron diameter gold particles were washed once with 100% ethanol, twice with sterile distilled water and resuspended in 50 µl water in a siliconized Eppendorf tube. Five micrograms plasmid DNA representing a 1:6 molar ratio of pDOW3303(*Hpt*-containing vector) to pDAB4101 (*AAD-12 (v1)* + *AHAS*), 20 µl spermidine (0.1 M) and 50 µl calcium chloride (2.5 M) were added to the gold suspension. The mixture was incubated at room temperature for 10 min, pelleted at 10000 rpm for 10 s, resuspended in 60 µl cold 100% ethanol and 8–9 µl was distributed onto each macrocarrier. Tissue samples were bombarded at 1100 psi and 27 in of Hg vacuum as described by Zhang *et al.* (1996).

[00395] 21.4 – Postemergence herbicide tolerance in *AAD-12 (v1)* transformed T₀ Rice

[00396] Rice plantlets at the 3-5 leaf stage were sprayed with a lethal dose of 0.16% (v/v) solution of Pursuit (to confirm the presence of the *AHAS* gene) containing 1% Sunit II (v/v) and 1.25% UAN (v/v) using a track sprayer calibrated to 187 L/ha. Rating for sensitivity or resistance was performed at 36 days after treatment (DAT). Ten of the 33 events sent to the greenhouse were robustly tolerant to the Pursuit; others suffered varying levels of herbicide injury. Plants were sampled (according to section 21.7 below) and molecular characterization

was performed as previously described in Example 8 that identified seven of these 10 events as containing both the *AAD-12 (v1)* PTU and the entire *AHAS* coding region.

[00397] 21.5 – Heritability of *AAD-12 (v1)* in *T₁* rice

[00398] A 100-plant progeny test was conducted on five *T₁* lines of *AAD-12 (v1)* lines that contained both the *AAD-12 (v1)* PTU and *AHAS* coding region. The seeds were planted with respect to the procedure above and sprayed with 140 g ae/ha imazethapyr using a track sprayer as previously described. After 14 DAT, resistant and sensitive plants were counted. Two out of the five lines tested segregated as a single locus, dominant Mendelian trait (3R:1S) as determined by Chi square analysis. *AAD-12* coseregated with the *AHAS* selectable marker as determined by 2,4-D tolerance testing below.

[00399] 21.6 – Verification of high 2,4-D tolerance in *T₁* Rice.

[00400] The following *T₁* *AAD-12 (v1)* single segregating locus lines were planted into 3-inch pots containing Metro Mix media: pDAB4101(20)003 and pDAB4101(27)002. At 2-3 leaf stage were sprayed with 140 g ae/ha imazethapyr. Nulls were eliminated and individuals were sprayed at V3-V4 stage in the track sprayer set to 187 L/ha at 1120, 2240 or 4480 g ae/ha 2,4-D DMA (2X, 4X, and 8X typical commercial use rates, respectively). Plants were graded at 7 and 14 DAT and compared to untransformed commercial rice cultivar, ‘Lamont,’ as negative control plants.

[00401] Injury data (Table 27) shows that the *AAD-12 (v1)*-transformed lines are more tolerant to high rates of 2,4-D DMA than the untransformed controls. The line pDAB4101(20)003 was more tolerant to high levels of 2,4-D than the line pDAB4101(27)002. The data also demonstrates that tolerance of 2,4-D is stable for at least two generations.

Table 27. <i>T₁</i> <i>AAD-12 (v1)</i> and untransformed control response to varying levels of 2,4-D DMA.			
Herbicide	Lemont Untransformed Control	pDAB4101(20)003	pDAB4101(27)002
	Average % Injury 14 DAT		
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	20	10	10
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	35	15	30
4480 g ae/ha 2,4-D DMA	50	23	40

[00402] 21.7 – Tissue harvesting, DNA isolation and quantification.

[00403] Fresh tissue was placed into tubes and lyophilized at 4° C for 2 days. After the tissue was fully dried, a tungsten bead (Valenite) was placed in the tube and the samples were subjected to 1 minute of dry grinding using a Kelco bead mill. The standard DNeasy DNA isolation procedure was then followed (Qiagen, Dneasy 69109). An aliquot of the extracted DNA was then stained with Pico Green (Molecular Probes P7589) and scanned in the fluorometer (BioTek) with known standards to obtain the concentration in ng/μl.

[00404] 21.8 – AAD-12 (v1) expression.

[00405] Sample preparation and analysis conditions were as described previously. All 33 T₀ transgenic rice lines and 1 non-transgenic control were analyzed for AAD-12 expression using ELISA blot. AAD-12 was detected in the clones of 20 lines, but not in line Taipai 309 control plant. Twelve of the 20 lines that had some of the clones tolerant to imazethapyr were expressing AAD-12 protein, were AAD-12 PCR PTU positive, and AHAS coding region positive. Expression levels ranged from 2.3 to 1092.4 ppm of total soluble protein.

[00406] 21.9– Field tolerance of pDAB4101 rice plants to 2,4-D and triclopyr herbicides.

[00407] A field level tolerance trial was conducted with *AAD-12 (v1)* event pDAB4101[20] and one wild-type rice (Clearfield 131) at Wayside, Mississippi (a non-transgenic imidazolinone-resistant variety). The experimental design was a randomized complete block design with a single replication. Herbicide treatments were 2X rates of 2,4-D (dimethylamine salt) at 2240 g ae/ha and triclopyr at 560 g ae/ha plus an untreated control. Within each herbicide treatment, two rows of T₁ generation pDAB4101[20] and two rows of Clearfield rice were planted using a small plot drill with 8-inch row spacing. The pDAB4101[20] rice contained the *AHAS* gene as a selectable marker for the *AAD-12(v1)* gene. Imazethapyr was applied at the one leaf stage as selection agent to remove any *AAD-12 (v1)* null plants from the plots. Herbicide treatments were applied when the rice reached the 2 leaf stage using compressed air backpack sprayer delivering 187 L/ha carrier volume at 130-200 kpa pressure. Visual ratings of injury were taken at 7, 14 and 21 days after application.

[00408] *AAD-12 (v1)* event response to 2,4-D and triclopyr are shown in Table 28. The non-transformed rice line (Clearfield) was severely injured (30% at 7DAT and 35% at 15DAT) by 2,4-D at 2240 g ae/ha which is considered the 4X commercial use rate. The *AAD-12 (v1)*

event demonstrated excellent tolerance to 2,4-D with no injury observed at 7 or 15DAT. The non-transformed rice was significantly injured (15% at 7DAT and 25% at 15DAT) by the 2X rate of triclopyr (560 g ae/ha). The *AAD-12 (v1)* event demonstrated excellence tolerance to the 2X rates of triclopyr with no injury observed at either 7 or 15DAT.

[00409] These results indicate that the *AAD-12 (v1)* transformed rice displayed a high level of resistance to 2,4-D and triclopyr at rates that caused severe visual injury to the Clearfield rice. It also demonstrates the ability to stack multiple herbicide tolerance genes with *AAD-12 I* multiple species to provide resistance to a wider spectrum of effective chemistries

Table 28. AAD-12 T ₁ generation rice plants response to 2,4-D and triclopyr under field conditions.					
Herbicide Treatment		% Visual Injury			
Active Ingredient	Rate	7DAT		15DAT	
		AAD-12 event pDAB4101[20]	Wild-type Clearfield	AAD-12 event pDAB4101[20]	Wild-type Clearfield
2,4-D	2240 GM AE/HA	0	15	0	35
Triclopyr	840 GM AE/HA	0	30	0	25
Untreated		0	0	0	0

Example 22 – *AAD-12 (v1)* in Canola

[00410] 22.1 – Canola transformation.

[00411] The *AAD-12 (v1)* gene conferring resistance to 2,4-D was used to transform *Brassica napus* var. Nexera* 710 with *Agrobacterium*-mediated transformation and plasmid pDAB3759. The construct contained *AAD-12 (v1)* gene driven by CsVMV promoter and Pat gene driven by AtUbi10 promoter and the EPSPS glyphosate resistance trait driven by AtUbi10 promoter (see section 2.4).

[00412] Seeds were surface-sterilized with 10% commercial bleach for 10 minutes and rinsed 3 times with sterile distilled water. The seeds were then placed on one half concentration of MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) and maintained under growth regime set at 25° C, and a photoperiod of 16 hrs light/8 hrs dark.

[00413] Hypocotyl segments (3-5 mm) were excised from 5 - 7 day old seedlings and placed on callus induction medium K1D1 (MS medium with 1 mg/L kinetin and 1 mg/L 2,4-D) for 3 days as pre-treatment. The segments were then transferred into a petri plate, treated with *Agrobacterium* Z707S or LBA4404 strain containing pDAB3759. The *Agrobacterium* was grown overnight at 28° C in the dark on a shaker at 150 rpm and subsequently re-suspended in the culture medium.

[00414] After 30 min treatment of the hypocotyl segments with *Agrobacterium*, these were placed back on the callus induction medium for 3 days. Following co-cultivation, the segments were placed on K1D1TC (callus induction medium containing 250 mg/L Carbenicillin and 300 mg/L Timentin) for one week or two weeks of recovery. Alternately, the segments were placed directly on selection medium K1D1H1 (above medium with 1 mg/L Herbiace). Carbenicillin and Timentin were the antibiotics used to kill the *Agrobacterium*. The selection agent Herbiace allowed the growth of the transformed cells.

[00415] Callused hypocotyl segments were then placed on B3Z1H1 (MS medium, 3 mg/L benzylamino purine, 1 mg/L Zeatin, 0.5 gm/L MES [2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid], 5 mg/L silver nitrate, 1 mg/L Herbiace, Carbenicillin and Timentin) shoot regeneration medium. After 2-3 weeks shoots started regenerating. Hypocotyl segments along with the shoots are transferred to B3Z1H3 medium (MS medium, 3 mg/L benzylamino purine, 1 mg/L Zeatin, 0.5 gm/L MES [2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid], 5 mg/L silver nitrate, 3 mg/L Herbiace, Carbenicillin and Timentin) for another 2-3 weeks.

[00416] Shoots were excised from the hypocotyl segments and transferred to shoot elongation medium MESH5 or MES10 (MS, 0.5 gm/L MES, 5 or 10 mg/L Herbiace, Carbenicillin, Timentin) for 2-4 weeks. The elongated shoots are cultured for root induction on MSI.1 (MS with 0.1 mg/L Indolebutyric acid). Once the plants had a well established root system, these were transplanted into soil. The plants were acclimated under controlled environmental conditions in the Conviron for 1-2 weeks before transfer to the greenhouse.

[00417] 22.2 – Molecular analysis: canola materials and methods

[00418] 22.2.1 – Tissue harvesting DNA isolation and quantification. Fresh tissue was placed into tubes and lyophilized at 4° C for 2 days. After the tissue was fully dried, a tungsten bead (Valenite) was placed in the tube and the samples were subjected to 1 minute of dry grinding using a Kelco bead mill. The standard DNeasy DNA isolation procedure was then followed (Qiagen, DNeasy 69109). An aliquot of the extracted DNA was then stained with Pico Green

(Molecular Probes P7589) and read in the fluorometer (BioTek) with known standards to obtain the concentration in ng/ul.

[00419] 22.2.2 - Polymerase chain reaction. A total of 100 ng of total DNA was used as the template. 20mM of each primer was used with the Takara Ex Taq PCR Polymerase kit (Mirus TAKRR001A). Primers for Coding Region PCR *AAD-12 (v1)* were (SEQ ID NO:10) (forward) and (SEQ ID NO:11) (reverse). The PCR reaction was carried out in the 9700 Geneamp thermocycler (Applied Biosystems), by subjecting the samples to 94°C for 3 minutes and 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 65°C for 30 seconds, and 72°C for 2 minutes followed by 72°C for 10 minutes. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with EtBr. 35 samples from 35 plants with *AAD-12 (v1)* events tested positive. Three negative control samples tested negative.

[00420] 22.2.3 – ELISA.

[00421] Using established ELISA described in previous section, AAD-12 protein was detected in 5 different canola transformation plant events. Expression levels ranged from 14 to over 700 ppm of total soluble protein (TSP). Three different untransformed plant samples were tested in parallel with no signal detected, indicating that the antibodies used in the assay have minimal cross reactivity to the canola cell matrix. These samples were also confirmed positive by Western analysis. A summary of the results is presented in Table 29.

Table 29. Expression of <i>AAD-12 (v1)</i> in Canola plants				
Sample #	[TSP] (µg/ml)	[AAD-12] (ng/ml)	Expression (ppm TSP) (ELISA)	Western
31	5614.96	1692.12	301.36	++++
33	4988.26	2121.52	425.30	++++
38	5372.25	3879.09	722.06	++++
39	2812.77	41.36	14.71	+
40	3691.48	468.74	126.98	+++
Control 1	2736.24	0.00	0.00	-
Control 2	2176.06	0.00	0.00	-
Control 3	3403.26	0.00	0.00	-

[00422] 22.4 – Postemergence herbicide tolerance in *AAD-12(v1)* transformed T₀ Canola.

[00423] Forty-five T₀ events from the transformed with the construct pDAB3759, were sent to the greenhouse over a period of time and were allowed to acclimate in the greenhouse. The plants were grown until 2-4 new, normal looking leaves had emerged (i.e., plants had

transitioned from tissue culture to greenhouse growing conditions). Plants were then treated with a lethal dose of the commercial formulations of 2,4-D Amine 4 at a rate of 560 g ae/ha. Herbicide applications were made with a track sprayer at a spray volume of 187 L/ha, 50-cm spray height. A lethal dose is defined as the rate that causes >95% injury to the untransformed controls.

[00424] Twenty-four of the events were tolerant to the 2,4-D DMA herbicide application. Some events did incur minor injury but recovered by 14 DAT. Events were progressed to the T₁ (and T₂ generation) by selfpollination under controlled, bagged, conditions.

[00425] 22.5 – AAD-12 (v1) heritability in Canola.

[00426] A 100 plant progeny test was also conducted on 11 T₁ lines of AAD-12 (v1). The seeds were sown and transplanted to 3-inch pots filled with Metro Mix media. All plants were then sprayed with 560 g ae/ha 2,4-D DMA as previously described. After 14 DAT, resistant and sensitive plants were counted. Seven out of the 11 lines tested segregated as a single locus, dominant Mendelian trait (3R:1S) as determined by Chi-square analysis. AAD-12 is heritable as a robust aryloxyalkanoate auxin resistance gene in multiple species and can be stacked with one or more additional herbicide resistance genes.

[00427] 22.6 – Verification of high 2,4-D tolerance in T₁ Canola

[00428] For T₁ AAD-12 (v1), 5-6 mg of seed were stratified, sown, and a fine layer of Sunshine Mix # 5 media was added as a top layer of soil. Emerging plants were selected with 560 g ae/ha 2,4-D at 7 and 13 days after planting.

[00429] Surviving plants were transplanted into 3-inch pots containing Metro Mix media. Surviving plants from T₁ progenies, that were selected with 560 g ae/ha 2,4-D, were also transplanted into 3-inch pots filled with Metro Mix soil. At 2-4 leaf stage plants were sprayed with either 280, 560, 1120, or 2240 g ae/ha 2,4-D DMA. Plants were graded at 3 and 14 DAT and compared to untransformed control plants. A sampling of T₁ event injury data 14DAT may be seen in **Table 30**. Data suggests that multiple events are robustly resistant to 2240 g ae/ha 2,4-D, while other events demonstrated less robust tolerance up to 1120 g ae/ha 2,4-D. Surviving plants were transplanted to 5 1/4" pots containing Metro Mix media and placed in the same growth conditions as before and self-pollinated to produce only homozygous seed.

Table 30. T₁ *AAD-12 (v1)* and untransformed control response to varying rates postemergence 2,4-D DMA applications.

	Untransformed Control	pDAB3759(33)013.001	pDAB3759(18)009.001	pDAB3759(18)022.001	pDAB3759(18)030.001	pDAB3759(18)023.001
Herbicide	Average % Injury 14DAT					
280 g ae/ha 2,4-D DMA	85	0	0	0	0	0
560 g ae/ha 2,4-D DMA	85	0	0	0	0	0
1120 g ae/ha 2,4-D DMA	90	0	0	13	5	3
2240 g ae/ha 2,4-D DMA	95	1	5	83	31	6

22.7-Field tolerance of pDAB3759 canola plants to 2,4-D, dichloprop, triclopyr and fluroxypyr herbicides.

Field level tolerance trial was conducted on two *AAD-12 (v1)* events 3759(20)018.001 and 3759(18)030.001 and a wild-type canola (Nex710) in Fowler, Indiana. The experimental design was a randomized complete block design with 3 replications. Herbicide treatments were 2,4-D (dimethylamine salt) at 280, 560, 1120, 2240 and 4480 g ae/ha, triclopyr at 840 g ae/ha, fluroxypyr at 280 g ae/ha and an untreated control. Within each herbicide treatment, single 20 ft row/event for event 3759(18)030.0011, 3759(18)018.001 and wild-type line (Nex710) were planted with a 4 row drill on 8 inch row spacing. Herbicide treatments were applied when canola reached the 4-6 leaf stage using compressed air backpack sprayer delivering 187 L/ha carrier volume at 130-200 kpa pressure. Visual injury ratings were taken at 7, 14 and 21 days after application.

Canola response to 2,4-D, triclopyr, and fluroxypyr are shown in Table 31. The wild-type canola (Nex710) was severely injured (72% at 14DAT) by 2,4-D at 2240 g ae/ha which is considered the 4X rate. The *AAD-12 (v1)* events all demonstrated excellent tolerance to 2,4-D at 14DAT with an average injury of 2, 3 and 2% observed at the 1, 2 and 4X rates, respectively. The wild-type canola was severely injured (25% at 14DAT) by the 2X rate of triclopyr (840 g ae/ha). *AAD-12 (v1)* events demonstrated tolerance at 2X rates of triclopyr with an average of 6% injury at 14DAT across the two events. Fluroxypyr at 280 g ae/ha

caused severe injury (37%) to the non-transformed line at 14DAA. *AAD-12 (v1)* events demonstrated increased tolerance with an average of 8% injury at 5DAT.

[00433] These results indicate that *AAD-12 (v1)* transformed events displayed a high level of resistance to 2,4-D, triclopyr and fluroxypyr at rates that were lethal or caused severe epinastic malformations to non-transformed canola. *AAD-12* has been shown to have relative efficacy of 2,4-D > triclopyr > fluroxypyr.

Table 31. <i>AAD-12</i> (pDAB3759) canola plants response to 2,4-D, triclopyr, and fluroxypyr under field conditions.				
Herbicide Treatment		% Visual Injury at 14 DAT		
Active Ingredient	Rate	<i>AAD-12</i> event 3759(20)018.001	<i>AAD-12</i> event 3759(18)030.001	Wild Type (Nex710)
2,4-D	280 GM AE/HA	0 a	0 b	0 e
2,4-D	560 GM AE/HA	0 a	0 b	15 d
2,4-D	1120 GM AE/HA	2 a	2 ab	33 bc
2,4-D	2240 GM AE/HA	3 a	3 ab	48 a
Triclopyr	840 GM AE/HA	6 a	6 ab	25 cd
Fluroxypyr	280 GM AE/HA	7 a	8 a	37 ab

Means with a column with different letters are significantly different as defined by LSD (p=0.05).

Example 23--*AAD-12 (v1)* Stacked With Insect Resistance (IR) or Other Input Traits in Any Crop

[00434] Insect resistance in crops supplied by a transgenic trait is prevelant in corn and cotton production in North America and across the globe. Commercial products having combined IR and HT traits have been developed by multiple seed companies. These include Bt IR traits (e.g. Bt toxins listed at the website lifesci.sussex.ac.uk, 2006) and any or all of the HTC traits mentioned above. The value this offering brings is the ability to control multiple pest problems through genetic means in a single offering. The convenience of this offering will be restricted if weed control and insect control are accomplished independent of each other. *AAD-12 (v1)* alone or stacked with one or more additional HTC traits can be stacked with one or more additional input traits (e.g., insect resistance, fungal resistance, or stress tolerance, *et al.*) (isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005) either through conventional breeding or jointly as a novel transformation event. Benefits include the convenience and flexibility described in Examples 15-20 above, together with the ability to manage insect pests and/or other

agronomic stresses in addition to the improved weed control offered by *AAD-12* and associated herbicide tolerance. Thus, the subject invention can be used to provide a complete agronomic package of improved crop quality with the ability to flexibly and cost effectively control any number of agronomic issues.

[00435] Combined traits of IR and HT have application in most agronomic and horticultural/ornamental crops and forestry. The combination of *AAD-12* and its commensurate herbicide tolerance and insect resistance afforded by any of the number of Bt or non-Bt IR genes are can be applied to the crop species listed (but not limited to) in Example 13. One skilled in the art of weed control will recognize that use of any of various commercial herbicides described in Examples 18-20, phenoxyacetic or pyridyloxyacetic auxin herbicides, alone or in multiple combinations, is enabled by *AAD-12* (*v1*) transformation and stacking with the corresponding HT trait or IR trait either by conventional breeding or genetic engineering. Specific rates of other herbicides representative of these chemistries can be determined by the herbicide labels compiled in the CPR (Crop Protection Reference) book or similar compilation, labels compiled online (e.g., cdms.net/manuf/manuf.asp), or any commercial or academic crop protection guides such as the Crop Protection Guide from Agrilience (2005). Each alternative herbicide enabled for use in HTCs by *AAD-12* (*v1*), whether used alone, tank mixed, or sequentially, is considered within the scope of this invention.

Example 24—*AAD-12* (*v1*) as an *in vitro* Dicot Selectable Marker

[00436] Genetic engineering of plant cell, tissue, organ, and plant or organelle such as plastid starts with the process of inserting genes of interest into plant cells using a suitable delivery method. However, when a gene is delivered to plant cells, only an extremely small percentage of cells integrate the heterogeneous gene into their genome. In order to select those few cells that have incorporated the gene of interest, researchers link a selectable or screenable "marker gene" to the gene of interest (GOI) in the vector. Cells that contain these markers are identified from the whole population of cells/ tissue to which the DNA plasmid vector was delivered. By selecting those cells that express the marker gene, researchers are able to identify those few cells that may have incorporated the GOI into their genome.

[00437] There are a variety of selectable markers available to enable this selection process to obtain transgenic cells, callus, embryos, shoots and plantlets. The preferred selectable markers by the Ag-industry are herbicide markers that allow the ease of spraying compounds

in the field to select the right transgenic progenies during the process of event sorting in the field situation. *AAD-12 (v1)* has been shown to efficiently serve as a selectable marker for whole plants transformed with the gene in the greenhouse and growth chamber (Example 7) with 2,4-D as the selection agent. Field selection is possible as well using 2,4-D in combination with the *AAD-12 (v1)* gene (Example 11, 22), but use *in vitro* for cell-level selection is complicated by the fact 2,4-D is used almost ubiquitously as a plant growth regulator in the plant tissue culture systems. Degradation of this important hormone by *AAD-12 (v1)* can impact the ability to use this gene as an *in vitro* selectable marker. Success of developing 2,4-D as a marker gene depends on identifying the right alternate plant growth regulator that can mimic the effect of 2,4-D in the respective culture system and at the same time possess the ability to be stable and not be degraded by the *AAD-12* enzyme when expressed in the transgenic cells. R-dichlorprop is a close analog to 2,4-D that is not a substrate for *AAD-12 (v1)* and is used as a non-metabolizable auxin substitute in tobacco cell cultures allowing 2,4-D to be used at high rates as a selection agent. This fact was used in exemplifying *AAD-12 (v1)* could be used as a selectable marker *in vitro*.

[00438] 24.1—Cell culture--Alternative auxins.

[00439] *AAD-12 (v1)* degrades 2,4-D, but not R-2,4-dichlorophenoxypropionic acid (R-dichlorprop), which has at the same time the structural requirement of an auxinic growth regulator. Other non-metabolizable plant auxin mimics that may be used in cell culture include NAA (naphthalene acetic acid), IAA (indole acetic acid), dicamba, picloram, and R-mecoprop. It was investigated if it was possible to substitute R-dichlorprop and successfully maintain two different tobacco cell cultures PHL (Petite Havanna) and BY2 suspensions. Conversely, for cotton explants R-dichlorprop, dicamba, and picloram were tested as alternative auxins and the embryogenic callus induction response in comparison to the standard growth regulator, 2,4-D was evaluated. Petite Havana tobacco (PHL) and Coker cotton cotyledons were used in their experiments.

[00440] 24.1.1—Tobacco cell suspension—2,4-D as selection agent.

[00441] A dose response study was conducted with both the R-dichlorprop habituated PHL cells and the R-dichlorprop habituated BY2 cells where R-dichlorprop was substituted directly for 2,4-D in culture media. Though the focus was on PHL, a dose response was also done with BY2 in case of possible future studies, as well as to help predict the dose response for PHL. For the dichlorprop habituated PHL dose response, the levels of 2,4-D used (on

LSBY2C medium with R-dichlorprop) were 0 (the control), 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 40, 60, 80, 100, 110, 120 mg/L 2,4-D. There were four replications per concentration. For the R-dichlorprop habituated BY2 dose response, the levels of 2,4-D used (on LSBY2C medium) were 0 (the control), 1, 2, 3, 5, 8, 10, 20, 30, 40, mg/L 2,4-D.

[00442] The dose response was carried out showed that all the concentration of 2,4-D tested were lethal above 10 mg/ L concentrations. However, there was growth in all the concentrations up to 10-mg/L 2,4-D where a slight growth of PHL suspension was observed. The growth of the suspension colonies from 1- 8 mg/L 2,4-D concentrations was comparable to the growth in control treatments. The observation made in BY2 suspension cells were similar except the concentration at 10 mg/L was found to be lethal and the sub lethal concentration was 8 mg/L concentration.

[00443] 24.1.2—Tobacco cell transformation with AAD-12 (v1) and 2,4-D selection.

[00444] For tobacco transformation experiment, there were 11 treatments altogether: a control set plated on LS-BY2C + dichlorprop medium , and 10 sets of LSBY2C + dichlorprop + 2,4-D at varying concentration levels (1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20 mg/L). There were four replications per treatment. The plasmid DNA vector used was pDAB724, and the vector used for transformation was EHA101S strain of *Agrobacterium tumefaciens*. Four ml of PHL suspension at 0.6×10^6 were mixed with 100 ul of *Agrobacterium* (either EHA101 or LBA4404 strains) suspension at 1.0×10^6 in a sterile Petri plate and were mixed thoroughly and co-cultivated together in a non-shake condition at a dark growth chamber for 3 days at 25°C . After the co-cultivation period 1.5 ml of the Agro-tobacco suspension mixture was plated to the 11 set of plates above. The experiment was repeated with 13 treatments: a control of LS-BY2C + dichlorprop media (no 2,4-D), and LS-BY2C + dichlorprop + 2,4-D (1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20 mg/L); LSBY2C + 1mg/L 2,4-D + B10 (Bialophos); LSBY2C + 10 2,4-D + B10 + R-dichlorprop. Again, there were four replicates per treatment, as well as a positive and negative control. All media contain 500 mg/L Carbenicillin (C) to control to contain *Agrobacterium* growth in the selection media.

[00445] The plasmid used in these experiments is pDAB724 and it has *PAT* selectable marker as well. So, control transformation experiments were initiated using R-dichlorprop habituated PHL in the presence of 10 mg/L bialophos following the standard protocol described above. The treatments were done side by side with 4 replicates to see if the bialophos selection in these suspension is normal.

[00446] There was little growth observed in all selection concentrations of 2,4D tested above 10 mg/L; however several fast growing colonies were found in 2, 5, and 8 mg/L 2,4-D concentration and representative sample was transferred to fresh selection at 10 mg/L selection to bulk the callus. Also, several putative colonies were selected in from 12, 15, 18 and 20 mg/L 2,4-D, but when compared to 10 mg/L there were only few colonies in these selection plate. Control treatment conducted with bialophos selection showed normal colony development. It appears that 10 mg/L 2,4-D is the sub-lethal and above this concentration 2,4-D appears to be lethal to the non-transformed cells. All the identified colonies were transferred to fresh medium with 10 mg/L selection and were probed for the presence of transgene by PCR as described in Example 10. The colonies selected and bulked had the transgenes as determined by PCR and expression of the genes as established by the Western analyses (as described in example 10). Several colonies were identified as actively growing and transferred to fresh selection medium with 10 mg/L 2,4-D to bulk the callus.

[00447] The bulked calluses were then transferred to higher level of 2,4-D to test the tolerance level *in vitro*. The levels of 2,4-D used were 20, 40, 60, 80, 100, and 120 mg/L 2,4-D. However the callus did not grow beyond 20 mg/L 2, 4-D concentrations indicating a threshold concentration higher than 20 mg/L may exist.

[00448] 24.2.1—Cotton explants—auxin alternatives

[00449] A dose response study was initiated to test multiple auxin alternatives as a substitute for the use of 2,4-D as a growth regulator in cotton. The alternative auxin tested were 2,4-dichlorprop, dicamba, and picloram. These compounds were tested at 0.2, 2.0, and 20.0 uM concentrations respectively. 2,4-D was used as the control treatment at 0.02 uM concentration. The medium used is the base medium for cotton callus induction (Example 12). Beyond the initial phase of culture, auxin is removed from the medium to prod the tissue toward the regeneration process.

[00450] R-dichlorprop was not effective in callus induction of cotyledonary segments and appears toxic to cotton cells at the lowest concentration tested (0.02 uM). Dicamba effectively induces callus growth at all concentrations tested (0.02-20 uM) and has no apparent toxic effects in this concentration range. Callus induction with picloram increased up to a maximum when explants were treated with 0.2 uM to 20 uM. Quality of the callus was consistent with the standard 2,4-D treatment at the 2 uM picloram concentration. At the

highest concentration (20 μ M) 2,4-D was also inhibitory to cotton callus generation and growth.

[00451] Cotton has shown initial ability to respond effectively to alternative auxins (to 2,4-D) in culture. At high enough concentrations, 2,4-D is toxic to cotton cotyledonary explants. R-dichlorprop is surprisingly significantly more toxic to cotton than 2,4-D or other auxins. 2,4-D may be used as a selection agent and in combination with *AAD-12* (*vl*) as the selectable marker gene. Other non-metabolizable auxin surrogates (e.g., dicamba, picloram, R-mecoprop, NAA, or IAA) would allow the use of AAD-12 as a selectable marker in dicots with 2,4-D as the selection agent.

References

- Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker, and D.V. Thompson.** 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36:289-300.
- Agrilience Crop Protection Guide.** 2005. Agrilience, LLC. St Paul, MN. 614 p.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D.J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Altschul, S. F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein databasesearch programs. *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- An, G., B.D. Watson, S. Stachel, M.P. Gordon, E. W. Nester.** 1985. New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4:277-284.
- Armstrong C.L., C.E. Green, R.L. Phillips.** 1991. Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genet Coop News Lett* 65:92-93.
- Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbas, and F.C. Kafatos.** 1983 *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100:266-285
- Birch R.G. and T. Franks.** 1991. Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:453-469.
- CDMS.** Crop Data Management Systems Labels and MSDS. Online. Internet. March 13, 2004. Available at net/manuf/manuf.asp.
- Chee P.P., K.A. Fober, J.L. Slightom.** 1989. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 91:1212-1218.
- Cheng M., J.E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, T.W. Conner, and Y. Wan.** 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115: 971-980.
- Chu C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu, F.Y. Bi.** 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18:659-668.
- Clemente T.E., B.J. LaVallee, A.R. Howe, D. Conner-Ward, R.J. Rozman, P.E. Hunter, D.L. Broyles, D.S. Kasten, M.A. Hinchee.** 2000. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci* 40: 797-803.

- CPR: Crop Protection Reference.** 2005 Chemical and Pharmaceutical Press, New York, NY. 2647 p.
- Devine, M. D.** 2005. Why are there not more herbicide-tolerant crops? *Pest Manag. Sci.* 61:312-317.
- Dietrich, Gabriele Elfriede** (1998) Imidazolinone resistant AHAS mutants. U.S. Patent 5,731,180.
- Didierjean L, L. Gondet, R. Perkins, S.M. Lau, H. Schaller, D.P. O'Keefe, D. Werck-Reichhart.** 2002. Engineering Herbicide Metabolism in Tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a Cytochrome P450 Enzyme from Jerusalem Artichoke. *Plant Physiol* 2002, 130:179-189.
- Ditta, G. S. Stranfield, D. Corbin, and D.R. Helinski.** 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium leililoti*. *PNAS* 77:7347-7351.
- Edwards, R. A., L. H. Keller, and D. M. Schifferli.** 1998. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene* 207:149-157.
- El-Shemy A, M. Teraishi, M. Khalafalla, T. Katsube-Tanaka, S. Utsumi, M. Ishimoto.** 2004. Isolation of soybean plants with stable transgene expression by visual selection based on green fluorescent protein *Molecular Breeding* 14: 227-238.
- El-Shemy A, M. Khalafalla, K. Fujita, M. Ishimoto.** 2006. Molecular control of gene co-suppression of transgenic soybean. *J. Biochem. and Mole. Biol.* 39: 61-67.
- Falco S.C., T. Guida, M. Locke, J. Mauvais, C. Sanders, R.T. Ward, P. Webber.** 1995. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Bio/Technology* 13:577-582.
- Finer J. and M. McMullen.** 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27P:175-182.
- Fraley, R.T., D.G. Rogers, and R. B. Horsch.** 1986. Genetic transformation in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 4:1-46.
- Frame B.R., P.R. Drayton, S.V. Bagnall, C.J. Lewnau, W.P. Bullock, H.M. Wilson, J.M. Dunwell, J.A. Thompson, and K. Wang.** 1994. Production of fertile maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. *Plant J.* 6:941-948.
- Fukumori, F., and R.P. Hausinger.** 1993. Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 268: 24311-24317.
- Gamborg, O.L., R. A. Miller, and K. Ojima.** 1968. Nutrient requirements of suspensions of cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.

- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari, and J. A. Hoch. 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 153:1424-1431.
- Gianessi, L. R. 2005 Economic and herbicide use impacts of glyphosate-resistant crops. Pest. Manag. Sci. 61:241-245.
- Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. March 18, 2005. Available at weedscience.com.
- Hiei Y., T. Komari, and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Mol. Biol. 35:205-218.
- Hiei, Y., T. Komari (1997) Method for Transforming Monocotyledons. U.S. Patent 5,591,616.
- Hinchee M.A.W., D.V. Conner-Ward, C.A. Newell, R.E. McDonnell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley, R.B. Horsch. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Bio/Technology 6:915-922.
- Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. 1989. Microbiol. Rev. 53:242-255.
- Hoekema, A. 1985. In: *The Binary Plant Vector System*, Offset-drukkerij Kanters B.V., Alblaserdam, Chapter 5.
- Hogan, D.A.; S.R. Smith, E.A. Saari, J. McCracken, R.P. Hausinger. 2000. Site-directed mutagenesis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/a-ketoglutarate dioxygenase. Identification of residues involved in metallocenter formation and substrate binding. J. Biol. Chem. 275:12400-12409.
- Holsters, M., D. De Waele, A. Depicker, E. Messens, M. Van Montagu, and J. Schell. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen. Genet. 163:181-187.
- Horsch, R., J. Fry, N. Hoffman, J. Neidermeyer, S. Rogers, and R. Fraley. 1988. In Plant Molecular Biology Manual, S. Gelvin *et al.*, eds., Kluwer Academic Publishers, Boston
- Horvath, M., G. Ditzelmüller, M. Lodl, and F. Streichsbier. 1990. Isolation and characterization of a 2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid-degrading soil bacterium. Appl. Microbiol Biotechnol. 33:213-216.
- Jefferson, R. A. M. Bevan, and T. Kavanagh. 1987. The use of *Escherichia coli* β -glucuronidase gene as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants. Biochem. Soc. Trans. 15: 17-19.
- Karlin, S. and S.F. Altschul. 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. PNAS 87:2264-2268.

- Karlin, S. and S.F. Altschul.** 1993. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *PNAS* 90:5873-5877
- Keller, G.H., and M.M. Manak.** 1987. *DNA Probes*. Stockton Press, New York, NY, pp. 169-170.
- Khalafalla M, S. Rahman, H. El-Shemy, Y. Nakamoto, K. Wakasa, M. Ishimoto.** 2005. Optimization of particle bombardment conditions by monitoring of transient sGFP(S65T) expression in transformed soybean. *Breeding Sci.* 55:257-263.
- Khan M, L. Table, L. Heath , D. Spencer, T. Higgins.** 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of subterranean clover (*Trifolium subterraneum L.*). *Plant Physiol* 105:81-88.
- Kohler, H.P.E.** 1999. *Delftia acidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. *J. Ind Microbiol and Biotech.* 23:336-340.
- Li L, Qu R, Kochko A de, Fauquet CM, Beachy RN** (1993) An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep* 12:250-255
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog** (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:100-127.
- Lorraine-Colwill, D. F., S. B. Powles, T. R. Hoawkes, P.H. Hollingshead, S.A.J. Arner, and C. Preston.** 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 74:62-73.
- Luo , H., Q. Hu, K. Nelson, C. Longo, A. P. Kausch, J. M. Chandlee, J. K. Wipff and C. R. Fricker.** 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera L.*) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. *Plant Cell Reports* 22: 645-652.
- Lyon, B.R., D. J. Llewellyn, J. L. Huppertz, E. S. Dennis, and W. J. Peacock.** 1989. Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Mol. Bio.* 13:533-540.
- Lyon, B.R., Y. L. Cousins, D. J. Llewellyn, and E. S. Dennis.** 1993. Cotton plants transformed with a bacterial degradation gene are protected from accidental spray drift damage by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Transgenic Res.* 2: 166-169.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook.** 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Martin, J.R. and W.W. Witt.** 2002. Response of glyphosate tolerant and susceptible biotypes of horseweed (*Conyza canadensis*) to foliar applied herbicides. *Proc.North Cent.Weed Sci.Soc.* 57:185.
- Martinell B.J., L.S. Julson, C.A. Emler, H. Yong, D.E. McCabe, E.J. Williams.** 2002. Soybean *Agrobacterium* transformation method. U.S. Patent Application No. 6384301

- McCabe D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell, P. Christou.** 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6:923-926.
- Miller S.D., P.W. Stahlman, P. Westra, G.W. Wicks, R.G. Wilson, J.M. Tichota.** 2003. Risks of weed spectrum shifts and herbicide resistance in glyphosate-resistant cropping systems. *Proc. West. Soc. Weed Sci.* 56:61-62.
- Muller R, S. Jorks, S. Kleinstaub, W. Babel.** 1999. *Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. *Microbiol. Res.* 154:241-246.
- Muller T, S. Byrde, C. Werlen, J. Roelof van der Meer, H-P. Kohler.** 2004. Genetic Analysis of Phenoxyalkanoic Acid Degradation in *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10):6066-6075.
- Muller T, T. Fleischmann, J. Roelof van der Meer, H-P. Kohler.** 2006. Purification and Characterization of Two Enantioselective α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases, RdpA and SpdA from *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(7):4853-4861.
- Muller T, M. Zavodszky, M. Feig, L. Kuhn, R. Hausinger.** 2006. Structural basis for the enantiospecificities of R- and S-specific phenoxypropionate/ α -ketoglutarate dioxygenases. *Protein Sci.* 15:1356-1368.
- Murashige T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murphy G.P., T.E. Dutt, R.F. Montgomery, T.S. Willard, G.A. Elmore.** 2002. Control of horseweed with glyphosate. *Proc. North Cent. Weed Sci. Soc.* 57:194.
- Ng, C.H., R. Wickneswari, S. Salmigah, Y.T. Teng, and B.S. Ismail.** 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Res.* 43:108-115.
- Olhoft P.M. and D.A. Somers.** 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20: 706-711
- Olhoft, P.M., L.E. Flagel, C.M. Donovan, and D.A. Somers.** 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216:723-735
- Padgett S.R., K.H. Kolacz, X. Delannay, D.B. Re, B.J. LaVallee, C.N. Tinius, W.K. Rhodes, Y.I. Otero, G.F. Barry, D.A. Eichholtz, V.M. Peschke, D.L. Nida, N.B. Taylor, and G.M. Kishore.** 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 1995;35:1451-1461.
- Parrott W.A., J. N. All, M.J. Adang, M.A. Bailey, H.R. Boerma, and C.N. Stewart, Jr.** 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki insecticidal gene. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30P:144-149.

- Popelka, J. C. and F. Altpeter 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereale* L) Mol. Breed 11:203-211
- Powles, S.B. and C. Preston. 2006. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. Weed Tech 20:282-289.
- Saari, R.E., D.A. Hogan, and R.P. Hausinger. 1999. Stereospecific degradation of the phenoxypropionate herbicide dichlorprop. J. Mol. Catal. B: Enz. 6:421-428.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2000. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt (1972) Methods and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50:199-204.
- Sfiligoj, E. 2004. Spreading resistance. Crop Life. March issue.
- Simarmata, M., J.E. Kaufmann, and D. Penner. 2003. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). Weed Sci. 51:678-682.
- Singh R.J., T.M. Klein, C.J. Mauvais, S. Knowlton, T. Hymowitz, C.M. Kostow. Cytological characterization of transgenic soybean. Theor. Appl. Genet. 1998; 96:319-324.
- Smejkal, C.W., T. Vallaey, S.K. Burton, and H.M. Lappin-Scott. 2001. Substrate specificity of chlorophenoxyalkanoic acid-degrading bacteria is not dependent upon phylogenetically related *tfdA* gene types. Biol. Fertil. Sols 33:507-513.
- Streber, W. and L. Willmitzer. 1989. Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. Bio/Technology 7:811-816.
- Streber, W.R., K.N. Timmis, and M. H. Zenk. 2000. Microorganisms and plasmids for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) monooxygenase formation and process for the production of these plasmids and strains. US Pat. 6,153,401.
- Streber, W.R., K.N. Timmis, and M.H. Zenk. 1987. Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetic monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. J. Bacteriol. 169:2950-2955.

- Suggs, S.V., T. Miyake, E.H. Kawashime, M.J. Johnson, K. Itakura, and R.B. Wallace.** 1981. *ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes*, D.D. Brown [ed.], Academic Press, New York, 23:683-693.
- Terakawa T, H. Hisakazu, Y. Masanori.** 2005. Efficient whisker-mediated gene transformation in a combination with supersonic treatment. *Breeding science* 55: 456-358.
- Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, W. Mingbo, S. Thornton, and R. Bretell.** 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11:1369-1376.
- Weigel, D. and J. Glazebrook.** 2002. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 358 pp.
- Weising, K., J. Schell, and G. Kahl.** 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477.
- Welter, M.E., D.S. Clayton, M.A. miler, and J.F. Petolino.** 1995. Morphotypes of friable embryogenic maize callus. *Plant Cell Rep.* 14:725-729.
- Westendorf A., D. Benndorf, R. Muller, W. Babel.** 2002. The two enantiospecific dichlorprop/ α -ketoglutarate-dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1-protein and sequence data of *Rdpa* and *Sdpa*. *Microbiol. Res.* 157:317-22.
- Westendorf, A., R.H. Muller, and W. Babel.** 2003. Purification and characterization of the enantiospecific dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1 initiating the degradation of phenoxypropionates and phenoxyacetate herbicides. *Acta Biotechnol.* 23: 3-17.
- WSSA.** 2002. *Herbicide Handbook* (8th ed). Weed Science Society of America. Lawrence, KS 492 pp.
- Zeng P, D. Vadnais, Z. Zhang, and J. Polacco.** 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Rep.* 22: 478 – 482.
- Zhang S** (1995) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. *Plant Cell Rep* 15:68–71
- Zhang S, Chen L, Qu R, Marmey P, Beachy RN, Fauquet CM** (1996) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. *Plant Cell Rep* 15:465–469.
- Zhang S, Song W, Chen L, Ruan D, Taylor N, Ronald P, Beachy RN, Fauquet CM** (1998) Transgenic elite Indica rice varieties, resistant to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Breed* 4:551-558.
- Zhang, Z., A. Xing, P.E. Staswick, and T. E. Clemente.** 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 56:37-46.

- Zhao, Z.Y., T. Cai, L. Tagliani, M. Miller, N. Wang, H. Pang, M. Rudert, S. Schroeder, D. Hondred, J. Seltzer, and D. Pierce. 2000. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation, Plant Mol. Biol. 44:789-798.
- Zipper, C., M. Bunk, A. Zehnder, H. Kohler. 1998. Enantioselective uptake and degradation of the chiral herbicide dichlorprop [(RS)-2-(2,4-dichlorophenoxy) propanoic acid] by *Delftia acidovorans* MH. J. Bact. 13:3368-3374

Claims

We claim:

1. A transgenic plant cell comprising a polynucleotide that encodes an AAD-12 protein selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, a variant of SEQ ID NO:2, and a variant of SEQ ID NO:4, said variant having aryloxyalkanoate dioxygenase activity and at least 95% sequence identity with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4.
2. The cell of claim 1 wherein expression of said polynucleotide imparts to said cell an ability to convert a phenoxyacetate auxin herbicide to a non-herbicidal molecule.
3. The cell of claim 1 wherein expression of said polynucleotide imparts to said cell an ability to convert a pyridyloxy auxin herbicide to a non-herbicidal molecule.
4. A transgenic plant comprising a plurality of cells according to claim 1, wherein expression of said polynucleotide renders said plant tolerant to said herbicide.
5. A method of selecting for at least one transgenic plant cell of claim 1 wherein said method comprises applying an aryloxyalkanoate herbicide on and/or about said transgenic plant cells and to lacking plant cell that lack said polynucleotide, and allowing said transgenic plant cell and said lacking plant cells to grow.
6. The method of claim 5 wherein said transgenic plant cell is a plant cell of a transgenic crop plant growing in a field, and said lacking cells are cells of a weed growing in said field.
7. The method of claim 5 wherein said transgenic plant cell is a plant cell transformed with said polynucleotide, and said lacking cells are non-transformants, and all of said cells are grown on tissue culture medium.

8. A method of controlling weeds, said method comprising applying a 2,4-D herbicide to a crop plant and to a weed, said crop plant comprising a plurality of plant cells according to claim 1.

9. The method of claim 8, wherein said crop plant is a soybean plant.

10. The method of claim 8, wherein said weed is resistant to glyphosate.

11. A method of protecting a crop plant from damage by an aryloxyalkanoate dioxygenase herbicide, said method comprising growing a plant comprising an AAD-12 gene, and applying said herbicide to said plant.

12. The method of claim 11 wherein said herbicide is 2,4-D.

13. The method of claim 8 wherein said plant further comprises a glyphosate resistance gene, and said method further comprises applying glyphosate to said plant and to said weed.

14. The method of claim 13, said plant further comprising a third herbicide resistance gene, and said method further comprising applying a third herbicide to said plant and to said weed.

15. A transgenic plant comprising a heterologous polynucleotide that encodes an enzyme conferring resistance to a pyridyloxy auxin herbicide.

16. The transgenic plant of claim 15, said polynucleotide also conferring resistance to a phenoxy auxin herbicide.

17. The plant of claim 16, said phenoxy auxin herbicide selected from the group consisting of 2,4-D and MCPA.

18. The plant of claim 15, said plant further comprising at least one additional herbicide resistance gene.

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

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

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

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

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

24. A method of controlling at least one weed in a field, said method comprising planting in said field seed of at least one transgenic plant, said plant comprising

PATENTE

NOTA
2014

DE

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

INVENCIÓN

08/53430

2/3

a heterologous polynucleotide that encodes an enzyme conferring resistance to a pyridyloxy auxin herbicide, and

a second heterologous polynucleotide encodes an enzyme conferring resistance to at least one other herbicide;

said method further comprising applying to at least a portion of said field a first herbicide selected from the group consisting of a pyridyloxy auxin herbicide and a phenoxy auxin herbicide; and applying said at least one other herbicide to said at least a portion of said field.

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

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

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

tralkoxydim, triasulfuron, tribenuron, triclopyr, trifloxysulfuron, trifluralin, triflusulfuron, and tritosulfuron.

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

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

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

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

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

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

34. A method of controlling weeds in a field, wherein said method comprises applying a first herbicide to said field and planting a seed in said field within 14 days of applying said first herbicide, wherein said seed comprises a cell of claim 1, and wherein said

153

first herbicide is selected from the group consisting of a phenoxy auxin and a pyridyloxy auxin.

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

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

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

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

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

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

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

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

43. The plant of claim 15 wherein said plant further comprises a gene for an agronomic trait selected from the group consisting of fungal resistance, stress tolerance,

increased yield, improved oil profile, improved fiber quality, viral resistance, delayed ripening, cold tolerance, and salt tolerance.

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

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

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

47. The method of claim 44, said pyridyloxy auxin herbicide selected from the group consisting of fluroxypyr and triclopyr.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

62. The cell of claim 60 wherein said plant cell is a monocotyledonous cell selected from the group consisting of a rice cell and a maize cell.
63. The cell of claim 61 wherein said pyridyloxy auxin herbicide is selected from the group consisting of fluroxypyr and triclopyr.
64. The plant of claim 4 wherein expression of said polynucleotide renders said plant resistant to both a phenoxyacetate auxin herbicide and a pyridyloxy auxin herbicide.
65. The method of claim 8 wherein said method comprises applying a second herbicide.
66. The method of claim 22 wherein said 2,4-D herbicide and said second herbicide are applied sequentially.
67. The method of claim 22 wherein said first herbicide and said second herbicide are applied concurrently.
68. The method of claim 8 wherein said plant is resistant to glyphosate.
69. The method of claim 24 wherein said second polynucleotide is a modified EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase).
70. The method of claim 24 wherein said first herbicide is a phenoxy auxin and said second herbicide is selected from the group consisting of glyphosate and glufosinate.
71. The method of claim 70 wherein said phenoxy auxin is 2,4-D and said second herbicide is glyphosate.
72. The method of claim 24 wherein said method further comprises applying a third herbicide.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1/3

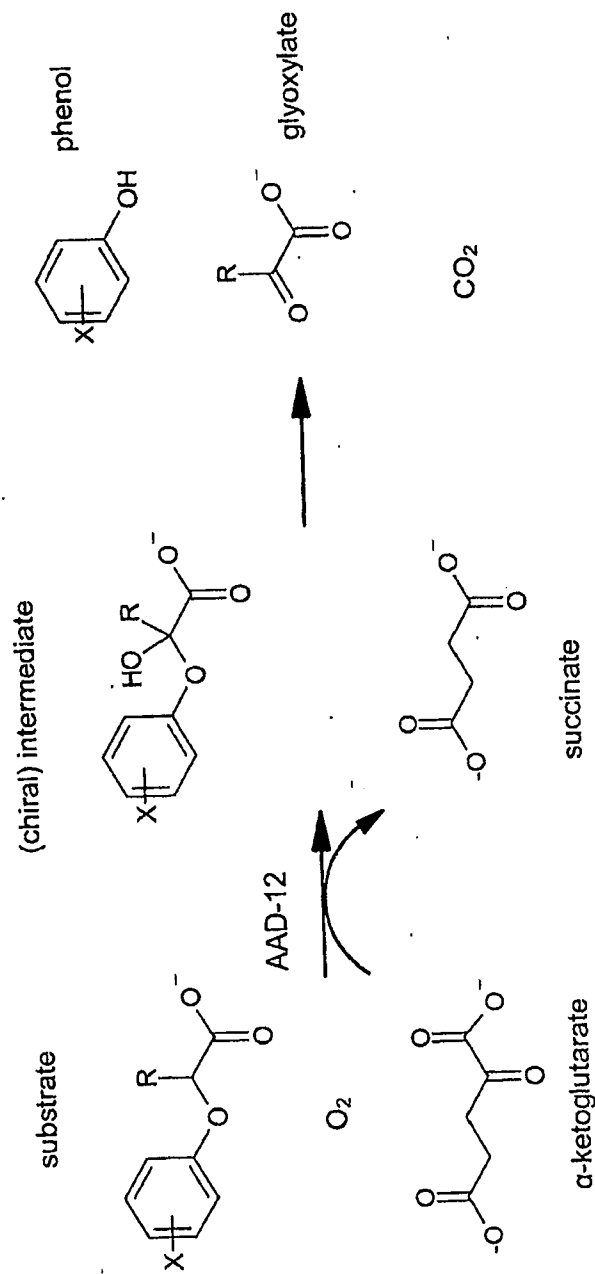


FIG. 1

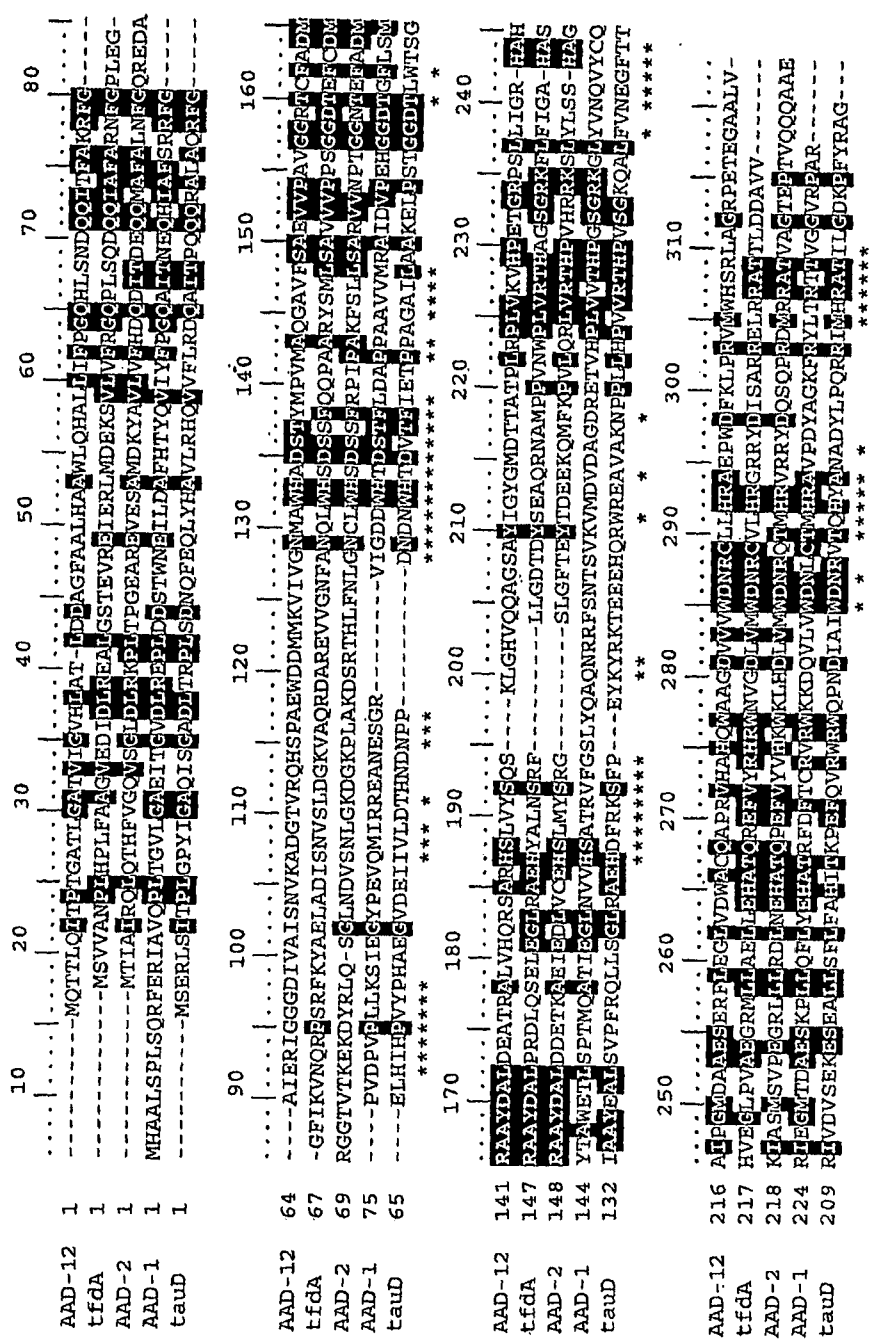


FIG. 2

3/3

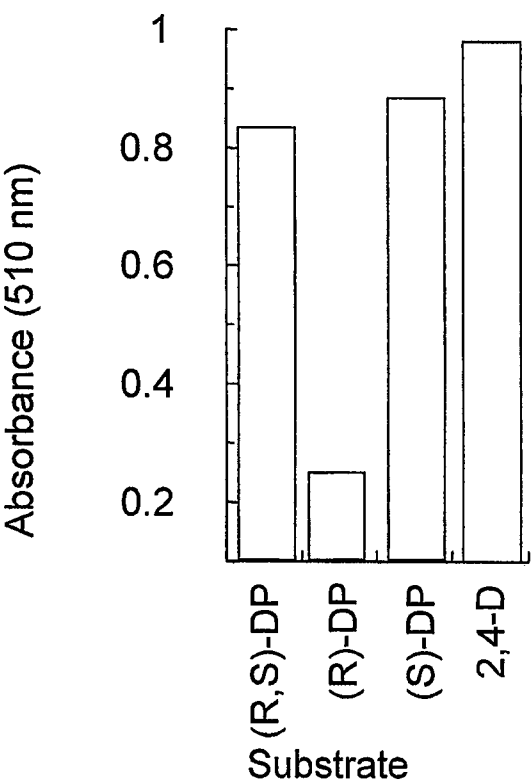


FIG. 3

SEQUENCE LISTING

<110> Wright, Terry R.
Lira, Justin M.
Walsh, Terence A.
Merlo, Donald J.
Jayakumar, Pon Samuel
Lin, Gaofeng

<120> Novel Herbicide Resistance Genes

<130> DAS-129XC1 PCT

<150> US 60/731,044

<151> 2005-10-28

<160> 15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 879

<212> DNA

<213> Delftia acidovorans

<400> 1

```
atgcagacga cgctgcagat taccgccaca ggccgccccc tgggcgccac cgtcaccggc      60
gtgcacctgg ccacgctgga cgacgccggc ttccgccccc tgcacgccgc ctggctgcag      120
catgcgctgc tgatcttccc cggccagcac ctccagcaacg accagcagat cacttttgcc      180
aaacgcttcg gcgcgatcga gcgcacggc ggccggcgaca tcgtggccat ctccaatgtc      240
aaggccgatg gcacgggtgcg ccagcacagc cccgccgagt gggacgacat gatgaaggtc      300
atcgtcggca acatggcctg gcatgccgac agcacctaca tgccgggtgat ggccgagggc      360
gcggtgttct cggccgaagt ggtgcccgca gtgggcgggc gcacctgctt cgccgacatg      420
cgcgcgcgct acgacgcgct ggacgaggcc acccgcgccc tgggtgcacca gcgctcggcg      480
cggcattcgc tgggtgtattc gcagagcaag ctggggccatg tgcagcaggc cggctcggcc      540
tacatcggct acggcatgga caccaccgcc acgcccctgc gcccgctggt caaggatcat      600
cccgagaccg gccgcccctc gctgctgacg ggccgccatg cccatgccat cccgggcatg      660
gacgccggcg aatccgagcg cttcctggaa ggccctggtcg actgggcctg ccaggcgccg      720
cgggtgcatg cccapcaatg ggccgccggc gacgtggtgg tgtgggacaa ccgctgcctg      780
ctgcaccgcg ccgagccctg ggatttcaag ctgccgcggg tgatgtggca cagccgcctg      840
gccggccgcc ccgagaccga gggcgccgcc ctggtgtaa                                879
```

<210> 2

<211> 292

<212> PRT
<213> Delftia acidovorans

<400> 2

Met Gln Thr Thr Leu Gln Ile Thr Pro Thr Gly Ala Thr Leu Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Thr Gly Val His Leu Ala Thr Leu Asp Asp Ala Gly Phe Ala
20 25 30

Ala Leu His Ala Ala Trp Leu Gln His Ala Leu Leu Ile Phe Pro Gly
35 40 45

Gln His Leu Ser Asn Asp Gln Gln Ile Thr Phe Ala Lys Arg Phe Gly
50 55 60

Ala Ile Glu Arg Ile Gly Gly Gly Asp Ile Val Ala Ile Ser Asn Val
65 70 75 80

Lys Ala Asp Gly Thr Val Arg Gln His Ser Pro Ala Glu Trp Asp Asp
85 90 95

Met Met Lys Val Ile Val Gly Asn Met Ala Trp His Ala Asp Ser Thr
100 105 110

Tyr Met Pro Val Met Ala Gln Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val
115 120 125

Pro Ala Val Gly Gly Arg Thr Cys Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr
130 135 140

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

Arg His Ser Leu Val Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Val Gln Gln
165 170 175

Ala Gly Ser Ala Tyr Ile Gly Tyr Gly Met Asp Thr Thr Ala Thr Pro
180 185 190

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

Leu Ile Gly Arg His Ala His Ala Ile Pro Gly Met Asp Ala Ala Glu
210 215 220

Ser Glu Arg Phe Leu Glu Gly Leu Val Asp Trp Ala Cys Gln Ala Pro
225 230 235 240

Arg Val His Ala His Gln Trp Ala Ala Gly Asp Val Val Val Trp Asp
245 250 255

Asn Arg Cys Leu Leu His Arg Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys Leu Pro
260 265 270

Arg Val Met Trp His Ser Arg Leu Ala Gly Arg Pro Glu Thr Glu Gly
275 280 285

3

Ala Ala Leu Val
290<210> 3
<211> 882
<212> DNA
<213> Delftia acidovorans

<400> 3
atggctcaga ccactctcca aatcacacccc actggtgccca ccttgggtgc cacagtcact 60
ggtgttcacc ttgccacact tgacgatgct ggtttcgctg ccctccatgc agcctggett 120
caacatgcac tcttgatctt ccctgggcaa cacctcagca atgaccaaca gattaccttt 180
gctaaacgct ttggagcaat tgagaggatt ggcggagggtg acattgttgc catatccaat 240
gtcaaggcag atggcacagt gcgccagcac tctcctgctg agtgggatga catgatgaag 300
gtcattgtgg gcaacatggc ctggcacgcc gactcaacct acatgccagt catggctcaa 360
ggagctgtgt tcagcgcaga agttgtccca gcagttgggg gcagaacctg ctttgctgac 420
atgagggcag cctacgatgc ccttgatgag gcaaccogtg ctcttggttca ccaaaggtct 480
gctcgtcact cccttggtga ttctcagagc aagttgggac atgtccaaca ggccgggtca 540
gcctacatag gttatggcat ggacaccact gcaactcctc tcagaccatt ggtcaagggtg 600
catcctgaga ctggaaggcc cagcctcttg atcgccgcc atgcccatgc catccctggc 660
atggatgcag ctgaatcaga gcgcttcctt gaaggacttg ttgactgggc ctgccaggct 720
cccagagtcc atgctcacca atgggctgct ggagatgtgg ttgtgtggga caaccgctgt 780
ttgctccacc gtgctgagcc ctgggatttc aagttgccac gtgtgatgtg gcactccaga 840
ctcgtgggac gccagaaaac tgagggtgct gccttggttt ga 882

<210> 4
<211> 293
<212> PRT
<213> Delftia acidovorans

<400> 4

Met Ala Gln Thr Thr Leu Gln Ile Thr Pro Thr Gly Ala Thr Leu Gly
1 5 10 15
Ala Thr Val Thr Gly Val His Leu Ala Thr Leu Asp Asp Ala Gly Phe
20 25 30
Ala Ala Leu His Ala Ala Trp Leu Gln His Ala Leu Leu Ile Phe Pro
35 40 45
Gly Gln His Leu Ser Asn Asp Gln Gln Ile Thr Phe Ala Lys Arg Phe
50 55 60

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

<210> 5
<211> 882
<212> DNA
<213> Delftia acidovorans

<400> 5
atggctcaga ctaccctgca gattaccccg actggtgcga ccctgggtgc aaccgttacc 60
ggcgttcacc tggcgactct ggatgacgca ggtttcgctg cgctgcacgc ggcttggctg 120
caacatgctc tcttgatttt cccaggtcag cacctgtcca acgaccagca aatcactttt 180

gcaaaacgct tccgtgcgat cgaacgtatc ggtggcgggtg atattgtggc gatctccaac 240
gtaaaagcgg atgggtactgt acgtcagcac agcccgccgg agtgggacga tatgatgaag 300
gtgatcgtag gcaacatggc atggcatgct gacagcacct acatgccggt tatggcgag 360
ggtgcgggtt tctctgctga agtgggttccg gcagtgggcg gtcgcacctg cttcgagac 420
atgcgtgcag cttacgacgc gttagacgaa gctaccgcg cactgggtaca ccagcgctct 480
gcgcgtcact ctctgggtgta ttcccagagc aaactgggcc acgttcagca agcgggctcc 540
gcatatatcg gctacgggtat ggataccact gcgacccgc tgcgtccgct ggtaaaagtg 600
catccgaaa ccggccgtcc gtctctcctg atcggccgtc acgtcatgc gattccgggt 660
atggacgcgg cagaatccga gcgtttcctg gaaggtctgg ttgattgggc ttgtcaggcg 720
ccgcgtgtgc atgctacca gtgggcagct ggcgacgtgg ttgtatggga taaccgctgc 780
ctgcttcacc gtgcagaacc gtgggacttt aagctgccac gtgttatgtg gcacagccgt 840
ctggcaggcc gccagaaaac cgagggcgcg gctctggttt aa 882

<210> 6
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized M13 forward sequencing primer

<400> 6
gtaaaacgac ggccag 16

<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized M13 reverse sequencing primer

<400> 7
caggaaacag ctatgac 17

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized forward AAD-12 (v1) PTU primer

<400> 8
gaacagttag acatggtcta aagg 24

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized reverse AAD-12 (v1) PTU primer

<400> 9
gctgcaacac tgataaatgc caactgg 27

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized forward AAD-12 (v1) coding PCR primer

<400> 10
atggctcaga ccactctcca aa 22

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized reverse AAD-12 (v1) coding PCR primer

<400> 11
agctgcatcc atgccagggga 20

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized SdpacodF: AAD-12 (v1) forward coding region primer

<400> 12
atggctcatg ctgccctcag cc 22

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized SdpacodR: AAD-12 (v1) reverse coding region primer

<400> 13
cgggcaggcc taactccacc aa 22

<210> 14
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized primer "NcoI of Brady"

<400> 14
tataccacat gtcgatcgcc atccggcagc tt 32

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized primer "SacI of Brady"

<400> 15
gagctcctat cactccgccg cctgctgctg cac 33

SEQUENCE LISTING

<110> Wright, Terry R.
Lira, Justin M.
Walsh, Terence A.
Merlo, Donald J.
Jayakumar, Pon Samuel
Lin, Gaofeng

<120> Novel Herbicide Resistance Genes

<130> DAS-129XC1 PCT

<150> US 60/731,044

<151> 2005-10-28

<160> 15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 879

<212> DNA

<213> Delftia acidovorans

<400> 1

atgcagacga cgctgcagat tacccccaca ggcgccaccc tgggggccac cgtcacccggc	60
gtgcacctgg ccacgctgga cgacgccggc ttgccgccc tgcacgccgc ctggctgcag	120
catgcgctgc tgatcttccc cggccagcac ctcagcaacg accagcagat cacttttgcc	180
aaacgcttcg gcgcgatcga gcgcacggc ggccggcgaca tcgtggccat ctccaatgtc	240
aaggccgatg gcacggtgcg ccagcacagc cccgccgagt gggacgacat gatgaaggtc	300
atcgtcggca acatggcctg gcatgccgac agcacctaca tgccggtgat ggccgagggc	360
gcggtgttct cggccgaagt ggtgcccga gtgggggggc gcacctgctt cgccgacatg	420
cgcgccgcct acgacgcgct ggacgaggcc acccgcgccc tgggtgcacca gcgctcggcg	480
cggcattcgc tgggtgtattc gcagagcaag ctggggccatg tgcagcaggc cggctcggcc	540
tacatcggct acggcatgga caccaccgcc acgcccctgc gcccgctggt caagggtgcat	600
cccagagaccg gccgcccctc gctgctgac gcccgccatg cccatgccat cccgggcatg	660
gacgccgccg aatccgagcg cttcctggaa ggccctggtcg actgggcctg ccaggcgccg	720
cggtgtcatg cccaccaatg ggccgccggc gacgtggtgg tgtgggacaa ccgctgcctg	780
ctgcaccgcg ccgagccctg ggatttcaag ctgccgcggg tgatgtggca cagccgcctg	840
gccggccgcc ccgagaccga gggcgccgcc ctggtgtaa	879

<210> 2

<211> 292

<212> PRT
<213> Delftia acidovorans

<400> 2

```

Met Gln Thr Thr Leu Gln Ile Thr Pro Thr Gly Ala Thr Leu Gly Ala
1          5          10          15

Thr Val Thr Gly Val His Leu Ala Thr Leu Asp Asp Ala Gly Phe Ala
20          25          30

Ala Leu His Ala Ala Trp Leu Gln His Ala Leu Leu Ile Phe Pro Gly
35          40          45

Gln His Leu Ser Asn Asp Gln Gln Ile Thr Phe Ala Lys Arg Phe Gly
50          55          60

Ala Ile Glu Arg Ile Gly Gly Gly Asp Ile Val Ala Ile Ser Asn Val
65          70          75          80

Lys Ala Asp Gly Thr Val Arg Gln His Ser Pro Ala Glu Trp Asp Asp
85          90          95

Met Met Lys Val Ile Val Gly Asn Met Ala Trp His Ala Asp Ser Thr
100         105         110

Tyr Met Pro Val Met Ala Gln Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val
115         120         125

Pro Ala Val Gly Gly Arg Thr Cys Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr
130         135         140

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

Arg His Ser Leu Val Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Val Gln Gln
165         170         175

Ala Gly Ser Ala Tyr Ile Gly Tyr Gly Met Asp Thr Thr Ala Thr Pro
180         185         190

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

Leu Ile Gly Arg His Ala His Ala Ile Pro Gly Met Asp Ala Ala Glu
210         215         220

Ser Glu Arg Phe Leu Glu Gly Leu Val Asp Trp Ala Cys Gln Ala Pro
225         230         235         240

Arg Val His Ala His Gln Trp Ala Ala Gly Asp Val Val Val Trp Asp
245         250         255

Asn Arg Cys Leu Leu His Arg Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys Leu Pro
260         265         270

Arg Val Met Trp His Ser Arg Leu Ala Gly Arg Pro Glu Thr Glu Gly
275         280         285

```


Ala Ala Leu Val
290

<210> 3
<211> 882
<212> DNA
<213> Delftia acidovorans

<400> 3
atggctcaga ccactctcca aatcacaccc actggtgcc ccttgggtgc cacagtcact 60
ggtgttcacc ttgccacact tgacgatgct ggtttcgctg ccctccatgc agcctggctt 120
caacatgcac tcttgatctt ccctgggcaa cacctcagca atgaccaaca gattaccttt 180
gctaaacgct ttggagcaat tgagaggatt ggcggagggtg acattgttgc catatccaat 240
gtcaaggcag atggcacagt gcgccagcac tctctgctg agtgggatga catgatgaag 300
gtcattgtgg gcaacatggc ctggcacgcc gactcaacct acatgccagt catggctcaa 360
ggagctgtgt tcagcgcaga agttgtccca gcagttgggg gcagaacctg ctttgcctgac 420
atgagggcag cctacgatgc ccttgatgag gcaaccogtg ctcttgttca ccaaaggtct 480
gctcgtcact cccttgtgta ttctcagagc aagttgggac atgtccaaca ggccgggtca 540
gcctacatag gttatggcat ggacaccact gcaactcctc tcagaccatt ggtcaagggtg 600
catcctgaga ctggaaggcc cagcctcttg atcgccgcc atgcccatgc catccctggc 660
atggatgcag ctgaatcaga gcgcttcctt gaaggacttg ttgactgggc ctgccaggct 720
cccagagtcc atgctcacca atgggctgct ggagatgtgg ttgtgtggga caaccgctgt 780
ttgctccacc gtgctgagcc ctgggatttc aagttgccac gtgtgatgtg gcaactccaga 840
ctcgtggac gccagaaac tgagggtgct gccttggttt ga 882

<210> 4
<211> 293
<212> PRT
<213> Delftia acidovorans

<400> 4

Met Ala Gln Thr Thr Leu Gln Ile Thr Pro Thr Gly Ala Thr Leu Gly
1 5 10 15
Ala Thr Val Thr Gly Val His Leu Ala Thr Leu Asp Asp Ala Gly Phe
20 25 30
Ala Ala Leu His Ala Ala Trp Leu Gln His Ala Leu Leu Ile Phe Pro
35 40 45
Gly Gln His Leu Ser Asn Asp Gln Gln Ile Thr Phe Ala Lys Arg Phe
50 55 60

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

<210> 5
<211> 882
<212> DNA
<213> Delftia acidovorans

<400> 5
atggctcaga ctaccctgca gattaccccg actggtgcga ccctgggtgc aaccgttacc 60
ggcgttcacc tggcgactct ggatgacgca ggtttcgctg cgctgcacgc ggcttggctg 120
caacatgctc tcttgatttt cccaggtcag cacctgtcca acgaccagca aatcactttt 180

PCT/US06/42133

5

gcaaaacgct tcggtgcat cgaacgtatc ggtggcgggtg atattgtggc gatctccaac 240
gtaaaagcgg atggtactgt acgtcagcac agcccgccgg agtgggacga tatgatgaag 300
gtgatcgtag gcaacatggc atggcatgct gacagcacct acatgccggt tatggcgag 360
ggtgcggttt tctctgctga agtgggtccg gcagtgggag gtcgcacctg cttcgagac 420
atgctgtag cttacgacgc gttagacgaa gctaccgag cactgggtaca ccagcgctct 480
gcgcgtcact ctctgggtga ttcccagagc aaactggggc acgttcagca agcgggctcc 540
gcatatatcg gctacggtat ggataccact gcgacccgc tgcgtccgct ggtaaaagt 600
catccgaaa ccggccgtcc gtctctctg atcgccgctc acgtcatgc gattccgggt 660
atggacgcgg cagaatccga gcgtttctg gaaggtctgg ttgattgggc ttgtcaggcg 720
ccgcgtgtgc atgctacca gtgggcagct ggcgacgtgg ttgtatggga taaccgctgc 780
ctgcttcacc gtgcagaacc gtgggacttt aagctgccac gtgttatgtg gcacagccgt 840
ctggcaggcc gccagaaac cgagggcgcg gctctggttt aa 882

<210> 6
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized M13 forward sequencing primer

<400> 6
gtaaaacgac ggccag 16

<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized M13 reverse sequencing primer

<400> 7
caggaaacag ctatgac 17

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized forward AAD-12 (v1) PTU primer

<400> 8
gaacagttag acatggtcta aagg 24

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Chemically synthesized reverse AAD-12 (v1) PTU primer

<400> 9
 gctgcaacac tgataaatgc caactgg 27

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Chemically synthesized forward AAD-12 (v1) coding PCR primer

<400> 10
 atggctcaga ccactctcca aa 22

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Chemically synthesized reverse AAD-12 (v1) coding PCR primer

<400> 11
 agctgcatcc atgccagga 20

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Chemically synthesized SdpacodF: AAD-12 (v1). forward coding region primer

<400> 12
 atggctcatg ctgccctcag cc 22

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Chemically synthesized SdpacodR: AAD-12 (v1) reverse coding region primer

PCT/US06/42133

7

<400> 13
cgggcaggcc taactccacc aa 22

<210> 14
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized primer "NcoI of Brady"

<400> 14
tataccacat gtcgatcgcc atccggcagc tt 32

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chemically synthesized primer "SacI of Brady"

<400> 15
gagctcctat cactccgccg cctgctgctg cac 33

NUEVOS GENES DE RESISTENCIA A HERBICIDAS

Antecedentes de la Invención

Las malezas pueden agotar rápidamente los valiosos nutrientes del suelo necesarios para los cultivos y otras plantas de interés. Hay muchos tipos diferentes de herbicidas usados en la actualidad para el control de malezas. Un herbicida extremadamente popular es glifosato.

Se han desarrollado cultivos, tales como maíz, soja, canola, algodón, remolacha azucarera, trigo, césped, y arroz, que son resistentes a glifosato. En consecuencia, los campos en los cuales se cultiva activamente soja resistente a glifosato, por ejemplo, se pueden rociar para controlar malezas sin dañar significativamente las plantas de soja.

Con la introducción de cultivos sometidos a ingeniería genética, tolerantes a glifosato (GTCs), a mediados de la década de 1990, se proveyó a los agricultores una herramienta simple, conveniente, flexible y de bajo costo para el control de un amplio espectro de malezas de hojas anchas y gramíneas sin parangón en la agricultura. En consecuencia, los productores adoptaron rápidamente los GTCs y en muchos casos abandonaron muchas de las mejores prácticas agronómicas aceptadas por ejemplo rotación de cultivos, rotación de modo de acción de herbicidas, el mezclado en tanques, la incorporación de elementos mecánicos con control químico y cultural de malezas. En la actualidad los soja, algodón, maíz, y canola tolerantes a glifosato están disponibles comercialmente en los Estados Unidos y en otras partes del Hemisferio Occidental. La alfalfa fue el primer GTC perenne introducido, impulsando la oportunidad para el uso repetido del glifosato en el mismo cultivo y campos de modo reiterado durante un período de años. Más GTCs (*por ejemplo*, trigo, arroz, remolacha azucarera, césped, *etc.*) son candidatos para su introducción

218099

MFT

pendiente de la aceptación del mercado global. Muchas otras especies resistentes a glifosato están en las etapas experimental a las de desarrollo (*por ejemplo*, caña de azúcar, girasol, remolachas, arvejas, zanahoria, pepino, lechuga, cebolla, frutilla, tomate, y tabaco; especies forestales tales como álamo y liquidámbar; y especies hortícolas tales como caléndula, petunia, y begonias; véase el sitio web "isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005"). Además, el costo del glifosato ha descendido drásticamente en años recientes hasta el punto de que pocos programas convencionales de control de malezas pueden competir efectivamente en precio y rendimiento con los sistemas de glifosato GTC.

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

El uso extensivo de programas de control de maleza sólo con glifosato da como resultado la selección de malezas resistentes a glifosato, y se selecciona para la propagación de especies de maleza que son inherentemente más tolerantes a glifosato que la mayoría de las especies blanco (*es decir*, variaciones de maleza). (Powles y Preston, 2006, Ng *et al.*, 2003; Simarmata *et al.*, 2003; Lorraine-Colwill *et al.*, 2003; Sfiligoj, 2004; Miller *et al.*, 2003; Heap, 2005; Murphy *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2002.) Si bien glifosato ha tenido amplio uso global durante más de 15 años, sólo se ha informado un puñado de malezas que hayan desarrollado resistencia a glifosato (Heap, 2005); no obstante, la mayoría de ellos se han identificado en los últimos cinco años. Las malezas resistentes incluyen

tanto a especies gramíneas como de hojas anchas—*Lolium rigidum*, *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica*, *Sorghum halepense*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Conyza canadensis*, *Conyza bonariensis*, *Plantago lanceolata*, *Amaranthus consecuencia palmerii*, y *Amaranthus consecuencia rudis*. Además, las malezas que previamente no habían sido un problema agronómico antes del uso amplio de GTCs ahora están siendo más prevalentes y difíciles de controlar en el contexto de GTCs, que comprende >80% de las acres de algodón y soja de los Estados Unidos y >20% de los acres de maíz de los Estados Unidos (Gianessi, 2005). Estas variaciones de la maleza ocurren predominantemente (pero no exclusivamente) con malezas de hojas anchas difíciles de controlar. Algunos ejemplos incluyen especies de *Ipomoea*, *Amaranthus consecuencia*, *Chenopodium*, *Taraxacum* y *Commelina*.

En áreas en las cuales los agricultores se enfrentan con malezas resistentes a glifosato o especies que se modifican para dar malezas más difíciles de controlar, los agricultores pueden compensar la debilidad del glifosato mediante mezclas en tanques o al alternar con otros herbicidas que controlarán las malezas supervivientes. Un compañero popular y eficaz de mezcla en tanque para el control de escapes de hojas anchas ha sido en muchos casos el ácido 2,4–diclorofenoxiacético (2,4-D). Se ha usado 2,4-D en agricultura y en situaciones de no cultivo para el control de amplio espectro, de malezas de hojas anchas durante más de 60 años. Han sido informados casos individuales de especies más tolerantes, pero 2,4-D sigue siendo uno de los herbicidas más ampliamente usados globalmente. Una limitación para el uso posterior de 2,4-D es que su selectividad en cultivos de dicotiledóneas tales como soja o algodón es muy baja, y en consecuencia 2,4-D generalmente no se usa (y generalmente ni cerca) de cultivos sensibles de dicotiledóneas. Además, el uso de 2,4-D en cultivos de gramíneas está en parte limitado por la naturaleza de daños que pueden ocurrir en el cultivo. Se ha usado 2,4-D en combinación con glifosato para

proporcionar un tratamiento de quemado más intenso antes de plantar soja y algodón de no labranza; sin embargo, debido a la sensibilidad de estas especies de dicotiledóneas a 2,4-D, estos tratamientos de quemado deben tener lugar al menos 14-30 días antes de la siembra (Agrilience, 2005).

2,4-D pertenece a la clase de herbicidas fenoxiácidos, tal como el MCPA. 2,4-D se ha usado en muchos cultivos de monocotiledóneas (por ejemplo maíz, trigo, y arroz) para el control selectivo de malezas de hojas anchas sin dañar severamente las plantas cultivadas deseadas. 2,4-D es un derivado de auxina sintética que actúa para desregular la homeostasis de la hormona celular normal e impedir el crecimiento equilibrado, controlado; sin embargo, aún se desconoce el modo exacto de acción. Triclopir y fluroxipir son herbicidas de ácido piridiloxiacético cuyo modo de acción también es como el de una auxina sintética.

Estos herbicidas tienen diferentes niveles de selectividad sobre ciertas plantas (*por ejemplo*, las dicotiledóneas son más sensibles que los pastos). El metabolismo diferencial de diferentes plantas es una explicación de los niveles variables de selectividad. En general, las plantas metabolizan 2,4-D lentamente, por lo que es probable que la respuesta variable de las plantas a 2,4-D se pueda explicar por la diferente actividad en el(os) sitio(s) blanco (WSSA, 2002). El metabolismo vegetal de 2,4-D generalmente ocurre a través de un mecanismo de dos fases, generalmente hidroxilación seguida de conjugación con aminoácidos o glucosa (WSSA, 2002).

Con el tiempo, las poblaciones microbianas han desarrollado una vía alternativa y eficiente para la degradación de este xenobiótico particular, que resulta en la completa mineralización de 2,4-D. Las sucesivas aplicaciones del herbicida seleccionan los microbios que pueden utilizar el herbicida como fuente de carbono para el crecimiento, proporcionándoles una ventaja competitiva en el suelo. Por esta razón, el 2,4-D actualmente formulado tiene una vida media en

suelo relativamente corta, y no se hallan efectos de transporte significativos para los cultivos posteriores. Esto se agrega a la utilidad herbicida de 2,4-D.

Un organismo que se ha investigado extensamente por su capacidad para degradar 2,4-D es *Ralstonia eutropha* (Streber *et al.*, 1987). El gen que codifica el primer paso enzimático en la vía de mineralización es *tfdA*. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 6.153.401 y No. de Acceso a GENBANK M16730. *TfdA* cataliza la conversión de ácido 2,4-D a diclorofenol (DCP) a través de una reacción de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (Smejkal *et al.*, 2001). DCP tiene escasa actividad herbicida comparado con 2,4-D. Se ha usado *tfdA* en plantas transgénicas para otorgar resistencia a 2,4-D en plantas dicotiledóneas (por ejemplo, algodón y tabaco) normalmente sensibles a 2,4-D (Streber *et al.* (1989), Lyon *et al.* (1989), Lyon (1993), y patente de los Estados Unidos No. 5.608.147).

Se ha identificado una gran cantidad de genes de tipo *tfdA* que codifican proteínas capaces de degradar 2,4-D a partir del medioambiente y se depositaron en la base de datos de Genbank. Muchos homólogos son similares a *tfdA* (>85% de identidad de aminoácidos) y tienen propiedades enzimáticas similares a *tfdA*. Sin embargo, hay una cantidad de homólogos que poseen una identidad significativamente menor con *tfdA* (25-50%), pero que tienen los residuos característicos asociados con α -cetoglutaratodioxigenasa Fe^{+2} dioxigenasas. En consecuencia no es obvio lo que son las especificidades del sustrato de estas dioxigenasas divergentes.

Un ejemplo singular con baja homología a *tfdA* (31% de identidad de aminoácido) es *sdpA* de *Delftia acidovorans* (Kohler *et al.*, 1999, Westendorf *et al.*, 2002, Westendorf *et al.*, 2003). Se demostró que esta enzima cataliza el primer paso en (S)-diclorprop (y otros ácidos (S)-fenoxipropiónicos) además de la

mineralización de 2,4-D (un ácido fenoxiacético) (Westendorf *et al.*, 2003). La transformación de este gen en plantas, no se ha informado hasta el momento.

El desarrollo de nuevas tecnologías de cultivos tolerantes a herbicidas (HTC) ha tenido éxito limitado debido en gran medida a la eficacia, bajo costo, y conveniencia de GTCs. En consecuencia, ha tenido lugar un muy alto grado de adopción de GTC entre los productores. Esto creó escaso incentivo para desarrollar nuevas tecnologías HTC.

Las subestructuras químicas de ariloxialcanoato son una entidad común de muchos herbicidas comercializados incluyendo las auxinas de fenoxiacetato (tales como 2,4-D y diclorprop), las auxinas de piridiloxiacetato (por ejemplo fluroxipir y triclopir), ariloxifenoxipropionatos (AOPP) inhibidores de acetilcoenzima A-carboxilasa (ACCase) (por ejemplo haloxifop, quizalofop, y diclofop), e inhibidores de fenoxiacetato protoporfirinogenooxidasa IX 5-sustituida (tales como piraflufeno y flumiclorac). Sin embargo, estas clases de herbicidas son todas bastante distintas, y no hay evidencias en la bibliografía actual sobre vías de degradación comunes entre estas clases químicas. Una enzima multifuncional para la degradación de herbicidas que cubre múltiples modos de acción ha sido descrita recientemente (PCT US/2005/014737; presentada el 2 de mayo de 2005). Otra singular enzima multifuncional y los usos potenciales se describen a continuación.

Breve Síntesis de la Invención

La presente invención provee nuevas plantas que no sólo son resistentes a 2,4-D, sino también a herbicidas de piridiloxiacetato. Hasta el momento, no se esperaba ni se sugería que una planta con estas dos propiedades ventajosas pudieran ser producidas por la introducción de un único gen. La presente invención también incluye plantas que producen una o más enzimas de la presente invención "apiladas" junto con uno o más de otros genes de resistencia a

herbicidas, incluso, pero sin limitaciones, genes de resistencia a glifosato, ALS (imidazolinona, sulfonilurea), ariloxialcanoato, HPPD, PPO, y glufosinato, a fin de proporcionar plantas tolerantes a herbicidas compatibles con un control de malezas más anchas y más fuertes y opciones de manejo de resistencia a herbicidas. La presente invención también incluye métodos y composiciones que utilizan homólogos de los genes y proteínas ejemplificados en la presente.

En algunas realizaciones, la invención provee plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas tolerantes a 2,4-D, MCPA, triclopir, fluroxipir, y uno o más herbicidas disponibles en el comercio (*por ejemplo*, glifosato, glufosinato, paraquat, inhibidores de ALS (*por ejemplo*, sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidin sulfonanilidas, y otros), inhibidores de HPPD (*por ejemplo*, mesotriona, isoxaflutol, y *otros*), dicamba, bromoxinilo, ariloxifenoxipropionatos, y otros). También se describen vectores que comprenden secuencias de ácidos nucleicos responsables de dicha tolerancia a herbicidas, al igual que métodos para usar dichas plantas tolerantes y combinaciones de herbicidas para el control de malezas y la prevención de cambios de población de malezas. La presente invención permite usar nuevas combinaciones de herbicidas en formas nuevas. Además, la presente invención provee nuevos métodos para prevenir el desarrollo de, y controlar, cepas de malezas que son resistentes a uno o más herbicidas tales como glifosato. La presente invención permite nuevos usos de nuevas combinaciones de herbicidas y cultivos, incluso la aplicación previa a la siembra a un área que se planta inmediatamente antes de sembrar con semillas para plantas que de otro modo serían sensibles a ese herbicida (*por ejemplo* 2,4-D).

La presente invención se refiere en parte a la identificación de una enzima que no sólo es capaz de degradar 2,4-D, sino también que posee sorprendentemente nuevas propiedades, que distinguen la enzima de la presente invención de las antes conocidas proteínas *tfdA*, *por ejemplo*. Más

específicamente, la presente invención se refiere al uso de una enzima que es capaz de degradar ambos herbicidas 2,4-D y piridiloxiacetato. No se ha informado previamente ninguna enzima de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato con capacidad para degradar herbicidas de fenoxiacetato y piridiloxiacetato auxina. Se efectúa referencia a la enzima y el gen de preferencia para utilizar de acuerdo con la presente invención en la presente como AAD-12 (AriloxiAlcanoatoDioxigenasa). Este descubrimiento altamente nuevo es la base de las oportunidades de cultivos con rasgo de significativa tolerancia a herbicida (HTC) y de marcador seleccionable. Las plantas de la presente invención pueden ser resistentes durante todo su ciclo de vida completo.

No había motivación previa para producir plantas que comprendan un gen AAD-12 (de preferencia un polinucleótido AAD-12 que tenga una secuencia optimizada para la expresión en uno o más tipos de plantas, tal como se ejemplifica en la presente), y no había expectativas de que dichas plantas pudieran efectivamente producir una enzima AAD-12 para transformar las plantas en resistentes al herbicida de ácido fenoxiacético (tal como 2,4-D) y/o a uno o más herbicidas de piridiloxiacetato tales como triclopir y fluroxipir. En consecuencia, la presente invención provee muchas ventajas que hasta el momento no se habían pensado como posibles en la técnica.

Esta invención también se refiere en parte a la identificación y al uso de genes que codifican enzimas ariloxialcanoatodioxigenasa con capacidad para degradar herbicidas de fenoxiacetato auxina y piridiloxiacetato auxina. Los métodos para analizar proteínas con estas actividades están dentro del alcance de la presente invención. En consecuencia, la presente invención incluye la degradación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y otros herbicidas de ariloxialcanoato auxina mediante una enzima AAD-12 expresada de modo recombinante. La presente invención también incluye métodos de control de

malezas en donde dichos métodos comprenden aplicar uno o más herbicidas de piridiloxiacetato o fenoxiacetato auxina a plantas que comprenden un gen *AAD-12*. La presente invención también provee métodos para usar un gen *AAD-12* como marcador seleccionable para identificar células vegetales y plantas enteras transformadas con *AAD-12*, que opcionalmente incluyen uno, dos o más genes exógenos insertados simultáneamente en las células vegetales blanco. Los métodos de la presente invención incluyen seleccionar células transformadas que son resistentes a los apropiados niveles de un herbicida. La presente invención también incluye métodos para preparar un polipéptido, que posea la actividad biológica de ariloxialcanoatodioxigenasa, mediante el cultivo de plantas y/o células de la presente invención.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 ilustra la reacción química general que es catalizada por las enzimas *AAD-12* de la presente invención.

La Figura 2 es una alineación de secuencias de aminoácidos de una proteína *AAD-12*, *TfdA*, *AAD-2*, *AAD-I*, y *TauD* ejemplificadas.

La Figura 3 ilustra la actividad de *AAD-12* (v2) en 2,4-D y enantiómeros de diclorprop.

Breve Descripción de las Secuencias

SEC ID NO:1 es la secuencia de nucleótidos de *AAD-12* de *Delftia acidovorans*.

SEC ID NO:2 es la secuencia de proteínas traducidas codificada por SEC ID NO:1.

SEC ID NO:3 es la secuencia de nucleótidos vegetal optimizada de *AAD-12* (v1).

SEC ID NO:4 es la secuencia de proteínas traducidas codificada por SEC ID NO:3.

SEC ID NO:5 es la secuencia de nucleótidos optimizada de AAD-12 (v2) de *E. coli*.

SEC ID NO:6 es la secuencia del cebador directo M13.

SEC ID NO:7 es la secuencia del cebador inverso M13.

SEC ID NO:8 es la secuencia del cebador directo PTU de AAD-12 (v1).

SEC ID NO:9 es la secuencia del cebador inverso PTU de AAD-12 (v1).

SEC ID NO:10 es la secuencia del cebador directo de PCR que codifica AAD-12 (v1).

SEC ID NO:11 es la secuencia del cebador inverso de PCR que codifica AAD-12 (v1).

SEC ID NO:12 muestra la secuencia del cebador "sdpacodF" AAD-12 (v1).

SEC ID NO:13 muestra la secuencia del cebador "sdpacodR" AAD-12 (v1).

SEC ID NO:14 muestra la secuencia del cebador "Nco1 of Brady".

SEC ID NO:15 muestra la secuencia del cebador "Sac1 of Brady".

Descripción Detallada de la Invención

El desarrollo objeto del gen de resistencia a 2,4-D y los posteriores cultivos resistentes proveen excelentes opciones para el control de especies de malezas de hojas anchas, resistentes a glifosato (o muy tolerantes y modificadas) para aplicaciones en cultivos. 2,4-D es un herbicida de hojas anchas de amplio espectro, relativamente económico, y fuerte que podría proveer excelente utilidad para los agricultores si se pudiera proporcionar de igual modo mayor tolerancia de los cultivos en cultivos de dicotiledóneas y monocotiledóneas. Los cultivos de dicotiledóneas transgénicos tolerantes a 2,4-D también tendrían mayor flexibilidad de oportunidad y proporción de aplicación. Una utilidad adicional del rasgo de

tolerancia a herbicida objetivo para 2,4-D es su utilidad para prevenir daños en cultivos normalmente sensibles por vandalismo, mala aplicación, inversión (u otro fenómeno de movimiento fuera del sitio), volatilización, dispersión de 2,4-D, y similares. Un beneficio adicional del gen *AAD-12* es que a diferencia de todos los homólogos de *tfdA* caracterizados hasta la fecha, *AAD-12* puede degradar las piridiloxiacetato auxinas (*por ejemplo*, triclopir, fluroxipir) además de las fenoxi auxinas aquirales (*por ejemplo*, 2,4-D, MCPA, ácido 4-clorofenoxiacético). Véase la **Tabla 1**. En la Figura 1 se muestra una ilustración general de las reacciones químicas catalizadas por la enzima *AAD-12* objetivo. (La adición de O₂ es estereoespecífica; la descomposición del intermediario a fenol y glioxilato es espontánea). Debería comprenderse que las estructuras químicas en la Figura 1 ilustran las principales estructuras moleculares y que diversos grupos R y similares (tales como aquéllos que se muestran en la Tabla 1) se encuentran incluidos pero no necesariamente ilustrados específicamente en la Figura 1. Múltiples mezclas de distintas combinaciones de fenoxi auxina se han usado globalmente para cubrir las condiciones ambientales y los espectros de malezas específicos en diversas regiones. El uso del gen *AAD-12* en plantas otorga protección a un espectro mucho más amplio de herbicidas de auxina, lo cual aumenta la flexibilidad y los espectros de las malezas que pueden ser controladas. La presente invención también se puede utilizar para la protección de la dispersión o de otros daños por descolocación de herbicidas de auxina sintética en toda la amplitud de las fenoxiauxinas disponibles en el comercio. La **Tabla 1** define piridiloxi y fenoxi auxinas disponibles en el comercio y provee estructuras químicas relevantes.

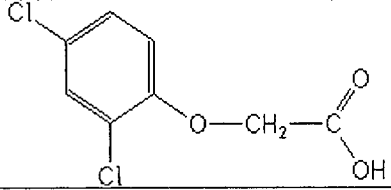
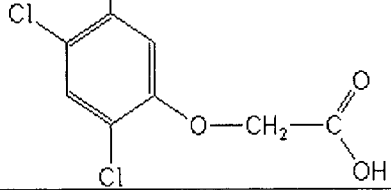
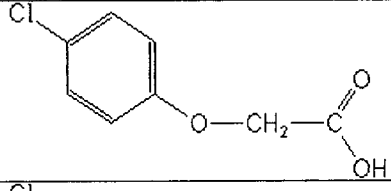
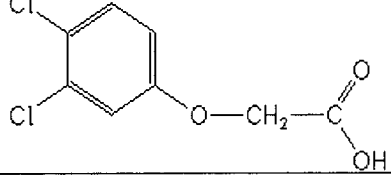
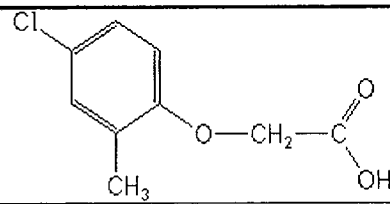
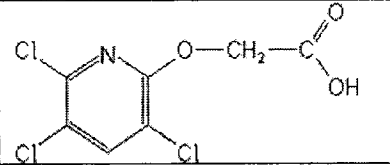
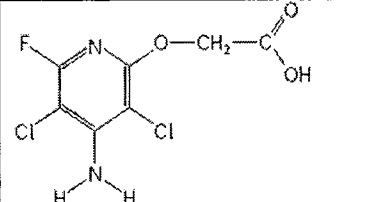
Tabla 1. Fenoxiacetato y piridiloxiacetato auxinas disponibles en el comercio. La referencia a herbicidas de fenoxi auxina y piridiloxi auxina generalmente se hace al ácido activo pero algunos se formulan en el comercio como cualquiera de una variedad de las correspondientes formulaciones éster y de modo similar éstas se consideran como sustratos para la enzima AAD-12 <i>in planta</i> a medida que las esterasas de plantas generales convierten estos ésteres en los ácidos activos <i>in planta</i> . De modo similar también se puede hacer referencia a la correspondiente sal orgánica o inorgánica del ácido correspondiente. Los rangos posibles de proporción de uso pueden ser tratamientos individuales o en combinación con otros herbicidas de uso tanto en cultivos como en no cultivos.				
Nombre químico	CAS no	Posibles rangos de proporción de uso (g ae/ha)	Rangos de proporción de uso preferidos (g ae/ha)	Estructura
2,4-D	94-75-7	25 – 4000	280 - 1120	
2,4,5-T	93-76-5	25 – 4000	25 – 4000	
4-CPA	122-88-3	25 – 4000	25 – 4000	
3,4-DA	588-22-7	25 – 4000	25 – 4000	

Tabla 1. Fenoxiacetato y piridiloxiacetato auxinas disponibles en el comercio. La referencia a herbicidas de fenoxi auxina y piridiloxi auxina generalmente se hace al ácido activo pero algunos se formulan en el comercio como cualquiera de una variedad de las correspondientes formulaciones éster y de modo similar éstas se consideran como sustratos para la enzima AAD-12 <i>in planta</i> a medida que las esterasas de plantas generales convierten estos ésteres en los ácidos activos <i>in planta</i> . De modo similar también se puede hacer referencia a la correspondiente sal orgánica o inorgánica del ácido correspondiente. Los rangos posibles de proporción de uso pueden ser tratamientos individuales o en combinación con otros herbicidas de uso tanto en cultivos como en no cultivos.				
Nombre químico	CAS no	Posibles rangos de proporción de uso (g ae/ha)	Rangos de proporción de uso preferidos (g ae/ha)	Estructura
MCPA	94-74-6	25 – 4000	125 - 1550	
Triclopir	55335-06-3	50 – 2000	70 – 840	
Fluroxipir	69377-81-7	25 – 2000	35 – 560	

Ahora se ha identificado un único gen (AAD-12) el cual, cuando es sometido a ingeniería genética para su expresión en plantas, tiene las propiedades de permitir el uso de herbicidas de fenoxi auxina en plantas en las

cuales nunca existió tolerancia inherente o no era lo suficientemente elevado para permitir el uso de estos herbicidas. Además, *AAD-12* puede proveer protección *in planta* contra herbicidas de piridiloxiacetato cuando la tolerancia natural tampoco era suficiente para permitir la selectividad, y expandir la potencial utilidad de estos herbicidas. Las plantas que contienen *AAD-12* solo ahora pueden ser tratadas en secuencia o mezcladas en tanque con uno, dos o una combinación de varios herbicidas de fenoxi auxina. La proporción para cada herbicida de fenoxi auxina puede variar de 25 a 4000 g ae/ha, y más generalmente de 100 a 2000 g ae/ha para el control de un amplio espectro de malezas dicotiledóneas. De modo similar, se puede aplicar uno, dos, o una mezcla de varios compuestos de piridiloxiacetato auxina a plantas que expresan *AAD-12* con riesgo reducido de daño por dichos herbicidas. La proporción de cada herbicida de piridiloxiacetato puede variar de 25 a 2000 g ae/ha, y más generalmente de 35-840 g ae/ha para el control de malezas dicotiledóneas adicionales.

El glifosato se usa extensamente porque éste controla un muy amplio espectro de especies de malezas de hojas anchas y gramíneas. Sin embargo, el uso repetido de glifosato en GTCs y en aplicaciones no de cultivos ha causado selecciones, y continuará, de variaciones de malezas a especies naturalmente más tolerantes o biotipos resistentes a glifosato. Los compañeros herbicidas de mezclas en tanque usados en proporciones eficaces que ofrecen el control de las mismas especies pero que poseen diferentes modos de acción se prescriben por la mayoría de las estrategias de manejo de resistencia a herbicidas como método para retrasar la aparición de malezas resistentes. Al apilar *AAD-12* con un rasgo de tolerancia a glifosato (y/o con otros rasgos de tolerancia a herbicidas) se proveería un mecanismo que permite el control de especies de malezas dicotiledóneas resistentes a glifosato en GTCs al permitir el uso de herbicidas de fenoxi auxina(s) (*por ejemplo*, 2,4-D) y piridiloxiacetato auxina (*por ejemplo*,

triclopir), glifosato selectivamente en el mismo cultivo. Las aplicaciones de estos herbicidas podría ser simultánea en una mezcla en tanque que comprende dos o más herbicidas de diferentes modos de acción; aplicaciones individuales de composiciones de herbicida único en aplicaciones en secuencia como aplicaciones antes de la siembra, preemergencia, o postemergencia y en momentos diferentes que varían de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 meses; o, alternativamente, cualquier combinación de cualquier cantidad de herbicidas que representan cada clase química se puede aplicar en cualquier período dentro de aproximadamente 7 meses de la siembra del cultivo hasta la cosecha del cultivo (o el intervalo previo a la cosecha para el herbicida individual, cualquiera sea el más corto).

Es importante tener flexibilidad en el control del amplio espectro de malezas de hojas anchas y gramíneas en términos de oportunidad de aplicación, proporción de herbicidas individuales, y la capacidad para controlar malezas difíciles o resistentes. Las aplicaciones de glifosato en un cultivo con una pila de gen de resistencia a glifosato/AAD-12 podían variar de aproximadamente 250-2500 g ae/ha; se podría(n) aplicar herbicida(s) de fenoxi auxina (uno o más) de aproximadamente 25-4000 g ae/ha; y se podría(n) aplicar herbicida(s) piridiloxiacetato auxina (uno o más) de 25-2000 g ae/ha. La(s) combinación(es) óptima(s) y la oportunidad de esta(s) aplicación(es) dependerán de la situación particular, las especies, y el medioambiente, y se determinarán mejor por una persona experta en la técnica del control de malezas y con el beneficio de la descripción en cuestión.

Las plántulas son generalmente resistentes a través del ciclo de crecimiento completo. Las plantas transformadas generalmente serán resistentes a la aplicación de nuevos herbicidas en cualquier momento que se exprese el gen. En la presente se muestra la tolerancia a 2,4-D a través del ciclo de vida

utilizando los promotores constitutivos evaluados hasta el momento (principalmente CsVMV y AtUbi 10). Generalmente uno lo esperaría, pero ello constituye un avance en otras actividades no metabólicas donde la tolerancia puede sufrir un impacto de modo significativo por la reducida expresión de un sitio de mecanismo de acción de resistencia, por ejemplo. Un ejemplo es el algodón Roundup Ready, en el que las plantas fueron tolerantes si se rociaron previamente, pero si se rociaron demasiado tarde el glifosato se concentró en los meristemos (debido a que éste no es metabolizado y es translocado); los promotores virales Monsanto utilizados no se encuentran bien expresados en las flores. La presente invención provee un avance a este respecto.

Las formulaciones de herbicidas (*por ejemplo*, formulación de éster, ácido, o sal; o concentrado soluble, concentrado emulsificable, o líquido soluble) y aditivos de mezcla en tanque (*por ejemplo*, adyuvantes, surfactantes, retardantes de la dispersión, o agentes de compatibilidad) pueden afectar significativamente el control de malezas mediante determinado herbicida o combinación de uno o más herbicidas. Cualquier combinación de éstos con cualquiera de los productos químicos herbicidas antes mencionados se encuentra dentro del alcance de esta invención.

Un experto en la técnica también vería el beneficio de combinar dos o más modos de acción para aumentar el espectro de malezas controladas y/o para el control de especies de malezas naturalmente más tolerantes o resistentes. Ello también se podría extender a productos químicos que permitieron la tolerancia a herbicidas en cultivos a través de la intervención humana (ya sea de modo transgénico o no transgénico) además de GTC. De hecho, los rasgos que codifican resistencia a glifosato (*por ejemplo*, EPSPS, glifosato oxidoreductasa (GOX), GAT resistente a plantas o bacterias), resistencia a glufosinato (*por ejemplo*, Pat, bar), resistencia a herbicidas que inhiben acetolactato sintasa (ALS)

(*por ejemplo*, imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidina sulfonanilida, pirimidiniltiobenzoatos, y otros productos químicos = *AHAS*, *Csr1*, *SurA*, y otros), resistencia a bromoxinilo (*por ejemplo*, *Bxn*), resistencia a inhibidores de la enzima HPPD (4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa), resistencia a inhibidores de fitoeno desaturasa (PDS), resistencia a herbicidas inhibidores de fotosistema II (*por ejemplo*, *psbA*), resistencia a herbicidas inhibidores de fotosistema I, resistencia a herbicidas inhibidores a protoporfirinógeno oxidasa IX (PPO) (*por ejemplo*, *PPO-1*), resistencia a herbicidas de fenilurea (*por ejemplo*, *CYP76B1*), enzimas degradadoras de dicamba (*ver, por ejemplo*, US 20030135879), y otros se podrían apilar solos o en múltiples combinaciones a fin de proporcionar la capacidad para controlar o prevenir de modo efectivo las modificaciones y/o resistencia de la maleza a cualquier herbicida de las clases antes mencionadas. En algunas realizaciones preferidas se pueden utilizar EPSPS modificadas in vivo, así como también genes de resistencia a glifosato de Clase I, Clase II, y Clase III.

Respecto de los herbicidas adicionales, algunos inhibidores de ALS de preferencia adicionales incluyen pero no se limitan a las sulfonilureas (tales como clorsulfuron, halosulfuron, nicosulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, trifloxisulfuron), imidazoloninonas (tales como imazamox, imazetapir, imazaquin), triazolopirimidin sulfonanilidas (tales como cloransulam-metil, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, y penoxsulam), pirimidiniltiobenzoatos (tales como bispiribac y piritiobac), y flucarbazona. Algunos inhibidores de HPPD de preferencia incluyen pero no se limitan a mesotriona, isoxaflutol, y sulcotriona. Algunos inhibidores PPO de preferencia incluyen pero no se limitan a flumiclorac, flumioxazin, flufenpir, piraflufeno, flutiacet, butafenacil, carfentrazona, sulfentrazona, y los difeniléteres (tales como acifluorfenó, fomesafenó, lactofenó, y oxifluorfenó).

Además, AAD-12 solo o junto con uno o más rasgos HTC adicionales se pueden apilar con uno o más rasgos adicionales de entrada (*por ejemplo*, resistencia a insectos, resistencia a hongos, o tolerancia al estrés, y *otros*) o salida (*por ejemplo*, aumento de rendimiento, perfil de aceite mejorado, calidad de fibra mejorada, y *otros*). En consecuencia, la presente invención se puede usar para proporcionar un paquete agronómico completo de calidad mejorada del cultivo con la capacidad de controlar en forma flexible y efectiva en cuanto al costo cualquier cantidad de plagas agronómicas.

La presente invención se refiere en parte a la identificación de una enzima que no sólo es capaz de degradar 2,4-D, sino que también posee sorprendentemente nuevas propiedades, que distinguen la enzima de la presente invención de las proteínas *tfdA* antes conocidas, por ejemplo. Aún cuando esta enzima tiene muy escasa homología con *tfdA*, los genes de la presente invención aún se pueden clasificar en general en la misma familia global de dioxigenasas dependientes de α -cetoglutarato. Esta familia de proteínas se caracteriza por tres residuos de histidina conservados en un motivo "HX(D/E)X₂₃₋₂₆(T/S)X₁₁₄₋₁₈₃HX₁₀₋₁₃R" que comprende el sitio activo. Las histidinas coordinan el ión Fe^{+2} en el sitio activo que es esencial para la actividad catalítica (Hogan *et al.*, 2000). Los experimentos preliminares de expresión *in vitro* analizados en la presente fueron diseñados para contribuir a seleccionar los nuevos atributos. Estos experimentos también indican que la enzima AAD-12 es única respecto de otra enzima diferente de la misma clase, descrita en una solicitud de patente previamente presentada (PCT US/2005/014737; presentada el 2 de mayo de 2005). La enzima AAD-1 de esa solicitud sólo comparte aproximadamente el 25% de identidad de secuencia con la proteína AAD-12 objeto.

Más específicamente, la presente invención se refiere en parte al uso de una enzima que no sólo tiene capacidad para degradar 2,4-D, sino también

herbicidas de piridiloxiacetato. No se ha informado previamente ninguna enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato con capacidad para degradar herbicidas de diferentes clases químicas y modos de acción. Las enzimas y genes de preferencia para el uso de acuerdo con la presente invención se mencionan en la presente genes y proteínas AAD-12 (AriloxiAlcanoatoDioxigenasa).

Esta invención también se refiere en parte a la identificación y al uso de genes que codifican enzimas ariloxialcanoato dioxigenasas con capacidad para degradar herbicidas de fenoxi auxina y piridiloxi acetato. En consecuencia, la presente invención se refiere en parte a la degradación de herbicidas de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros ácidos fenoxiacéticos, y ácido piridiloxiacético mediante una enzima AAD-12 expresada de modo recombinante.

Las proteínas objeto tienen pruebas positivas para la conversión de 2,4-D a 2,4-diclorofenol ("DCP"; inactivo como herbicida) en ensayos analíticos. Las proteínas parcialmente purificadas de la presente invención pueden convertir rápidamente 2,4-D a DCP *in vitro*. Una ventaja adicional de las plantas con transformación AAD-12 es que el(os) herbicida(s) principal(es) se metabolizan a formas inactivas, lo cual reduce la posibilidad de cosechar residuos de herbicidas en granos o sobrantes de la recolección.

La presente invención también incluye métodos de control de malezas en donde dichos métodos comprenden aplicar un herbicida de piridiloxiacetato y/o fenoxi auxina a plantas que comprenden un gen AAD-12.

A la luz de estos descubrimientos, ahora se proveen nuevas plantas que comprenden un polinucleótido que codifica este tipo de enzima. Hasta este momento, no había motivación para producir dichas plantas, y no había expectativas de que dichas plantas efectivamente pudieran producir esta enzima para transformar las plantas en resistentes no sólo a herbicidas de fenoxi ácido (por ejemplo 2,4-D) sino también a herbicidas de piridiloxiacetato. En

consecuencia, la presente invención provee muchas ventajas en las que no se había pensado hasta el momento como posibles en la técnica.

Las cepas públicamente disponibles (depositadas en colecciones de cultivo tales como ATCC o DSMZ) se pueden adquirir y analizar, utilizando técnicas descritas en la presente, para los nuevos genes. Las secuencias descritas en la presente se pueden usar para amplificar y clonar los genes homólogos en un sistema de expresión recombinante para el análisis y el ensayo de acuerdo con la presente invención.

Tal como se analizó antes en la sección Antecedentes, un organismo extensamente estudiado por su capacidad para degradar 2,4-D es *Ralstonia eutropha* (Streber *et al.*, 1987). El gen que codifica la primera enzima en la vía de degradación es *tfdA*. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 6.153.401 y No. de Acceso a GENBANK M16730. *TfdA* cataliza la conversión de ácido 2,4-D al DCP inactivo como herbicida por medio de una reacción de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (Smejkal *et al.*, 2001). Se ha usado *tfdA* en plantas transgénicas para otorgar resistencia a 2,4-D en plantas dicotiledóneas (por ejemplo, algodón y tabaco) normalmente sensibles a 2,4-D (Streber *et al.*, 1989; Lyon *et al.*, 1989; Lyon *et al.*, 1993). Una gran cantidad de los genes de tipo *tfdA* que codifican proteínas con capacidad para degradar 2,4-D han sido identificados en el medioambiente y depositados en la base de datos de Genbank. Muchos homólogos son bastante similares a *tfdA* (>85% de identidad de aminoácidos) y tienen similares propiedades enzimáticas a *tfdA*. Sin embargo, actualmente se ha identificado una pequeña colección de homólogos de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato que poseen un bajo nivel de homología con *tfdA*.

La presente invención se refiere en parte a sorprendentes descubrimientos de nuevos usos y funciones de una enzima con relación distante, *sdpA*, de *Delftia*

acidivorans (Westendorf *et al.*, 2002, 2003) con baja homología con *tfdA* (31% de identidad de aminoácidos). Previamente se había demostrado que esta enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato purificada en su forma nativa degrada 2,4-D y S-diclorprop (Westendorf *et al.*, 2002 y 2003). Sin embargo, no se ha informado previamente ninguna enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato con capacidad para degradar herbicidas de la clase química de piridiloxiacetato. *SdpA* nunca ha sido expresado en plantas, ni hubo motivación para hacerlo en parte porque el desarrollo de nuevas tecnologías HTC ha sido limitado debido en gran medida a la eficacia, al bajo costo, y a la conveniencia de GTCs (Devine, 2005).

A la luz de las nuevas actividades, en la presente se hace referencia a las proteínas y genes de la presente invención como proteínas y genes AAD-12. Actualmente se confirmó que AAD-12 degrada una variedad de herbicidas de fenoxiacetato auxina *in vitro*. Sin embargo, sorprendentemente se halló que esta enzima, tal como se informó por primera vez en la presente, también tiene capacidad para degradar sustratos adicionales de la clase de moléculas de ariloxialcanoato. Los sustratos de significativa importancia agronómica incluyen herbicidas de piridiloxiacetato auxina. Este descubrimiento sumamente nuevo es la base de oportunidades significativas de los rasgos de Cultivos Tolerantes a Herbicida (HTC) y marcador seleccionable. Esta enzima es única en su capacidad para proporcionar actividad degradadora de herbicida en un rango de herbicidas de hojas anchas de amplio espectro (fenoxiacetato y piridiloxiacetato auxinas).

En consecuencia, la presente invención se refiere en parte a la degradación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, otros herbicidas de auxinas fenoxiacéticas, y herbicidas de piridiloxiacetato a través de una enzima ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-12) expresada de modo recombinante. Esta invención también se refiere en parte a la identificación y a los usos de genes que

codifican una enzima que degrada ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-12) con capacidad para degradar herbicidas de fenoxi y/o piridiloxi auxina.

La enzima objeto permite que la expresión transgénica dé por resultado la tolerancia a combinaciones de herbicidas que controlarían casi todas las malezas de hojas anchas. AAD-12 puede servir como un excelente rasgo de cultivo tolerante a herbicidas (HTC) para unirse con otros rasgos HTC [por ejemplo, resistencia a glifosato, resistencia a glufosinato, resistencia a inhibidores de ALS (por ejemplo, imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidin sulfoanilida), resistencia a bromoxinilo, resistencia a inhibidores de HPPD, resistencia a inhibidores de PPO, y otros], y rasgos de resistencia a insectos (*Cry1F*, *Cry1Ab*, *Cry 34/45*, otras Proteínas Bt., o proteínas insecticidas de un origen no *Bacilo*, y otras) por ejemplo. Además, AAD-12 puede actuar como marcador seleccionable para contribuir en la selección de transformantes primarios de plantas sometidas a ingeniería genética con un segundo gen o grupo de genes.

Además, el gen microbiano objeto se ha rediseñado de manera tal que la proteína es codificada por codones con una preferencia orientada tanto al uso de plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas (hemicotiledóneas). Se han transformado *Arabidopsis*, maíz, tabaco, algodón, soja, canola, y arroz con construcciones que contienen AAD-12 y se demostraron altos niveles de resistencia a ambos herbicidas de fenoxi y piridiloxi auxina. En consecuencia, la presente invención también se refiere a genes "vegetales optimizados" que codifican proteínas de la presente invención.

Los grupos oxialcanoato son útiles para introducir una funcionalidad ácida estable en los herbicidas. El grupo ácido puede impartir movilidad del floema por "atropamiento de ácido", un atributo deseable para la acción herbicida y en consecuencia se podría incorporar en nuevos herbicidas con fines de movilidad. Los aspectos de la presente invención también proveen un mecanismo de

creación de HTC. Existen muchos potenciales herbicidas comerciales y experimentales que pueden servir como sustratos de AAD-12. En consecuencia, el uso de los genes objeto también pueden dar por resultado asimismo tolerancia a herbicida para esos otros herbicidas.

Los rasgos HTC de la presente invención se pueden usar en nuevas combinaciones con otros rasgos HTC (que incluyen pero no se limitan a tolerancia a glifosato). Estas combinaciones de rasgos dan origen a nuevos métodos de control de especies de malezas (y similares), debido a la resistencia o la tolerancia inherente a herbicidas (*por ejemplo*, glifosato) recientemente adquiridas. En consecuencia, además de los rasgos HTC, los nuevos métodos para el control de malezas utilizando herbicidas, para los cuales se creó una tolerancia a herbicida mediante dicha enzima en cultivos transgénicos, se encuentran dentro del alcance de la invención.

Esta invención se puede aplicar en el contexto de la comercialización de un rasgo de resistencia a 2,4-D junto con los rasgos actuales de resistencia a glifosato en soja, por ejemplo. En consecuencia, esta invención provee una herramienta para combatir variaciones de especies de malezas de hojas anchas y/o selección de malezas de hojas anchas resistentes a herbicidas, que culmina de la extremadamente elevada dependencia de los agricultores al glifosato para el control de malezas con diversos cultivos.

La expresión transgénica de los genes objeto AAD-12 se ejemplifica, por ejemplo, en *Arabidopsis*, tabaco, soja, algodón, arroz, maíz y canola. La soja es un cultivo de preferencia para la transformación de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, esta invención se puede utilizar en múltiples de otros cultivos de monocotiledóneas (tales como céspedes de pastura o césped) y dicotiledóneas como alfalfa, trébol, especies de árboles y *otros*. De modo similar, 2,4-D (u otros sustratos de AAD-12) se pueden usar en forma más positiva en

cultivos de césped con tolerancia moderada, y el aumento de tolerancia por medio de este rasgo podría proporcionar a los agricultores la oportunidad de usar estos herbicidas con proporciones más eficaces y por períodos de aplicación más amplios sin el riesgo de daño al cultivo.

Más aún, la presente invención provee un único gen que puede proporcionar resistencia a herbicidas que controlan la maleza de hojas anchas. Este gen se puede utilizar en cultivos múltiples para permitir el uso de una combinación herbicida de amplio espectro. La presente invención también puede controlar malezas resistentes a productos químicos actuales, y contribuye al control de espectros de cambios de espectros de malezas que resultan de las prácticas agronómicas actuales. El AAD-12 objeto también se puede usar en esfuerzos para destoxificar de modo efectivo sustratos herbicidas adicionales a formas no herbicidas. En consecuencia, la presente invención provee el desarrollo de tecnología de rasgos de HTC adicionales y/o marcador seleccionable.

Por separado, o además de, usar los genes objeto para producir HTC's, los genes objeto también se pueden usar como marcadores seleccionables para seleccionar de modo exitoso transformantes en cultivos celulares, invernaderos, y en el campo. Hay gran valor inherente para los genes objeto simplemente como marcador seleccionable para proyectos de biotecnología. La promiscuidad de AAD-12 para otros herbicidas auxínicos de ariloxialcanoato provee muchas oportunidades para utilizar este gen para propósitos de HTC y/o marcador seleccionable.

Proteínas (y aislados de fuentes) de la presente invención. La presente invención provee proteínas funcionales. Por "actividad funcional" (o "activa") se entiende en la presente que las proteínas/enzimas a usar de acuerdo con la presente invención tienen la capacidad para degradar o disminuir la actividad de un herbicida (solo o en combinación con otras proteínas). Las plantas productoras

de proteínas de la presente invención de preferencia producirán "una cantidad efectiva" de la proteína de modo que cuando la planta se trata con un herbicida, el nivel de expresión de proteína es suficiente para transformar a la planta en completamente o parcialmente resistente o tolerante al herbicida (en una proporción general, a menos que se especifique de otro modo; las proporciones de aplicación típicas se pueden hallar en el muy conocido *Herbicide Handbook* (Weed Science Society of America, Octava Edición, 2002), por ejemplo). El herbicida se puede aplicar en proporciones que normalmente matarían la planta blanco, en proporciones y concentraciones normales de uso en campo. (Debido a la presente invención, el nivel y/o concentración opcionalmente pueden ser superiores a los previamente usados). De preferencia, las células vegetales y plantas de la presente invención están protegidas contra la inhibición del crecimiento o el daño causado por el tratamiento con herbicidas. Las plantas y células vegetales transformadas de la presente invención de preferencia se transforman en resistentes o tolerantes a un herbicida, tal como se analiza en la presente, lo cual significa que la planta y las células vegetales transformadas pueden crecer en presencia de cantidades efectivas de uno o más herbicidas tal como se analiza en la presente. Las proteínas preferidas de la presente invención tienen actividad catalítica para metabolizar uno o más compuestos de ariloxialcanoato.

Uno no puede plantear con facilidad el término "resistencia" y no utilizar el verbo "tolerar" o el adjetivo "tolerante". La industria ha pasado innumerables horas debatiendo sobre Cultivos Tolerantes a Herbicidas (HTC) frente a Cultivos Resistentes a Herbicidas (HRC). En la industria es de preferencia el término HTC. Sin embargo, la definición oficial de resistencia de la Weed Science Society of America es "la capacidad heredada de una planta para sobrevivir y reproducirse luego de la exposición a una dosis de herbicida normalmente letal para el tipo

salvaje. En una planta, la resistencia puede ocurrir naturalmente o ser inducida por técnicas tales como la ingeniería genética o la selección de variantes producidas por la mutagénesis o cultivo celular". Según se utiliza en la presente a menos que se indique de otro modo, la "resistencia" a herbicidas es heredable y le permite a una planta crecer y reproducirse en presencia de un tratamiento típico efectivo desde el punto de vista herbicida con un herbicida para una planta determinada, según sugiere la actual edición de *The Herbicide Handbook* a partir de la presentación de la presente descripción. Según reconocen aquéllos expertos en la técnica, una planta aún puede considerarse "resistente" aún cuando sea evidente cierto grado de daño a la planta a partir la exposición a herbicidas. Según se utiliza en la presente, el término "tolerancia" es más amplio que el término "resistencia", e incluye la "resistencia" según se define en la presente, además de una mejorada capacidad de una planta particular para soportar los diversos grados de daños inducidos por herbicidas que generalmente resultarán en plantas de tipo salvaje del mismo genotipo en la misma dosis de herbicida.

La transferencia de la actividad funcional a sistemas vegetales o bacterianos puede implicar una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica la secuencia de aminoácidos para una proteína de la presente invención, integrada dentro de un vector de expresión de proteínas apropiado para el huésped en el que residirá el vector. Una forma de obtener una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína con actividad funcional consiste en aislar el material genético nativo de las especies bacterianas que producen la proteína de interés, utilizando la información deducida de la secuencia de aminoácidos de la proteína, tal como se describe en la presente. Las secuencias nativas pueden ser optimizadas para la expresión en plantas, por ejemplo, tal como se analiza con

mayor detalle a continuación. Un polinucleótido optimizado también se puede diseñar en base a la secuencia de proteínas.

La presente invención provee clases de proteínas con nuevas actividades como las identificadas en la presente. Una forma de caracterizar estas clases de proteínas y los polinucleótidos que las codifican consiste en definir un polinucleótido por su capacidad para hibridarse, bajo un rango de condiciones especificadas, con una secuencia de nucleótidos ejemplificada (el complemento de la misma y/o una sonda o sondas derivadas de cada una de las cadenas) y/o por su capacidad para ser amplificado mediante PCR utilizando cebadores derivados de las secuencias ejemplificadas.

Existen numerosos métodos para obtener proteínas para usar de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos para las proteínas descritas en la presente se pueden usar para identificar y aislar otras proteínas de una mezcla de proteínas. Específicamente, se pueden generar anticuerpos para las porciones de las proteínas más conservadas o más diferenciadas, en comparación con otras proteínas relacionadas. Estos anticuerpos luego se pueden usar para identificar específicamente proteínas equivalentes con la actividad característica mediante inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), o inmunotransferencia. Los anticuerpos para las proteínas descritas en la presente, o para proteínas equivalentes, o para fragmentos de estas proteínas, se pueden preparar con facilidad utilizando procedimientos estándar. Dichos anticuerpos constituyen un aspecto de la presente invención. Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, de preferencia producidos en respuesta a una proteína ejemplificada o sugerida.

Un experto en la técnica reconocerá con facilidad que las proteínas (y los genes) de la presente invención se pueden obtener de diversas fuentes. Dado

que se sabe que la totalidad de los operones de degradación de herbicidas son conocidos por estar codificados en elementos transposables tales como plásmidos, además de estar integrados genómicamente, las proteínas de la presente invención se pueden obtener de una amplia variedad de microorganismos, por ejemplo, incluso bacterias recombinantes y/o de tipo salvaje.

Se pueden elaborar mutantes de aislados bacterianos mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener mutantes esporógenos mediante mutagénesis por etilmetan sulfonato (EMS) de un aislado. Las cepas mutantes también se pueden elaborar utilizando luz ultravioleta y nitrosoguanidina mediante procedimientos muy conocidos en la técnica.

Una proteína "de" u "obtenible de" cualquiera de los aislados objeto a que se hace referencia o sugeridos en la presente significa que la proteína (o una proteína similar) se puede obtener del aislado o de alguna otra fuente, por ejemplo otra cepa bacteriana o una planta. "Derivado de" también tiene esta connotación, e incluye proteínas que se obtienen de determinado tipo de bacteria modificada para la expresión en una planta, por ejemplo. Un experto en la técnica reconocerá con rapidez que, debido a la descripción de un gen y una proteína bacteriana, se puede someter una planta a ingeniería para producir la proteína. Las preparaciones de anticuerpo, sondas de ácidos nucleicos (ADN, ARN, o APN, por ejemplo), y similares se pueden preparar utilizando las secuencias de aminoácidos y/o polinucleótidos descriptas en la presente y usadas para analizar y recuperar otros genes relacionados de otras fuentes (naturales).

Se pueden usar las técnicas estándar de biología molecular para clonar y secuenciar las proteínas y los genes descriptos en la presente. Se puede hallar

información adicional en Sambrook *et al.*, 1989, que se incorpora en la presente como referencia.

Polinucleótidos y sondas. La presente invención también provee secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas para su uso de acuerdo con la presente invención. La presente invención también provee métodos para identificar y caracterizar genes que codifican proteínas que poseen la actividad herbicida deseada. En una realización, la presente invención provee secuencias de nucleótidos únicas de utilidad como cebadores y/o sondas de hibridación para técnicas de PCR. Los cebadores producen fragmentos génicos característicos que se pueden usar en la identificación, la caracterización, y/o el aislamiento de genes específicos de interés. La secuencia de nucleótidos de la presente invención codifica proteínas diferentes de las proteínas previamente descritas.

Los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para formar "genes" completos para codificar proteínas o péptidos en una célula hospedante deseada. Por ejemplo, como reconocerá fácilmente el experto en la técnica, los polinucleótidos objeto se pueden colocar adecuadamente bajo el control de un promotor en un hospedante de interés, como se conoce fácilmente en la técnica. El nivel de expresión génica y la expresión temporal/de tejido específica pueden generar un gran impacto sobre la utilidad de la invención. En general, los mayores niveles de expresión proteica de un gen de degradación dan por resultado una más rápida y más completa degradación de un sustrato (en este caso un herbicida blanco). Son convenientes los promotores que expresen el gen blanco en niveles altos a menos que la expresión elevada tenga como consecuencia un impacto negativo sobre la salud de la planta. Generalmente, se desearía tener el gen *AAD-12* expresado de modo constitutivo en todos los tejidos para la completa protección de la planta en todas las etapas del crecimiento. Sin embargo, se podría usar alternativamente un gen de resistencia expresado de modo

vegetativo; esto permitiría usar el herbicida blanco en cultivo para el control de malezas y posteriormente controlaría la reproducción sexual del cultivo blanco mediante la aplicación durante la etapa de floración. Además, los niveles y tiempos de expresión deseados también pueden depender del tipo de planta y del nivel de tolerancia deseado. Algunas realizaciones preferidas usan promotores constitutivos fuertes combinados con mejoradores de la transcripción y similares para incrementar los niveles de expresión y para mejorar la tolerancia hasta los niveles deseados. Algunas de dichas aplicaciones se plantean en más detalle a continuación, antes de la sección de Ejemplos.

Tal como sabe el experto en la técnica, generalmente el ADN existe en forma bicatenaria. En esta disposición, una cadena es complementaria de la otra y viceversa. Cuando el ADN se replica en una planta (por ejemplo), se producen cadenas complementarias adicionales de ADN. La "cadena codificadora" a menudo se usa en la técnica para referirse a la cadena que se une a la cadena antisentido. El ARNm se transcribe a partir de la cadena "antisentido" del ADN. La cadena "con sentido" o "codificadora" posee una serie de codones (un codón son tres nucleótidos que se pueden leer como una unidad de tres residuos para especificar un aminoácido particular) que se puede leer como un marco de lectura abierto (ORF) para formar una proteína o péptido de interés. A fin de producir una proteína *in vivo*, una cadena de ADN generalmente se transcribe en una cadena complementaria de ARNm que se usa como plantilla para la proteína. En consecuencia, la presente invención incluye el uso de los polinucleótidos ejemplificados que se muestran en los listados de secuencias y/o equivalentes adjuntos, incluyendo las cadenas complementarias. El ARN y APN (ácidos nucleicos peptídicos) que son funcionalmente equivalentes a las moléculas de ADN ejemplificadas se incluyen en la presente invención.

En una realización de la presente invención, se pueden cultivar aislados bacterianos en condiciones que den por resultado una gran multiplicación del microbio. Después de tratar el microbio para proporcionar ácido nucleico genómico monocatenario, se puede poner en contacto al ADN con los cebadores de la invención y someterlo a amplificación mediante PCR. Los fragmentos característicos de los genes de interés se amplificarán a través del procedimiento, identificando de este modo la presencia del(os) gene(s) de interés.

Otros aspectos de la presente invención incluyen genes y aislados identificados utilizando los métodos y las secuencias de nucleótidos descritos en la presente. Los genes así identificados pueden codificar las proteínas de resistencia herbicida de la presente invención.

Las proteínas y genes para usar de acuerdo con la presente invención se pueden identificar y obtener utilizando sondas de oligonucleótidos, por ejemplo. Estas sondas son secuencias de nucleótidos detectables que se pueden detectar en virtud de una marca adecuada o se pueden poner inherentemente fluorescentes tal como se describe en la Solicitud Internacional No. WO 93/16094. Las sondas (y los polinucleótidos de la presente invención) pueden ser ADN, ARN, o APN. Además de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), y uracilo (U; para las moléculas de ARN), las sondas (y los polinucleótidos) sintéticos de la presente invención también pueden tener inosina (una base neutra capaz de aparearse con todas las cuatro bases; en ocasiones usada en lugar de una mezcla de todas las cuatro bases en sondas sintéticas) y/u otras bases sintéticas (no naturales). En consecuencia, cuando en la presente se hace referencia a un oligonucleótido sintético, degenerado, y "N" o "n" se usan en forma genérica, "N" o "n" pueden ser G, A, T, C, o inosina. Los códigos de ambigüedad usados en la presente están de acuerdo con las convenciones de denominación

estándar de IUPAC respecto de la presentación de la solicitud objeto (por ejemplo, R significa A o G, Y significa C o T, etc.).

Como es bien sabido en la técnica, si una molécula sonda se hibrida con una muestra de ácidos nucleicos, se puede presuponer razonablemente que la sonda y la muestra tienen sustancial homología/similitud/identidad. De preferencia, la hibridación del polinucleótido se realiza primero seguida de lavados en condiciones de rigurosidad leve, moderada o alta mediante métodos muy conocidos en la técnica, tal como se describe, por ejemplo, en Keller, G.H., M.M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, Nueva York, NY, págs. 169-170. Por ejemplo, tal como se establece la presente, se pueden lograr condiciones de baja rigurosidad primero con lavados de 2x SSC (Citrato Salino Estándar)/0,1% SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Generalmente se realizan dos lavados. Luego se puede lograr mayor rigurosidad al reducir la concentración salina y/o elevar la temperatura. Por ejemplo, el lavado antes descripto puede ser seguido de dos lavados con 0,1x SSC/0,1% SDS durante 15 minutos cada uno a temperatura ambiente seguido de posteriores lavados con 0,1x SSC/0,1% SDS durante 30 minutos cada uno a 55°C. Estas temperaturas se pueden usar con otros protocolos de hibridación y lavado establecidos en la presente y según conoce bien un experto en la técnica (se puede usar SSPE como sal en lugar de SSC, por ejemplo). Se puede preparar 2x SSC/0,1% SDS agregando 50 ml de 20x SSC y 5 ml de 10% SDS a 445 ml de agua. Se puede preparar 20x SSC combinando NaCl (175,3 g/0,150 M), citrato de sodio (88,2 g/0,015 M), y agua, regulando el pH hasta 7,0 con NaOH 10 N, luego regulando el volumen hasta 1 litro. Se puede preparar 10% SDS disolviendo 10 g de SDS en 50 ml de agua autoclavada, y luego diluyendo hasta 100 ml.

La detección de la sonda provee un medio para determinar de forma conocida si se ha mantenido la hibridación. Dicho análisis de sonda provee un

método rápido para identificar genes de la presente invención. Los segmentos de nucleótidos usados como sondas de acuerdo con la invención se pueden sintetizar con un sintetizador de ADN y procedimientos estándar. Estas secuencias de nucleótidos también se pueden usar como cebadores de PCR para amplificar los genes de la presente invención.

Las características de hibridación de una molécula se pueden usar para definir los polinucleótidos de la presente invención. En consecuencia la presente invención incluye polinucleótidos (y/o sus complementos, de preferencia sus complementos completos) que se hibridan con un polinucleótido ejemplificado en la presente. Es decir, una forma de definir un gen (y la proteína que codifica), por ejemplo, es por su capacidad para hibridarse (en cualquiera de las condiciones específicamente descritas en la presente) con un gen conocido o específicamente ejemplificado.

Tal como se usa en la presente, condiciones "rigurosas" de hibridación se refiere a condiciones que alcanzan el mismo, o casi el mismo, grado de especificidad de hibridación que las condiciones empleadas por los actuales solicitantes. Específicamente, la hibridación de ADN inmovilizado en Southern blots con sondas de gen específico con marca ^{32}P se pueden realizar a través de métodos estándar (*ver, por ejemplo, Maniatis et al. 1982*). En general, la hibridación y los lavados posteriores se pueden realizar en condiciones que permiten la detección de secuencias blanco. Para sondas de genes de ADN bicatenarias, se puede realizar la hibridación durante 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% SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturalizado. La temperatura de fusión se describe mediante la siguiente fórmula (*Beltz et al. 1983*):

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

Los lavados generalmente se pueden realizar como sigue:

- (1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en 1x SSPE, 0,1% 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 moderada rigurosidad).

Para las sondas de oligonucleótidos, se puede realizar la hibridación durante la noche a $10-20^{\circ}\text{C}$ por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido en 6x SSPE, 5x solución de Denhardt, 0,1% SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturalizado. El T_m para las sondas de oligonucleótidos se puede determinar a través de la siguiente fórmula:

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

Los lavados generalmente pueden ser como sigue:

- (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% SDS (lavado de moderada rigurosidad).

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

Baja	1 o 2 x SSPE, temperatura ambiente
Baja:	1 o 2 x SSPE, 42°C
Moderada:	0,2x o 1x SSPE, 65°C
Alta:	0,1x SSPE, 65°C .

La formación de dobletes y la estabilidad dependen de la sustancial complementariedad entre las dos cadenas de un híbrido, y, como se observó antes, se puede tolerar un cierto grado de apareamientos incorrectos. En consecuencia, las secuencias de sondas de la presente invención incluyen mutaciones (simples y múltiples), deleciones, inserciones de las secuencias descritas, y las combinaciones de las mismas, en donde dichas mutaciones, inserciones y deleciones permiten la formación de híbridos estables con el polinucleótido blanco de interés. Las mutaciones, inserciones, y deleciones se pueden producir en una secuencia de polinucleótidos determinada de muchas formas, y estos métodos son conocidos por un experto en la técnica. Otros métodos pueden conocerse en el futuro.

Tecnología PCR. La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) es una síntesis repetida, enzimática, cebada de una secuencia de ácidos nucleicos. Este procedimiento es muy conocido y de uso común por los expertos en la técnica (véase Mullis, Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.683.195, 4.683.202, y 4.800.159; Saiki *et al.*, 1985). PCR se basa en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN de interés flanqueado por dos cebadores de oligonucleótidos que se hibridan a cadenas opuestas de la secuencia blanco. Los cebadores de preferencia están orientados con los extremos 3' apuntados entre sí. Los ciclos repetidos de desnaturalización por calor de la plantilla, la unión de los cebadores a sus secuencias complementarias, y la extensión de los cebadores unidos con una polimerasa de ADN da como resultado la amplificación del segmento definido por los extremos 5' de los cebadores PCR. El producto de extensión de cada cebador puede servir como plantilla para el otro cebador, por lo que cada ciclo esencialmente duplica la cantidad de fragmentos de ADN producidos en el ciclo previo. Esto da por resultado la acumulación exponencial del fragmento blanco específico, hasta varios millones de veces en pocas horas. Al usar una polimerasa

de ADN termoestable tal como la *Taq* polimerasa, aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, el proceso de amplificación se puede automatizar por completo. Otras enzimas que se pueden usar son conocidas por aquéllos expertos en la técnica.

Las secuencias de ADN ejemplificadas, o los segmentos de las mismas, se pueden usar como cebadores para la amplificación de PCR. Al realizar la amplificación de PCR, se puede tolerar un cierto grado de apareamientos incorrectos entre el cebador y la plantilla. En consecuencia, las mutaciones, deleciones, e inserciones (especialmente las adiciones de nucleótidos en el extremo 5') de los cebadores ejemplificados caen dentro del alcance de la presente invención. Las mutaciones, inserciones, y deleciones se pueden producir en determinado cebador a través de métodos conocidos por un experto en la técnica.

Modificación de genes y proteínas. Los genes y proteínas objeto se pueden fusionar a otros genes y proteínas para producir proteínas quiméricas o de fusión. Los genes y proteínas de utilidad de acuerdo con la presente invención incluyen no sólo las secuencias de longitud completa específicamente ejemplificadas, sino también porciones, segmentos y/o fragmentos (incluso fragmentos contiguos y deleciones internas y/o terminales comparadas 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 siempre que retengan la actividad funcional deseada. Los genes "variantes" tienen secuencias de nucleótidos que codifican las mismas proteínas o proteínas equivalentes con actividad equivalente o similar a una proteína ejemplificada.

Los dos resultados máximos de las búsquedas BLAST con la secuencia de nucleótidos aad-12 nativa muestran un nivel de homología razonable

(aproximadamente 85%) sobre 120 pares de bases de secuencia. Se podría esperar que la hibridación bajo ciertas condiciones incluya estas dos secuencias. Véase Nos. De Acceso de GENBANK DQ406818.1 (89329742; *Rhodoferrax*) y AJ6288601.1 (44903451; *Sphingomonas*). *Rhodoferrax* es muy similar a *Delftia* pero *Sphingomonas* es una Clase completamente diferente desde el punto de vista filogenético.

Los términos “proteínas variantes” y “proteínas equivalentes” se refieren a proteínas que poseen la misma o esencialmente la misma actividad biológica/funcional frente a los sustratos blanco y las secuencias equivalentes que las proteínas ejemplificadas. Tal como se usa en la presente, la referencia a una secuencia “equivalente” se refiere a secuencias que poseen sustituciones, deleciones, adiciones, o inserciones de aminoácidos que mejoran o no afectan de modo adverso la actividad en grado significativo. Los fragmentos que mantienen actividad también se incluyen en esta definición. Los fragmentos y otros equivalentes que mantienen la misma función o actividad o una similar como un fragmento correspondiente de una proteína ejemplificada se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los cambios, tales como las sustituciones o adiciones de aminoácidos, se pueden efectuar con diversos propósitos, por ejemplo aumentar (o disminuir) la estabilidad de proteasa de la proteína (sin reducir materialmente/sustancialmente la actividad funcional de la proteína), eliminar o agregar un sitio de restricción, y similares. Las variaciones de genes se pueden construir con facilidad utilizando técnicas estándar para realizar mutaciones puntuales, por ejemplo.

Además, la Patente de los Estados Unidos No. 5.605.793, por ejemplo, describe métodos para generar diversidad molecular adicional utilizando reorganización del ADN tras fragmentación aleatoria o dirigida. Esto se denomina “barajado” de genes, el cual generalmente incluye 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 partida. El resultado es una proteína quimérica que posee actividad mejorada, especificidad de sustrato alterada, aumento de estabilidad enzimática, estereoespecificidad alterada, y otras características.

El "barajado" se puede diseñar y dirigir después de obtener y examinar las coordenadas atómicas 3D (tridimensionales) y la estructura cristalina de una proteína de interés. En consecuencia, el "barajado focalizado" se puede dirigir a ciertos segmentos de una proteína que son ideales para la modificación, por ejemplo segmentos expuestos a la superficie, y de preferencia no segmentos internos que intervienen en el plegamiento de la proteína y son esenciales para la integridad de la estructura 3D.

Se pueden efectuar cambios específicos al "sitio activo" de la enzima para afectar la funcionalidad inherente con respecto a la actividad o estereoespecificidad (véase el alineamiento de la **Figura 2**). Muller *et al.* (2006). La conocida estructura cristalina tauD se utilizó como dioxigenasa modelo para determinar residuos de sitios activos mientras se encontraba unida a su sustrato inherente taurina. Elkins *et al.* (2002) "X-ray crystal structure of *Escherichia coli* taurine/alpha-ketoglutarate dioxxygenase complexed to ferrous iron and substrates", *Biochemistry* 41(16):5185-5192. En lo que respecta a la optimización de secuencias y a la designabilidad de sitios activos enzimáticos, véase Chakrabarti *et al.*, PNAS, (23 de agosto de 2005), 102(34):12035-12040.

Los genes variantes se pueden usar para producir proteínas variantes; los hospedantes recombinantes se pueden usar para producir las proteínas variantes. Utilizando estas técnicas de "barajado de genes", se pueden construir genes y proteínas equivalentes que comprenden cualquiera 5, 10, o 20 residuos (aminoácidos o nucleótidos) contiguos de cualquier secuencia ejemplificada en la

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

Los fragmentos de genes de longitud completa se pueden elaborar utilizando exonucleasas o endonucleasas disponibles en el comercio de acuerdo con procedimientos estándar. Por ejemplo, las enzimas tales como *Ba*/31 o la

mutagénesis dirigida a un sitio se pueden usar para cortar sistemáticamente los nucleótidos desde los extremos de estos genes. Además, los genes que codifican fragmentos activos se pueden obtener utilizando una variedad de enzimas de restricción. Las proteasas se pueden usar para obtener directamente fragmentos activos de estas proteínas.

Se encuentra dentro del alcance de la invención tal como se describe en la presente que las proteínas se puedan truncar y aún mantener la actividad funcional. Por "proteína truncada" se entiende que se puede eliminar por escisión una porción de una proteína mientras la proteína truncada restante mantiene y presenta la actividad deseada después de la escisión. Se puede lograr la escisión mediante diversas proteasas. Además, se pueden producir proteínas con escisión efectiva utilizando tecnologías de biología molecular en donde las bases de ADN que codifican dicha proteína se eliminan ya sea por digestión con endonucleasas de restricción u otras técnicas disponibles para el experto en la técnica. Después de la truncación, dichas proteínas se pueden expresar en sistemas heterólogos tales como *E. coli*, baculovirus, sistemas virales de base vegetal, levaduras y similares y luego colocarse en ensayos con insectos tal como se describe en la presente para determinar la actividad. Es muy conocido en la técnica que se pueden producir con éxito proteínas truncadas de manera tal que ellas mantengan la actividad funcional a la vez que tengan menos que la secuencia entera, de longitud completa. Por ejemplo, se pueden usar las proteínas *B.t.* en forma truncada (proteína nuclear) (ver, por ejemplo, Höfte *et al.* (1989), y Adang *et al.* (1985)). Tal como se usa en la presente, el término "proteína" puede incluir truncaciones funcionalmente activas.

En algunos casos, especialmente para la expresión en plantas, puede ser ventajoso usar genes truncados que expresan proteínas truncadas. Los genes truncados de preferencia generalmente codificarán 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 se han ejemplificado específicamente en la presente. Dado que estas proteínas son meramente ejemplificativas de las proteínas de la presente invención, debería ser fácilmente evidente que la presente invención comprende proteínas variantes o equivalentes (y secuencias de nucleótidos que codifican las equivalentes de las mismas) que poseen una actividad igual o similar de las proteínas ejemplificadas. Las proteínas equivalentes tendrán similitud (y/u homología) de aminoácidos con una proteína ejemplificada. La identidad de aminoácidos generalmente será de al menos 60%, de preferencia de al menos 75%, con mayor preferencia de al menos 80%, aún con mayor preferencia de al menos 90%, y puede ser de al menos 95%. Las proteínas de preferencia de la presente invención también se pueden definir en términos de rangos de identidad y/o similitud más particulares. Por ejemplo, la identidad y/o similitud pueden ser de 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% comparada con una secuencia ejemplificada o sugerida en la presente. Se puede usar cualquier número antes enumerado para definir los límites superior e inferior.

A menos que se especifique de otro modo, tal como se usa en la presente, el porcentaje de identidad y/o similitud de secuencia de dos ácidos nucleicos se determina utilizando el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, modificado como en Karlin y Altschul 1993. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990. Se realizan búsquedas de nucleótidos por BLAST con el programa NBLAST, puntaje = 100, longitud de palabra = 12. Se puede usar Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.*, 1997. Cuando

se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros por defecto de los respectivos programas (NBLAST y XBLAST). Véase el sitio web NCBI/NIH. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, se usó la función AlignX de Vector NTI Suite 8 (InforMax, Inc., North Bethesda, MD, EE.UU.) que emplea parámetros por defecto. Éstos eran: una penalización por apertura de hueco de 15, una penalización por extensión de hueco de 6,66, y un rango de penalización por separación de hueco de 8.

También se pueden cambiar diversas propiedades y características tridimensionales de la proteína sin afectar de modo adverso la actividad/funcionalidad de la proteína. Se pueden tolerar/lograr sustituciones conservadoras de aminoácidos que no afecten de modo adverso la actividad y/o la configuración tridimensional de la molécula. Los aminoácidos se pueden colocar en las siguientes clases: no polar, polar no cargado, básico, y ácido. Las sustituciones conservadoras a través de las cuales un aminoácido de una clase es reemplazado por otro aminoácido del mismo tipo caen dentro el alcance de la presente invención siempre que la sustitución no sea adversa para la actividad biológica del compuesto. La **Tabla 2** provee un listado de ejemplos de aminoácidos pertenecientes a cada clase.

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

En algunos casos, también se pueden efectuar sustituciones no conservadoras. Sin embargo, las sustituciones de preferencia no le quitan mérito de modo significativo a la actividad funcional/biológica de la proteína.

Tal como se usa en la presente, la referencia a polinucleótidos "aislados" y/o proteínas "purificadas" se refiere a estas moléculas cuando ellas no se encuentran asociadas con las otras moléculas con las cuales ellas se encontrarían en la naturaleza. En consecuencia, la referencia a "aislado" y/o "purificado" significa la intervención de la "mano del hombre" tal como se describe en la presente. Por ejemplo, un "gen" bacteriano de la presente invención colocado dentro de una planta para su expresión es un "polinucleótido aislado". De modo similar, 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 secuencias de ADN diferentes pueden codificar las secuencias de aminoácidos descritas en la presente. Pertenece a la pericia de un experto en la técnica crear secuencias de ADN alternativas que codifiquen las mismas, o esencialmente las mismas, proteínas. Estas secuencias de ADN variantes forman parte del alcance de la presente invención. Esto también se analiza con más detalle a continuación en la sección titulada "Optimización de secuencias para la expresión en plantas".

Optimización de secuencias para la expresión en plantas. Para obtener una elevada expresión de genes heterólogos en plantas generalmente se prefiere someter a reingeniería a los genes para que se expresen en forma más eficiente en (el citoplasma de) las células vegetales. El maíz es una de estas plantas en las que se puede preferir rediseñar el(os) gen(es) heterólogo(s) antes de la transformación para aumentar el nivel de expresión de los mismos en dicha planta. En consecuencia, una etapa adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana consiste en la reingeniería de un gen heterólogo para su

óptima expresión, utilizando una preferencia codónica más estrechamente alineados con la secuencia de plantas blanco, sea en especies de dicotiledóneas o monocotiledóneas. Las secuencias también pueden ser optimizadas para su expresión en cualquiera de los tipos más particulares de plantas analizados en otra parte en la presente.

Hospedantes transgénicos. Los genes que codifican proteínas de la presente invención se pueden introducir dentro de una amplia variedad de hospedantes microbianos o vegetales. La presente invención incluye células de plantas transgénicas y plantas transgénicas. Las plantas (y las células de plantas) preferidas son maíz, *Arabidopsis*, tabaco, soja, algodón, canola, arroz, trigo, césped, forrajes de leguminosas (por ejemplo, alfalfa y trébol), pastos forrajeros, y similares. También se pueden elaborar otros tipos de plantas transgénicas de acuerdo con la presente invención, por ejemplo frutas, vegetales, plantas ornamentales, y árboles. Más generalmente, se pueden usar dicotiledóneas y/o monocotiledóneas en diversos aspectos de la presente invención.

En realizaciones preferidas, la expresión del gen da por resultado, en forma directa o indirecta, la producción (y el mantenimiento) intracelular de la(s) proteína(s) de interés. Las plantas se pueden transformar en resistentes a herbicidas de esta manera. Se puede hacer referencia a dichos hospedantes como hospedantes y/o células transgénicos, recombinantes, transformados, y/o transfectados. En algunos aspectos de esta invención (cuando se clona y prepara el gen de interés, por ejemplo), se pueden producir células microbianas (de preferencia bacterianas) y usarlas de acuerdo con técnicas estándar, con el beneficio de la descripción objeto.

Las células de plantas transfectadas con un polinucleótido de la presente invención se pueden regenerar en plantas enteras. La presente invención incluye cultivos celulares que incluyen cultivos celulares de tejidos, cultivos líquidos, y

cultivos en placas. Las semillas producidas y/o usadas para generar plantas de la presente invención también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Otros tejidos y parte de plantas también se incluyen en la presente invención. De modo similar la presente invención incluye métodos para producir plantas o células que comprenden un polinucleótido de la presente invención. Un método preferido para producir dichas plantas es por siembra de una semilla de la presente invención.

Aunque pueden preferirse las plantas, la presente invención también incluye la producción de AAD-12 recombinante altamente activa en una cepa hospedante de *Pseudomonas fluorescens* (Pf), por ejemplo. La presente invención incluye temperaturas de crecimiento preferidas para mantener AAD-12 activa soluble en este hospedante; una condición de fermentación donde AAD-12 se produce en más del 40% de la proteína celular total, o al menos 10 g/L; un proceso de purificación que resulta en la alta recuperación de AAD-12 recombinante activa de un hospedante Pf; un esquema de purificación que produce al menos 10 g de AAD-12 activa por kg de células; un esquema de purificación que puede producir 20 g de AAD-12 activa por kg de células; un proceso de formulación que puede almacenar y restablecer la actividad de AAD-12 en solución; y un proceso de liofilización que puede mantener la actividad de AAD-12 durante la vida útil y el almacenamiento a largo plazo.

Inserción de genes para formar hospedantes transgénicos. Un aspecto de la presente invención consiste en la transformación/transfección de plantas, células de plantas y otras células hospedantes con polinucleótidos de la presente invención que expresan proteínas de la presente invención. Las plantas transformadas de esta manera se pueden transformar en resistentes a una variedad de herbicidas con diferentes modos de acción.

Se dispone de una amplia variedad de métodos para introducir un gen que codifica una proteína deseada dentro del hospedante blanco bajo condiciones que permiten el mantenimiento y la expresión del gene estables. Estos métodos son muy conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5.135.867.

Los vectores que comprenden un polinucleótido AAD-12 se incluyen en el alcance de la presente invención. Por ejemplo, se dispone de una gran cantidad de vectores de clonación que comprenden un sistema de replicación en *E. coli* y un marcador que permite la selección de las células transformadas para la preparación para la inserción de genes extraños dentro de plantas superiores. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, series pUC, series M13mp, pACYC184, etc. En consecuencia, la secuencia que codifica la proteína se puede insertar dentro del vector en un sitio de restricción adecuado. El plásmido resultante se usa para la transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutriente adecuado, luego se cosechan y se lisan. El plásmido se recupera mediante purificación por separación del ADN genómico. El análisis de secuencia, el análisis de restricción, la electroforesis, y otros métodos bioquímicos de biología molecular generalmente se realizan como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN usada puede ser digerida por restricción y unida a la siguiente secuencia de ADN. Cada secuencia de plásmidos se puede clonar en el mismo plásmido o en otros. Dependiendo del método para insertar genes deseados en la planta, pueden ser necesarias otras secuencias de ADN. Si, por ejemplo, se usa el plásmido Ti o Ri para la transformación de la célula de la planta, luego al menos el borde derecho, pero a menudo el borde derecho y el izquierdo del ADN-T del plásmido Ti o Ri, se deben unir como la región flanqueante de los genes a insertarse. El uso de ADN-T para

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

Se dispone de gran cantidad de técnicas para insertar ADN en una célula hospedante vegetal. Esas técnicas incluyen la transformación con ADN-T utilizando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformación, fusión, inyección, biolística (bombardeo de micropartículas), barbas de carburo de silicio, radiación de aerosol, PEG, o electroporación además de otros métodos posibles. Si se usan *Agrobacterias para la* transformación, el ADN a ser insertado se debe clonar dentro de plásmidos especiales, a saber o bien dentro de un vector intermediario o bien dentro de un vector binario. Los vectores intermediarios se pueden integrar dentro del plásmido Ti o Ri mediante 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 intermediarios no se pueden por sí mismos replicar en *Agrobacterias*. El vector intermediario se puede transferir a *Agrobacterium tumefaciens* mediante un plásmido auxiliar (conjugación). Los vectores binarios se pueden replicar por sí mismos en *E. coli* y en *Agrobacterias*. Ellos comprenden un gen marcador de selección y un ligador o poliligador los cuales están enmarcados por las regiones de borde ADN-T derecha e izquierda. Se pueden transformar directamente en *Agrobacterias* (Holsters, 1978). El *Agrobacterium* usado como célula hospedante comprende un plásmido que porta una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia del ADN-T hacia la célula vegetal. Puede contener ADN-T adicional. La bacteria así transformada se usa para la transformación de células vegetales. Los explantes vegetales se pueden cultivar de modo ventajoso con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para la transferencia del ADN hacia la célula vegetal. Luego se pueden regenerar plantas enteras a partir del material

vegetal infectado (por ejemplo, partes de hojas, segmentos de tallos, raíces, pero también protoplastos o células cultivadas en suspensión) en un medio adecuado, que puede contener antibióticos o biocidas para la selección. Las plantas así obtenidas luego se pueden examinar para determinar la presencia del ADN insertado. No hay requisitos especiales para los plásmidos en el caso de inyección y electroporación. Es posible usar plásmidos ordinarios, tales como, por ejemplo, derivados de pUC.

Las células transformadas crecen dentro de las plantas de la forma habitual. Ellas pueden formar células germinales y transmitir el(os) rasgo(s) transformado(s) a las plantas de la progenie. Dichas plantas se pueden cultivar de la manera normal y cruzar con plantas que tienen los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las correspondientes propiedades fenotípicas.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, los genes que codifican las proteínas bacterianas se expresan a partir de unidades transcripcionales insertadas dentro del genoma vegetal. De preferencia, dichas unidades transcripcionales son vectores recombinantes capaces de formar integración estable dentro del genoma vegetal y permiten la selección de líneas vegetales transformadas que expresan ARNm que codifica las proteínas.

Una vez que el ADN insertado se ha integrado en el genoma, es relativamente estable allí (y no vuelve a salir). Normalmente contiene un marcador de selección que confiere a las células vegetales transformadas resistencia a un biocida o a un antibiótico, por ejemplo kanamicina, G418, bleomicina, higromicina, o cloranfenicol, *entre otros*. Los marcadores seleccionables vegetales generalmente también pueden proveer resistencia a diversos herbicidas tales como glufosinato (*por ejemplo, PAT/bar*), glifosato (*EPSPS*), inhibidores de ALS (*por ejemplo, imidazolinona, sulfonilurea, triazolopirimidin sulfoanilida, y otros*),

bromoxinilo, resistencia a inhibidores de HPPD, inhibidores de PPO, inhibidores de ACC-ase, y muchos otros. El marcador individual empleado debería en consecuencia permitir la selección de las células transformadas en lugar de las células que no contienen el ADN insertado. El(os) gen(es) de interés de preferencia se expresan ya sea mediante promotores constitutivos o inducibles en la célula vegetal. Una vez expresado, el ARNm se traduce en proteínas, por lo que se incorporan aminoácidos de interés en las proteínas. Los genes que codifican una proteína expresada en las células vegetales pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido, o un promotor inducible.

Existen diversas técnicas para introducir vectores recombinantes extraños en células vegetales, y para obtener plantas que mantienen y expresan en forma estable el gen introducido. Dichas técnicas incluyen la introducción de material genético recubierto sobre micropartículas directamente en las células (Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.945.050 a Cornell y 5.141.131 a DowElanco, ahora Dow AgroSciences, LLC). Además, las plantas se pueden transformar utilizando tecnología de *Agrobacterium*, véase las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.177.010 a University of Toledo; 5.104.310 a Texas A&M; la Solicitud de Patente Europea 0131624B1; las Solicitudes de Patentes Europeas 120516, 159418B1 y 176.112 a Schilperoot; las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.149.645, 5.469.976, 5.464.763 y 4.940.838 y 4.693.976 a Schilperoot; las Solicitudes de Patentes Europeas 116718, 290799, 320500, todas a Max Planck; las Solicitudes de Patentes Europeas 604662 y 627752, y la Patente de los Estados Unidos No. 5.591.616, a Japan Tabaco; las Solicitudes de Patentes Europeas 0267159 y 0292435, y la Patente de los Estados Unidos No. 5.231.019, todas a Ciba Geigy, ahora Syngenta; las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.463.174 y 4.762.785, ambas a Calgene; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.004.863 y

5.159.135, ambas a Agracetus. Otra tecnología de transformación incluye la tecnología de barbas. Véase las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.302.523 y 5.464.765, ambas a Zeneca, ahora Syngenta. Otra tecnología de transformación de suministro directo de ADN incluye la tecnología de rayo de aerosol. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 6.809.232. También se ha usado la tecnología de electroporación para transformar plantas. Véase WO 87/06614 a Boyce Thompson Institute; las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.472.869 y 5.384.253, ambas de Dekalb; y WO 92/09696 y WO 93/21335, ambos a Plant Genetic Systems. Además, también se pueden usar vectores virales 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 de los Estados Unidos No. 5.569.597 a Mycogen Plant Science y Ciba-Geigy (ahora Syngenta), además de las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.589.367 y 5.316.931, ambas a Biosource, ahora Large Scale Biology.

Tal como se mencionó previamente, la forma en la cual la construcción de ADN se introduce en la planta hospedante no es decisiva para la presente invención. Se puede utilizar cualquier método que provea la transformación eficiente. Por ejemplo, se describen diversos métodos para la transformación de células vegetales en la presente e incluyen el uso de plásmidos Ti o Ri y similares para realizar la transformación mediada por *Agrobacterium*. En muchos casos, será deseable tener la construcción usada para transformación rodeada en uno o ambos lados por bordes ADN-T, más específicamente el borde derecho. Esto es particularmente útil cuando la construcción usa *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como modo de transformación, aunque los bordes ADN-T se pueden usar con otros modos de transformación. Cuando se usa *Agrobacterium* para la transformación de células vegetales, se puede usar un

vector que se puede introducir en el hospedante para la recombinación homóloga con ADN-T o el plásmido Ti o Ri presente en el hospedante. La introducción del vector se puede llevar a cabo mediante electroporación, apareamiento triprogenitor y otras técnicas para transformar bacterias gram-negativas conocidas por los expertos en la técnica. La forma de transformación por vector en el hospedante *Agrobacterium* no es decisiva para esta presente invención. El plásmido Ti o Ri que contiene el ADN-T para la recombinación puede ser capaz o incapaz de causar la formación de bilis, y no es decisivo para dicha invención siempre que los genes vir estén presentes en dicho hospedante.

En algunos casos en los cuales se usa *Agrobacterium* para la transformación, la construcción de la expresión que se encuentra dentro de los bordes de ADN-T se insertará en el vector de amplio espectro tal como pRK2 o los derivados del mismo tal como se describe en Ditta *et al.* (1980) y EPO 0 120 515. Se incluirá en la construcción de expresión y el ADN-T uno o más marcadores tales como se describen en la presente que permiten la selección de *Agrobacterium* transformado y células vegetales transformadas. El marcador particular empleado no es esencial para esta invención, donde el marcador de preferencia depende del hospedante y de la construcción usada.

Para la transformación de las células vegetales con *Agrobacterium*, se pueden combinar los explantes e incubar con el *Agrobacterium* transformado durante un tiempo suficiente para permitir la transformación de los mismos. Después de la transformación, las *Agrobacterias* se matan mediante selección con el antibiótico apropiado y las células vegetales se cultivan con el medio selectivo apropiado. Una vez formados los callos, se puede favorecer la formación de brotes mediante el empleo de hormonas vegetales apropiadas de acuerdo con métodos muy conocidos en la técnica de cultivo de tejidos de plantas y de regeneración de plantas. Sin embargo, no siempre es necesario el estadio

intermedio de callo. Después de la formación de brotes, dichas células vegetales se pueden transferir a un medio que favorezca la formación de raíces completando en consecuencia la regeneración de las plantas. Las plantas luego se pueden dejar crecer hasta la formación de semillas y dichas semillas se pueden usar para establecer futuras generaciones. Con independencia de la técnica de transformación, el gen que codifica una proteína bacteriana de preferencia se incorpora en un vector de transferencia de genes adaptado para expresar dicho gen en una célula vegetal al incluir en el vector un elemento regulador de promotores vegetales, además de regiones de terminación transcripcionales 3' no traducidas tales como Nos y similares.

Además de numerosas tecnologías para transformar plantas, el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes extraños también puede variar. Dicho tejido incluiría sin limitaciones tejido embrionario, tejido de callo tipos I, II, y III, hipocotilo, meristemo, tejido de raíz, tejidos para la expresión en floema, y similares. Casi todos los tejidos vegetales se pueden transformar durante la desdiferenciación utilizando técnicas apropiadas descriptas en la presente.

Tal como se mencionó con anterioridad, se pueden usar una variedad de marcadores seleccionables, si se desea. La preferencia por un marcador particular es a discreción del experto en la técnica, pero se puede usar cualquiera de los siguientes marcadores seleccionables junto con cualquier otro gen no enumerado en la presente que podría funcionar como marcador seleccionable. Dichos marcadores seleccionables incluyen sin limitaciones el gen de aminoglucósido fosfotransferasa del transposón Tn5 (Aph II) que codifica la resistencia a los antibióticos kanamicina, neomicina y G41; resistencia a la higromicina; resistencia al metotrexato, además de aquellos genes que codifican la resistencia o tolerancia a glifosato; fosfinotricina (bialafos o glufosinato); herbicidas inhibidores de ALS (herbicidas de imidazolinonas, sulfonilureas y

triazolopirimidina, inhibidores de ACC-ase (por ejemplo, ariloxipropionatos o ciclohexanodionas), y otros tales como bromoxinilo, e inhibidores de HPPD (por ejemplo, mesotriona) y similares.

Además de un marcador seleccionable, puede ser deseable usar un gen informador. En algunos casos se puede usar un gen informador con o sin un marcador seleccionable. Los genes informadores son genes que generalmente no se encuentran presentes en el organismo o tejido receptor y que generalmente codifican proteínas que dan por resultado algún cambio fenotípico o propiedad enzimática. Se proveen ejemplos de dichos genes en Weising *et al.*, 1988. Los genes informadores de preferencia incluyen la beta-glucuronidasa (GUS) del sitio *uidA* de *E. coli*, el gen de cloranfenicol acetil transferasa de Tn9 de *E. coli*, la proteína verde fluorescente de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*, y los genes de luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*. Luego se puede realizar un ensayo para detectar la expresión de un gen informador en un momento adecuado después de que se haya introducido dicho gen en células receptoras. Uno de estos ensayos preferidos implica el uso del gen que codifica beta-glucuronidasa (GUS) del sitio *uidA* de *E. coli* tal como se describe por Jefferson *et al.*, (1987) para identificar células transformadas.

Además de los elementos reguladores de promotores vegetales, se pueden usar eficientemente elementos reguladores de promotores provenientes de una variedad de fuentes en células vegetales para expresar genes extraños. Por ejemplo, se pueden usar los elementos reguladores de promotores de origen bacteriano, tales como promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de manopina sintasa; los promotores de origen viral, tales como el promotor del virus mosaico de coliflor (35S y 19S), 35T (que es un promotor 35S sometido a reingeniería, véase la Patente de los Estados Unidos No. 6.166.302, especialmente el Ejemplo 7E) y similares. Los elementos

reguladores de promotores vegetales incluyen sin limitaciones la subunidad menor de ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP) carboxilasa (ssu), el promotor de beta-conglicinina, el promotor de beta-faseolina, el promotor de ADH, promotores de shock de calor, y promotores específicos de tejidos. Pueden estar presentes otros elementos tales como regiones de fijación de matriz, regiones de fijación de andamios, intrones, mejoradores, secuencias de poliadenilación y similares y en consecuencia pueden mejorar la eficiencia de la transcripción o la integración de ADN. Dichos elementos pueden o no ser necesarios para la función del ADN, si bien pueden proporcionar una mejor expresión o funcionamiento del ADN al afectar la transcripción, la estabilidad del ARNm, y similares. Dichos elementos se pueden incluir en el ADN según se desee para obtener un óptimo rendimiento del ADN transformado en la planta. Los elementos típicos incluyen sin limitaciones Adh-intrón 1, Adh-intrón 6, la secuencia líder de la proteína de cubierta del virus mosaico de la alfalfa, las secuencias UTR de osmotina, la secuencia líder de la proteína de cubierta del virus del rayado del maíz, además de otras disponibles para el experto en la técnica. Los elementos reguladores de promotores constitutivos también se pueden usar para dirigir en consecuencia la expresión génica continua en todos los tipos celulares y en todo momento (*por ejemplo*, actina, ubiquitina, CaMV 35S, y similares). Los elementos reguladores de promotores específicos de tejidos son responsables para la expresión génica en tipos de células o tejidos específicos, tales como las hojas o semillas (*por ejemplo*, zeína, oleosina, napina, ACP, globulina y similares) y también se pueden usar.

Los elementos reguladores de promotores también pueden ser activos (o inactivos) durante cierta etapa del desarrollo de la planta, además de ser activos en tejidos y órganos vegetales. Los ejemplos de ellos incluyen sin limitaciones elementos reguladores de promotores específicos de polen, específicos de

embrión, específicos de seda de maíz, específicos de fibra de algodón, específicos de raíz, específicos de endospermo de semilla, o específicos de fase vegetativa y similares. En ciertas circunstancias puede ser deseable usar un elemento regulador de promotor inducible, que es responsable de la expresión de genes en respuesta a una señal específica, por ejemplo: estímulo físico (genes de shock de calor), luz (RUBP carboxilasa), hormona (Em), metabolitos, químicos (respuesta a tetraciclinas), y estrés. También se pueden usar otros elementos de transcripción y traducción deseables que actúan sobre plantas. En la técnica se conocen numerosos vectores de transferencia de genes específicos de plantas.

Los sistemas basados en ARN viral vegetal también se pueden usar para expresar proteínas bacterianas. Con ello, el gen que codifica una proteína se puede insertar en la región promotora de la cubierta de un virus vegetal adecuado que infectará la planta hospedante de interés. La proteína luego se puede expresar y así proveer protección a la planta contra el daño por herbicida. Los sistemas basados en ARN viral vegetal se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5.500.360 a Mycogen Plant Sciences, Inc. y en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.316.931 y 5.589.367 a Biosource, ahora Large Scale Biology.

Medios de incrementar más aún los niveles de tolerancia o resistencia. En la presente se demuestra que a las plantas de la presente invención se les puede otorgar nuevos rasgos de resistencia a herbicidas sin efectos adversos observables en el fenotipo incluyendo el campo. Dichas plantas se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Las plantas ejemplificadas y sugeridas en la presente pueden soportar 2X, 3X, 4X, y 5X los niveles de aplicación típicos, por ejemplo, de al menos un herbicida objeto. Los avances en estos niveles de tolerancia se encuentran dentro del alcance de esta invención. Por ejemplo, en la técnica se conocen diversos métodos, y pueden ser

optimizados y además desarrollados de modo previsible, para incrementar la expresión de un gen determinado.

Uno de dichos métodos incluye el incremento del número de copias de los genes AAD-12 objetivo (en casetes de expresión y similares). También se pueden seleccionar eventos de transformación para aquéllos que poseen múltiples copias de los genes.

Se pueden utilizar promotores y mejoradores fuertes para "sobrecargar" la expresión. Los ejemplos de dichos promotores incluyen el promotor 35T preferido que utiliza mejoradores 35S. Para dichos usos están incluidos los promotores 35S, ubiquitina de maíz, ubiquitina de Arabidopsis, actina A.t., y CSMV. También son preferidos otros promotores virales fuertes. Los mejoradores incluyen 4 OCS y el mejorador doble 35S. También se pueden utilizar Regiones de unión de matriz (MARs) para incrementar las eficiencias de transformación y la expresión transgénica, por ejemplo.

También se pueden utilizar factores de barajado (evolución dirigida) y de transcripción para realizaciones de acuerdo con la presente invención.

También se pueden diseñar proteínas variantes que difieren en el nivel de secuencia pero que mantienen las mismas o similares distribución de carga de superficie, estructura tridimensional esencial completa, y similares. Véase *por ejemplo* la Patente de los Estados Unidos No. 7.058.515; Larson et al., *Protein Sci.* 2002 11:2804-2813, "Thoroughly sampling sequence space: Large-scale protein design of structural ensembles."; Cramer et al., *Nature Biotechnology* 15, 436-438 (1997), "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling."; Stemmer, W.P.C.1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 91:10747-10751; Stemmer, W.P.C.1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370:389-391; Stemmer, W.P.C.1995.

Searching sequence space. *Bio/Technology* 13:549-553; Crameri, A., Cwirla, S. y Stemmer, W.P.C. 1996. Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nature Medicine* 2:100-103; y Crameri, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. y Stemmer, W.P.C. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology* 14:315-319.

La actividad de los polinucleótidos recombinantes insertados dentro de células vegetales puede depender de la influencia del ADN vegetal endógeno adyacente al inserto. En consecuencia, otra opción consiste en tomar ventaja de los eventos que son conocidos por ser excelentes sitios en un genoma vegetal para las inserciones. Véase por ejemplo WO 2005/103266 A1, en relación con eventos del algodón cry1F y cry1Ac; el gen AAD-12 objeto puede estar sustituido en esos sitios genómicos en lugar de los insertos cry1F y/o cry1Ac. En consecuencia, de acuerdo con la presente invención se puede utilizar recombinación homóloga dirigida, por ejemplo. Este tipo de tecnología constituye el objeto, por ejemplo, de WO 03/080809 A2 y de la correspondiente solicitud de los Estados Unidos publicada (USPA 20030232410), en relación con el uso de dedos de zinc para la recombinación dirigida. En la técnica también se conoce el uso de recombinasas (cre-lox y flp-frt por ejemplo).

Se cree que la destoxificación de AAD-12 tiene lugar en el citoplasma. En consecuencia, en aspectos de la presente invención se incluyen medios para estabilizar más aún esta proteína y los ARNm (incluyendo el bloqueo de la degradación del ARNm), y por consiguiente se pueden aplicar métodos conocidos en la técnica. Las proteínas objeto se pueden diseñar para resistir la degradación por parte de las proteasas y similares (los sitios de escisión de proteasas se pueden remover de modo efectivo sometiendo a reingeniería a la secuencia de aminoácidos de la proteína). Dichas realizaciones incluyen el uso de las estructuras lazo y horquilla 5' y 3' como UTRs de la osmotina, y per5 (secuencias

5' no traducidas ricas en AU). También se pueden utilizar grupos 7-metilo o 2'-O-metilo de tipo extremo 5', por ejemplo, el residuo de ácido 7-metilguanílico. Ver, por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos Vol. 74, No. 7, págs. 2734-2738 (julio de 1977) *Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis*. También se pueden utilizar complejos proteicos o grupos de bloqueo de ligandos.

También se puede llevar a cabo el diseño computacional de UTR 5' o 3' aún más adecuado para AAD-12 (horquillas de síntesis) dentro del alcance de la presente invención. En otra parte en la presente se plantea la modelización por computadora en general, así como también el barajado de genes y la evolución dirigida. De modo más específico en lo que respecta a la modelización por computadora y UTRs, las técnicas de modelización por computadora para utilizar en la predicción/evaluación de los derivados de UTR 5' y 3' de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: MFold versión 3.1 disponible de Genetics Corporation Group, Madison, WI (véase Zucker et al., Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. En *RNA Biochemistry and Biotechnology*, 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker et al., *Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure*. *J. Mol. Biol.* 288, 911-940 (1999); Zucker et al., RNA Secondary Structure Prediction. En *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* S. Beaucage, D.E. Bergstrom, G.D. Glick, y R.A. Jones eds., John Wiley & Sons, Nueva York, 11.2.1-11.2.10, (2000)), COVE (análisis de la estructura del ARN usando modelos de covarianza (métodos de gramática libre de contexto estocástico)) v.2.4.2 (Eddy & Durbin, *Nucl. Acids Res.* 1994, 22: 2079-2088) que se distribuye libremente como código fuente y que se puede descargar accediendo al sitio web genetics.wustl.edu/eddy/software/, y

FOLDALIGN, también distribuido libremente y disponible para descargar en el sitio web bioinf.au.dk. FOLDALIGN/ (véase *Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences*. J. Gorodkin, L. J. Heyer y G. D. Stormo. Nucleic Acids Research, Vol. 25, no. 18 págs. 3724-3732, 1997; *Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences*. J. Gorodkin, L. J. Heyer, y G. D. Stormo. ISMB 5;120-123, 1997).

Se pueden utilizar realizaciones de la presente invención en conjunción con mutantes naturalmente evolucionados o químicamente inducidos (los mutantes pueden ser seleccionados a través de técnicas de análisis, luego se transforman con AAD-12 y posiblemente otros genes). Las plantas de la presente invención se pueden combinar con resistencia a ALS y/o resistencia evolucionada a glifosato. La resistencia a aminopiraldid, por ejemplo, también se puede combinar o "apilar" con un gen AAD-12.

Las técnicas de reproducción tradicionales también se pueden conjugar con la presente invención para combinar, introducir, y mejorar intensamente los rasgos deseados.

Los avances adicionales también incluyen el uso con antídotos apropiados para proteger más aún a las plantas y/o para adicionar resistencia cruzada a más herbicidas. (Los antídotos generalmente actúan para intensificar el sistema inmune de las plantas mediante la activación/expresión de cP450. Los antídotos son agentes químicos que reducen la fitotoxicidad de los herbicidas para las plantas de cultivo a través de un mecanismo fisiológico o molecular, sin comprometer la eficacia del control de las malezas).

Los antídotos de herbicidas incluyen benoxacor, cloquintocet, ciometrinil, diclormid, diciclonon, dietolato, fenclorazol, fenclorim, flurazol, fluxofenim, furilazol, isoxadifen, mefenpir, mefenato, anhídrido naftálico, y oxabetrinil. En realizaciones de la presente invención también se pueden utilizar activadores de plantas (una

nueva clase de compuestos que protegen a las plantas mediante la activación de sus mecanismos de defensa). Éstos incluyen acibenzolar y probenazol.

Se pueden utilizar antidotos comerciales para la protección de cultivos de gramíneas de semillas grandes, tales como maíz, grano de sorgo, y arroz sembrado húmedo, frente a herbicidas de las familias tiocarbamato y cloroacetanilida incorporados antes de la siembra o aplicados en preemergencia. También se han desarrollado antidotos para proteger cultivos de cereales de invierno tales como el trigo frente a las aplicaciones postemergencia de herbicidas de ariloxifenoxipropionato y sulfonilurea. También está bien establecido el uso de antidotos para la protección del maíz y del arroz frente a herbicidas de sulfonilurea, imidazolinona, ciclohexanodiona, isoxazol, y tricetona. Un mejoramiento inducido por antidoto de la destoxificación de herbicidas en las plantas tratadas con antidoto se acepta ampliamente como el principal mecanismo involucrado en la acción del antidoto. Los antidotos inducen cofactores tales como las enzimas destoxificantes de herbicidas y glutatona tales como glutatona S-transferasas, citocromo P450 monooxigenasas, y glucosil transferasas. Hatzios KK, Burgos N (2004) "Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners", *Weed Science*: Vol. 52, No. 3 pág. 454- 467.

El uso de un gen de citocromo p450 monooxigenasa apilado con AAD-12 constituye una realización preferida. Existen P450s involucradas en el metabolismo de herbicidas; cP450 puede ser de un origen mamífero o vegetal, por ejemplo. En las plantas superiores, la citocromo P450 monooxigenasa (P450) se conoce por conducir el metabolismo secundario. Ésta también desempeña un importante rol en el metabolismo oxidativo de los xenobióticos en cooperación con NADPH-citocromo P450 oxidorreductasa (reductasa). Se ha informado la resistencia a algunos herbicidas como resultado del metabolismo por P450 así como también glutatona S-transferasa. Una cantidad de especies P450

microsómicas involucradas en el metabolismo xenobiótico en los mamíferos se han caracterizado por la clonación molecular. Se informó que algunas de ellas metabolizan diversos herbicidas de modo eficiente. En consecuencia, las plantas transgénicas con P450 de vegetales o mamíferos pueden presentar resistencia a diversos herbicidas.

Una realización preferida de lo precedente constituye el uso de cP450 para la resistencia a acetoclor (los productos basados en acetoclor incluyen los herbicidas Surpass®, Keystone®, Keystone LA, FulTime® y TopNotch®) y/o trifluralina (tales como Treflan®). Dicha resistencia en la soja y/o en el maíz se encuentra incluida en algunas realizaciones preferidas. Para una guía adicional respecto a dichas realizaciones, véase por ejemplo Inui et al., "A selectable marker using cytochrome P450 monooxygenases for Arabidopsis transformation", *Plant Biotechnology* 22, 281-286 (2005) (en relación con un sistema de selección para la transformación de *Arabidopsis thaliana* por medio de *Agrobacterium tumefaciens* que utiliza citocromo P450 monooxigenasas humanas que metabolizan herbicidas; se transformaron y seleccionaron plántulas tolerantes a herbicidas con los herbicidas acetoclor, amiprofos-metil, clorprofam, clorsulfuron, norflurazon, y pendimetalina); Siminszky et al., "Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides", *PNAS* Vol. 96, Publicación 4, 1750-1755, 16 de febrero de 1999; Sheldon et al, *Weed Science*: Vol. 48, No. 3, págs. (291-295, "A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*"; y "Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19", *J Agric Food Chem.* 19 de abril de 2006; 54(8):2985-91 (en relación con el ensayo de una citocromo p450 monooxigenasa humana en el arroz donde las plantas de arroz supuestamente presentaron una alta tolerancia a

cloroacetamidas (acetoclor, alaclor, metoaclor, pretilaclor, y tenilclor), oxiacetamidas (mefenacet), piridazinonas (norflurazon), 2,6-dinitroanilinas (trifluralina y pendimetalina), fosfamidatos (amiprofos-metil, tiocarbamatos (piributicarb), y ureas (clortoluron)).

También existe la posibilidad de alterar o utilizar diferentes químicos 2,4-D para elaborar genes AAD-12 objetivo más eficientes. Dichos cambios posibles incluyen la creación de mejores sustratos y de mejores grupos de partida (electronegatividad superior).

También se pueden utilizar inhibidores del transporte de auxina (por ejemplo diflufenzopir) para incrementar la actividad herbicida con 2,4-D.

A menos que se indique o implique específicamente, los términos “un”, “una”, y “el” o “la” significan “al menos uno/a” tal como se usa en la presente.

Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes provisionales, y publicaciones referidas o citadas en la presente se incorporan como referencia en su totalidad hasta el grado en que no sean inconsistentes con las enseñanzas explícitas de la presente memoria descriptiva.

A continuación se presentan ejemplos que ilustran los procedimientos para la práctica de la invención. Estos ejemplos no deberían considerarse limitativos. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezclas de solventes son en volumen a menos que se indique de otro modo.

Ejemplo 1 – Método para Identificar Genes Que Otorgan Resistencia a 2,4-D In Planta

A fin de identificar genes que poseen actividades de degradación de herbicidas en la planta, es posible recurrir a las bases de datos públicas actuales tales como la NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica). Para

iniciar el proceso, es necesario tener una secuencia génica funcional ya identificada que codifique una proteína con las características deseadas (*es decir*, actividad de α -cetoglutaratodioxigenasa). Esta secuencia de proteínas se usa luego como dato de entrada para el algoritmo BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica) (Altschul *et al.*, 1997) a fin de compararla con las secuencias de proteínas NCBI disponibles depositadas. Empleando parámetros por defecto, esta búsqueda genera más de 100 secuencias de proteínas homólogas a diversos niveles. Éstos oscilan entre una identidad muy alta (85-98%) y una identidad muy baja (23-32%) a nivel del aminoácido. Tradicionalmente se esperaría que sólo las secuencias con una alta homología retengan propiedades similares a la secuencia de entrada. En este caso, se eligieron sólo las secuencias con $\leq 50\%$ de homología. Como se ejemplifica en la presente, se pueden emplear la clonación y la expresión recombinante de homólogos con tan sólo un 31% de conservación del aminoácido (respecto de *tfdA* de *Ralstonia eutropha*) para otorgar niveles comerciales de resistencia no sólo al herbicida pretendido, sino también a sustratos que nunca antes habían sido evaluados con estas enzimas.

Se identificó un gen único (*sdpA*) a partir de la base de datos NCBI (véase el sitio web ncbi.nlm.nih.gov; acceso #AF516752) como homólogo con sólo un 31% de identidad de aminoácidos con *tfdA*. La identidad porcentual se determinó traduciendo primero en proteínas ambas secuencias de ADN *sdpA* y *tfdA* depositadas en la base de datos, y luego utilizando ClustalW en el paquete de software VectorNTI para realizar la alineación de secuencias múltiples.

Ejemplo 2 – Optimización de Secuencias para la Expresión en Plantas y Bacterias

2.1 – Antecedentes.

Para obtener niveles más altos de expresión de genes heterólogos en plantas, quizá se prefiera someter a reingeniería la secuencia codificadora de proteínas de los genes a fin de expresarlos de manera más eficiente en las células vegetales. El maíz es una de aquellas plantas en las que quizá se prefiera rediseñar la región codificadora de la proteína heteróloga antes de la transformación para aumentar el nivel de expresión del gen y el nivel de proteína codificada en la planta. En consecuencia, una etapa adicional en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana consiste en someter a reingeniería a un gen heterólogo para su óptima expresión.

Un motivo para someter a reingeniería a una proteína bacteriana para su expresión en el maíz es el contenido G+C no óptimo del gen nativo. Por ejemplo, el contenido G+C muy bajo de muchos gen(es) bacteriano(s) nativo(s) (y la consecuente desviación hacia un alto contenido A+T) da como resultado la generación de secuencias que imitan o duplican las secuencias de control génicas de la planta que se conocen por ser sumamente ricas en A+T. La presencia de algunas secuencias ricas en A+T dentro del ADN del(os) gen(es) introducido(s) en plantas (*por ejemplo*, las regiones de caja TATA que normalmente se encuentran en los promotores génicos) puede ocasionar una transcripción aberrante del(os) gen(es). Por el contrario, la presencia de otras secuencias reguladoras que residen en el ARNm transcripto (*por ejemplo*, las secuencias de señales de poliadenilación (AAUAAA), o las secuencias complementarias de pequeños ARNs nucleares implicadas en el corte y empalme pre-ARNm) puede conducir a la inestabilidad del ARN. En consecuencia, un objetivo en el diseño de genes que codifican una proteína bacteriana para su expresión en el maíz, con mayor preferencia denominado(s) gen(es) optimizado(s) de plantas, consiste en generar una secuencia de ADN que tenga un mayor contenido G+C, y con preferencia una

cercana a aquélla de los genes del maíz que codifican enzimas metabólicas. Otro objetivo en el diseño del(os) gen(es) optimizado(s) de plantas que codifican una proteína bacteriana es generar una secuencia de ADN en la cual las modificaciones de la secuencia no impidan la traducción.

La **Tabla 3** ilustra cuán alto es el contenido G+C en el maíz. Para los datos en la **Tabla 3**, las regiones codificadoras de los genes se extrajeron de los asientos del GenBank (Edición 71), y las composiciones de bases se calcularon usando el programa MacVectorTM (Accelerys, San Diego, California). Las secuencias de intrones se ignoraron en los cálculos.

Tabla 3: Compilación de contenidos G + C de regiones codificadoras de proteínas de 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 Entre paréntesis se proporciona la cantidad de genes de la clase.

^b Entre paréntesis se proporcionan las desviaciones estándar.

^c Promedio de grupos combinados ignorado en el cálculo del promedio.

Debido a la plasticidad proporcionada por la redundancia/degeneración del código genético (es decir, algunos aminoácidos son especificados por más de un codón), la evolución de los genomas en diferentes organismos o clases de organismos ha dado como resultado un uso diferencial de codones redundantes. Esta “preferencia codónica” se refleja en la composición media de bases de

regiones codificadoras de proteínas. Por ejemplo, los organismos con contenidos G+C relativamente bajos utilizan codones que tienen A o T en la tercera posición de codones redundantes, mientras que aquéllos que poseen mayores contenidos G+C 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 el índice de traducción absoluta de ese ARNm, en especial cuando la abundancia relativa del ARNt cargado correspondiente al codón menor es baja. De esto se desprende que la disminución del índice de traducción por codones menores individuales sería al menos aditiva para codones menores múltiples. En consecuencia, los ARNms que tienen contenidos relativos altos de codones menores tendrían correspondientemente bajos índices de traducción. Este índice estaría reflejado por los posteriores niveles bajos de la proteína codificada.

Al someter a ingeniería genes que codifican una proteína bacteriana para la expresión en el maíz (u otra planta, tal como el algodón o la soja), se ha determinado la preferencia codónica de la planta. La preferencia codónica para el maíz es la distribución estadística de codones que la planta usa para codificar sus proteínas y el uso de codones preferido se muestra en la **Tabla 4**. Luego de establecer la preferencia, se determina el porcentaje de frecuencia de los codones en el(os) gen(es) de interés. Se deberían determinar los codones primarios preferidos por la planta, así como también la segunda, tercera, y cuarta elecciones de codones preferidos cuando existen múltiples opciones. Luego se puede diseñar una nueva secuencia de ADN que codifique la amino secuencia de la proteína bacteriana, pero la nueva secuencia de ADN difiere de la secuencia de ADN bacteriana nativa (que codifica la proteína) por la sustitución de los codones de la planta (preferida la primera, preferida la segunda, preferida la tercera o preferida la cuarta) para especificar el aminoácido en cada posición dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína. La nueva secuencia se analiza luego

para determinar los sitios de enzimas de restricción que pudieron haber sido creados por la modificación. Los sitios identificados se modifican adicionalmente reemplazando los codones con los codones preferidos según la primera, segunda, tercera o cuarta elección. Otros sitios de la secuencia que podrían afectar la transcripción o la traducción del gen de interés son las intersecciones exón:intrón (5' o 3'), las señales de poli A adición, o las señales de terminación de ARN polimerasa. La secuencia se analiza y se modifica adicionalmente para reducir la frecuencia de dobletes TA o GC. Además de los dobletes, los bloqueos de secuencias G o C que tienen más de aproximadamente cuatro residuos que son los mismos pueden afectar la transcripción de la secuencia. En consecuencia, estos bloqueos también se modifican reemplazando los codones de la primera o segunda elección, *etc.* con el siguiente codón de elección preferido.

Tabla 4. Codones de aminoácidos preferidos para las proteínas expresadas en el maíz

Aminoácido	Codón*
Alanina	GCC/GCG
Cisteína	TGC/TGT
Ácido Aspártico	GAC/GAT
Ácido Glutámico	GAG/GAA
Fenilalanina	TTC/TTT
Glicina	GGC/GGG
Histidina	CAC/CAT
Isoleucina	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
Triptófano	TGG
Tirosina	TAC/TAT
Final	TGA/TAG

Se prefiere que el(os) gen(es) optimizado(s) de la planta que codifican una proteína bacteriana contengan aproximadamente 63% de los codones de primera elección, entre aproximadamente 22% y aproximadamente 37% de los codones de segunda elección, y entre aproximadamente 15% y aproximadamente 0% de los codones de tercera o cuarta elección, siendo el porcentaje total del 100%. Con la máxima preferencia el(os) gen(es) optimizado(s) de la planta contiene(n) aproximadamente 63% de los codones de primera elección, al menos aproximadamente 22% de los codones de segunda elección, aproximadamente 7,5% de los codones de tercera elección, y aproximadamente 7,5% de los codones de tercera elección, siendo el porcentaje total del 100%. El método descrito anteriormente le permite al especialista en la técnica modificar gen(es) que son foráneos a una planta particular de modo que los genes se expresen de manera óptima en las plantas. El método se ilustra adicionalmente en la solicitud PCT WO 97/13402.

En consecuencia, a fin de diseñar genes optimizados de plantas que codifiquen una proteína bacteriana, se diseña una secuencia de ADN para codificar la secuencia de aminoácidos de dicha proteína utilizando un código

genético redundante establecido a partir de una tabla de preferencia codónica compilada a partir de secuencias génicas para la planta o las plantas particulares. La secuencia de ADN resultante tiene un mayor grado de diversidad de codones, una composición de bases deseable, puede contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción estratégicamente ubicados, y carece de secuencias que podrían interferir con la transcripción del gen, o la traducción del producto ARNm. En consecuencia, los genes sintéticos que son funcionalmente equivalentes a las proteínas/genes de la presente invención se pueden usar para transformar hospedantes, incluidas las plantas. Se puede encontrar una guía adicional sobre la producción de genes sintéticos en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5.380.831.

2.2 – Análisis de la reconstrucción de la planta AAD-12

El análisis extensivo de los 876 pares de bases (bp) de la secuencia de ADN de la región codificadora nativa AAD-12 (SEC ID NO:1) reveló la presencia de varios motivos de secuencias que según se cree son nocivos para la óptima expresión en la planta, así como también una composición no óptima de codones. La proteína codificada por la SEC ID NO:1 (AAD-12) se presenta como SEC ID NO:2. Para mejorar la producción de la proteína recombinante en monocotiledóneas al igual que en dicotiledóneas, se desarrolló una secuencia de ADN "optimizada para la planta" AAD-12 (v1) (SEC ID NO:3) que codifica una proteína (SEC ID NO:4) que es la misma que la SEC ID NO:2 nativa excepto por el agregado de un residuo de alanina en la segunda posición (subrayado en la SEC ID NO:4). El codón de alanina adicional (GCT; subrayado en la SEC ID NO:3) codifica parte de un sitio de reconocimiento de enzima de restricción *Nco*I (CCATGG) que abarca el codón de inicio de la traducción ATG. En consecuencia, tiene el doble fin de facilitar las subsiguientes operaciones de clonación mientras mejora el contexto de la secuencia que rodea el codón de inicio ATG para

optimizar la iniciación de la traducción. Las proteínas codificadas por las regiones codificadoras nativa y optimizada para la planta (v1) son 99,3% idénticas, difieren sólo en el aminoácido número 2. Por el contrario, las secuencias de ADN nativa y optimizada para la planta (v1) de las regiones codificadoras son sólo 79,7% idénticas. La **Tabla 5** muestra las diferencias en composiciones de codones de las secuencias nativa (Columnas A y D) y optimizada para la planta (Columnas B y E), y permite comparar con una secuencia optimizada para la planta teórica (Columnas C y F).

Tabla 5. Comparaciones de la composición de codones de regiones codificadoras de AAD-12 Nativa, la versión Optimizada para la Planta (v1) y una versión Optimizada para la Planta Teórica.

		A	B	C			D	E	F
Aminoácido	Codón	Nativa #	Opt Planta v1 #	Opt. Planta Teór. #	Aminoácido	Codón	Nativa #	Opt Planta v1 #	Opt. Planta Teór. #
ALA (A)	GCA	1	10	11	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	35	16	15		CTC	1	8	8
	GCG	7	0	0		CTG	23	0	0
	GCT	0	18	17		CTT	0	8	8
ARG (R)	AGA	0	4	5		TTA	0	0	0
	AGG	0	4	6		TTG	0	8	8
	CGA	0	0	0	LYS (K)	AAA	1	1	2
	CGC	15	6	4		AAG	5	5	4
	CGG	3	0	0	MET (M)	ATG	10	10	10
	CGT	0	4	3	PHE (F)	TTC	7	5	5
ASN (N)	AAC	3	2	2		TTT	1	3	3
	AAT	1	2	2	PRO (P)	CCA	0	5	6

Tabla 5. Comparaciones de la composición de codones de regiones codificadoras de AAD-12 Nativa, la versión Optimizada para la Planta (v1) y una versión Optimizada para la Planta Teórica.

		A	B	C			D	E	F
Aminoácido	Codón	Nativa #	Opt Planta v1 #	Opt. Planta Teór. #	Aminoácido	Codón	Nativa #	Opt Planta v1 #	Opt. Planta Teór. #
ASP (D)	GAC	15	9	9		CCC	9	4	4
	GAT	2	8	8		CCG	5	0	0
CYS (C)	TGC	3	2	2		CCT	0	5	5
	TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	5	4	3
END	TAA	1	0	1		AGT	0	0	0
	TAG	0	0			TCA	0	3	3
	TGA	0	1			TCC	2	3	3
GLN (Q)	CAA	1	8	7		TCG	6	0	0
	CAG	13	6	7		TCT	0	3	3
GLU (E)	GAA	3	4	4	THR (T)	ACA	1	4	5
	GAG	8	7	7		ACC	11	7	7
GLY (G)	GGA	0	8	7		ACG	5	0	0
	GGC	24	7	7		ACT	1	7	6
	GGG	1	3	4	TRP (W)	TGG	8	8	8
	GGT	0	7	7	TYR (Y)	TAC	4	3	3
HIS (H)	CAC	8	9	9		TAT	1	2	2
	CAT	8	7	7	VAL (V)	GTA	0	0	0
ILE (I)	ATA	0	2	2		GTC	6	8	7
	ATC	10	4	5		GTG	18	8	9
	ATT	1	5	4		GTT	0	8	8

Tabla 5. Comparaciones de la composición de codones de regiones codificadoras de AAD-12 Nativa, la versión Optimizada para la Planta (v1) y una versión Optimizada para la Planta Teórica.									
		A	B	C			D	E	F
Aminoácido		Nativa	Opt Planta	Opt. Planta	Aminoácido		Nativa	Opt Planta	Opt. Planta
	Codón	#	v1 #	Teór. #		Codón	#	v1 #	Teór. #
	Totales	163	164	163		Totales	130	130	130

Luego de examinar la Tabla 5 resulta claro que las regiones codificadoras nativa y optimizada para la planta, aunque codifican proteínas casi idénticas, son sustancialmente diferentes una de otra. La versión Optimizada para la Planta (v1) imita estrechamente la composición de codones de una región codificadora optimizada para la planta teórica que codifica la proteína AAD-12.

2.3 – Reconstrucción para la Expresión en *E. coli*

A menudo se usan cepas de *Escherichia coli* especialmente sometidas a ingeniería y sistemas de vectores asociados para producir cantidades relativamente grandes de proteínas para estudios bioquímicos y analíticos. A veces se descubre que un gen nativo que codifica la proteína deseada no es apto para lograr un alto nivel de expresión en *E. coli*, aún cuando el organismo fuente para el gen pueda ser otro género bacteriano. En tales casos es posible y deseable someter a reingeniería la región codificadora de la proteína del gen para volverla más adecuada para su expresión en *E. coli*. Los genes Clase II de *E. coli* se definen como aquéllos que se expresan en alto grado y de manera continua durante la fase de crecimiento exponencial de las células de *E. coli*. (Henaut, A. y Danchin, A. (1996) en *Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology*, vol. 2, págs. 2047–2066. Neidhardt, F., Curtiss III, R., Ingraham, J., Lin, E., Low, B., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M.,

Schaechter, M. y Umbarger, H. (eds.) American Society for Microbiology, Washington, DC). A través del examen de las composiciones de codones de las regiones codificadoras de genes Clase II de *E. coli*, se puede concebir una composición de codones promedio para estas regiones codificadores de genes Clase II de *E. coli*. Se cree que una región codificadora de proteínas que tiene una composición de codones promedio que imita aquélla de los genes Clase II será favorecida para la expresión durante la fase de crecimiento exponencial de *E. coli*. Usando estos lineamientos, se diseñó una nueva secuencia de ADN que codifica la proteína AAD-12 (SEC ID NO:4) (incluida la alanina adicional en la segunda posición, como se mencionó antes), de acuerdo con la composición de codones promedio de regiones codificadoras de genes Clase II de *E. coli*. La secuencia inicial, cuyo diseño se basó sólo en la composición de codones, se volvió a someter a ingeniería genética para incluir ciertas secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción adecuadas para clonar en vectores de expresión de *E. coli*. Se evitaron características nocivas de la secuencia tales como estructuras de lazo y horquilla altamente estables, como lo eran las secuencias intragénicas homólogas al extremo 3' del ARN ribosómico 16S (es decir las secuencias Shine Dalgarno). La secuencia optimizada para *E. coli* (v2) se describe como SEC ID NO:5 y codifica la proteína descrita en la SEC ID NO:4.

Las secuencias de ADN nativa y optimizada para *E. coli* (v2) son 84,0% idénticas, mientras que las secuencias de ADN optimizada para la planta (v1) y optimizada para *E. coli* (v2) son 76,0% idénticas. La Tabla 6 presenta las composiciones de codones de la región codificadora AAD-12 nativa (Columnas A y D), una región codificadora AAD-12 optimizada para la expresión en *E. coli* (v2; Columnas B y E) y la composición de codones de una región codificadora teórica para la proteína AAD-12 que tiene una composición de codones óptima de genes Clase II de *E. coli* (Columnas C y F).

Tabla 6. Comparaciones de la composición de codones de regiones codificadoras de AAD-12 Nativa, la versión Optimizada para *E. coli* (v2) y una versión Optimizada para Clase II de *E. coli* Teórica

		A	B	C			D	E	F
Aminoácido	Codón	Nativa #	Opt <i>E.</i> <i>coli</i> v2 #	Clase II Teór. #	Aminoácido	Codón	Nativa #	Opt <i>E.</i> <i>coli</i> v2 #	Clase II Teór. #
ALA (A)	GCA	1	13	13	LEU (L)	CTA	0	0	0
	GCC	35	0	0		CTC	1	2	0
	GCG	7	18	17		CTG	23	20	24
	GCT	0	13	14		CTT	0	1	0
ARG (R)	AGA	0	0	0		TTA	0	1	0
	AGG	0	0	0		TTG	0	0	0
	CGA	0	0	0	LYS (K)	AAA	1	4	5
	CGC	15	6	6		AAG	5	2	1
	CGG	3	0	0	MET (M)	ATG	10	10	10
	CGT	0	12	12		PHE (F)	TTC	7	6
ASN (N)	AAC	3	4	4	PRO (P)	TTT	1	2	2
	AAT	1	0	0		CCA	0	3	2
ASP (D)	GAC	15	10	9		CCC	9	0	0
	GAT	2	7	8		CCG	5	11	12
CYS (C)	TGC	3	2	2		CCT	0	0	0
	TGT	0	1	1	SER (S)	AGC	5	4	4
END	TAA	1	1	1		AGT	0	0	0
	TAG	0	0	0		TCA	0	0	0
	TGA	0	0	0		TCC	2	5	4
GLN (Q)	CAA	1	3	3		TCG	6	0	0

Tabla 6. Comparaciones de la composición de codones de regiones codificadoras de AAD-12 Nativa, la versión Optimizada para <i>E. coli</i> (v2) y una versión Optimizada para Clase II de <i>E. coli</i> Teórica									
		A	B	C			D	E	F
Aminoácido	Codón	Nativa #	Opt <i>E. coli</i> v2 #	Clase II Teór. #	Aminoácido	Codón	Nativa #	Opt <i>E. coli</i> v2 #	Clase II Teór. #
	CAG	13	11	11		TCT	0	4	5
GLU (E)	GAA	3	8	8	THR (T)	ACA	1	0	0
	GAG	8	3	3		ACC	11	12	12
GLY (G)	GGA	0	0	0		ACG	5	0	0
	GGC	24	12	11		ACT	1	6	6
	GGG	1	0	0	TRP (W)	TGG	8	8	8
	GGT	0	13	14	TYR (Y)	TAC	4	3	3
HIS (H)	CAC	8	11	11		TAT	1	2	2
	CAT	8	5	5	VAL (V)	GTA	0	6	6
ILE (I)	ATA	0	0	0		GTC	6	0	0
	ATC	10	7	7		GTG	18	8	7
	ATT	1	4	4		GTT	0	10	11
	Totales	163	164	164		Totales	130	130	130

Luego de analizar la Tabla 6 resulta claro que las regiones codificadoras nativa y optimizada para *E. coli*, aunque codifican proteínas casi idénticas, son sustancialmente diferentes una de otra. La versión Optimizada para *E. coli* (v2) imita estrechamente la composición de codones de una región codificadora optimizada para *E. coli* teórica que codifica la proteína AAD-12.

2.4 – Diseño de una secuencia de ADN con preferencia de codones de soja que codifica una EPSPS de soja que tiene mutaciones que confieren tolerancia a glifosato.

Este ejemplo enseña el diseño de una nueva secuencia de ADN que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de soja mutada, pero que está optimizada para su expresión en células de soja. La secuencia de aminoácidos de una EPSPS de soja triplemente mutada se describe como SEC ID NO:5 en WO 2004/009761. Los aminoácidos mutados en la secuencia así descrita están en el residuo 183 (treonina en la proteína nativa reemplazada con isoleucina), residuo 186 (arginina en la proteína nativa reemplazada con lisina), y residuo 187 (prolina en la proteína nativa reemplazada con serina). En consecuencia, se puede deducir la secuencia de aminoácidos de la proteína EPSPS de soja nativa reemplazando los aminoácidos sustituidos de SEC ID NO:5 de WO 2004/009761 con los aminoácidos nativos en las posiciones apropiadas. Dicha secuencia de proteínas nativa se describe como SEC ID NO:20 de PCT/US2005/014737 (presentada el 2 de mayo de 2005). Una secuencia de proteínas de EPSPS de soja doblemente mutada, que contiene una mutación en el residuo 183 (treonina de la proteína nativa reemplazada con isoleucina), y en el residuo 187 (prolina en la proteína nativa reemplazada con serina) se describe como SEC ID NO:21 de PCT/US2005/014737.

Del sitio web mundial "kazusa.or.jp/codon" se obtuvo una tabla de usos de codones para secuencias codificadoras de proteínas de soja (*Glycine max*), calculada a partir de 362.096 codones (aproximadamente 870 secuencias codificadoras). A esos datos se les dio un nuevo formato como se muestra en la Tabla 7. Las Columnas D y H de la Tabla 7 presentan las distribuciones (en % de uso para todos los codones para ese aminoácido) de codones sinónimos para cada aminoácido, como se encuentra en las regiones codificadoras de proteínas

de genes de la soja. Es evidente que algunos codones sinónimos para algunos aminoácidos (un aminoácido puede estar especificado por 1, 2, 3, 4 o 6 codones) están relativamente poco presentes en las regiones codificadoras de proteínas de la soja (por ejemplo, comparar el uso de codones GCG y GCT para especificar alanina). Se calculó una tabla de uso de codones de preferencia de soja a partir de los datos de la Tabla 7. Los codones encontrados en los genes de la soja en menos de aproximadamente el 10% de las apariciones totales para el aminoácido particular fueron ignorados. Para equilibrar la distribución de las elecciones de codones restantes para un aminoácido, se calculó una representación por promedio ponderado para cada codón, usando la fórmula:

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

donde C1 es el codón en cuestión, C2, C3, *etc.* representan los codones sinónimos restantes, y los valores % para los codones relevantes se toman de las columnas D y H de la Tabla 7 (ignorando los valores de codones extraños en negrita). El valor % Ponderado para cada codón se proporciona en las Columnas C y G de la Tabla 7. TGA se eligió en forma arbitraria como terminador de la traducción. Las frecuencias de uso de codones de preferencia se ingresaron luego en una tabla de códigos genéticos especializada para ser usada por el programa de diseño de genes OptGene™ (Ocimum Biosolutions LLC, Indianápolis, Indiana).

Tabla 7. Representación de codones sinónimos en secuencias codificadoras de proteínas de la soja, y cálculo de un conjunto de representaciones de codones de preferencia para el diseño de genes sintéticos optimizados para la soja.							
A	B	C	D	E	F	G	H
Aminoácido	Codón	% Ponderado	% Soja	Aminoácido	Codón	% Ponderado	% Soja
ALA (A)	GCA	33,1	30,3	LEU (L)	CTA	NU	9,1
	GCC	24,5	22,5		CTC	22,4	18,1
	GCG	NU*	8,5		CTG	16,3	13,2
	GCT	42,3	38,7		CTT	31,5	25,5
ARG (R)	AGA	36,0	30,9		TTA	NU	9,8
	AGG	32,2	27,6		TTG	29,9	24,2
	CGA	NU	8,2	LYS (K)	AAA	42,5	42,5
	CGC	14,8	12,7		AAG	57,5	57,5
	CGG	NU	6,0	MET (M)	ATG	100,0	100
	CGT	16,9	14,5	PHE (F)	TTC	49,2	49,2
ASN (N)	AAC	50,0	50,0		TTT	50,8	50,8
	AAT	50,0	50,0	PRO (P)	CCA	39,8	36,5
ASP (D)	GAC	38,1	38,1		CCC	20,9	19,2
	GAT	61,9	61,9		CCG	NU	8,3
CYS (C)	TGC	50,0	50,0		CCT	39,3	36,0
	TGT	50,0	50,0	SER (S)	AGC	16,0	15,1
END	TAA	NU	40,7		AGT	18,2	17,1
	TAG	NU	22,7		TCA	21,9	20,6
	TGA	100,0	36,6		TCC	18,0	16,9

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

*NU = No Usar

Para derivar una secuencia de ADN optimizada para la soja que codifique la proteína EPSPS doblemente mutada, la secuencia de proteínas de SEC ID NO:21 de PCT/US2005/014737 fue traducida en forma inversa por el programa OptGene™ usando el código genético de preferencia para la soja derivado anteriormente. La secuencia de ADN inicial así derivada fue modificada luego compensando los cambios de codones (mientras se retenía la representación general de promedio ponderado para los codones) a fin de reducir la cantidad de dobletes CG y TA entre codones adyacentes, aumentar la cantidad de dobletes CT y TG entre codones adyacentes, eliminar las estructuras secundarias intracatenarias altamente estables, eliminar o agregar sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, y eliminar otras secuencias que podrían ser perjudiciales para las manipulaciones de clonación o expresión del gen sometido a ingeniería genética. Se realizaron ajustes adicionales de la secuencia para eliminar

potenciales sitios de escisión de intrones de la planta, largas series de residuos A/T o C/G, y otros motivos que podrían interferir con la estabilidad, transcripción o traducción del ADN de la región codificadora en las células vegetales. Se efectuaron otros cambios a fin de eliminar largos Marcos de Lectura Abiertos internos (marcos distintos de +1). Todos estos cambios se realizaron dentro de los límites establecidos por la retención de la composición de codones de preferencia para la soja como se describió anteriormente, y conservando al mismo tiempo la secuencia de aminoácidos descrita como SEC ID NO:21 de PCT/US2005/014737.

La secuencia de ADN de preferencia para la soja que codifica la proteína EPSPS de SEC ID NO:21 se describe como bases 1-1575 de SEC ID NO:22 de PCT/US2005/014737. La síntesis de un fragmento de ADN que comprende SEC ID NO:22 de PCT/US2005/014737 se llevó a cabo por un proveedor comercial (PicoScript, Houston TX).

Ejemplo 3 – Clonación de vectores de expresión y transformación

3.1 – Construcción del vector de expresión pET de *E. coli*

Usando las enzimas de restricción correspondientes a los sitios agregados con los ligadores de clonación adicionales (Xba 1, Xho 1), se recortó AAD-12 (v2) del vector picoscript, y se ligó en un vector resistente a estreptomicina/espectinomicina pET280. Los productos ligados se transformaron luego en TOP10F' *E. coli*, y se colocaron sobre placas de agar con Caldo Luria + 50 µg/ml de Estreptomicina y Espectinomicina (LB S/S).

Para diferenciar entre las ligaduras AAD-12 (v2) : pET280 y pCR2.1 : pET280, se colocaron aproximadamente 20 colonias aisladas en 6 ml de LB-S/S, y se cultivaron a 37°C durante 4 horas con agitación. Cada cultivo se esparció luego sobre placas de LB + Kanamicina 50 µg/ml, las cuales se incubaron a 37°C durante la noche. Se supuso que las colonias que crecieron en el LB-K tenían el

vector pCR2.1 ligado en ellas, y se descartaron. Se aislaron los plásmidos de los cultivos restantes como antes, y se verificó la corrección con digestión por XbaI / XhoI. La construcción de expresión final recibió la designación pDAB3222.

3.2 – Construcción del vector de expresión de *Pseudomonas*

El marco de lectura abierto *AAD-12 (v2)* se clonó inicialmente en el vector de expresión pET modificado (Novagen), “pET280 S/S”, como un fragmento XbaI – XhoI. El plásmido pDAB725 resultante se confirmó mediante reacciones de digestión y secuenciación de enzimas de restricción. El marco de lectura abierto *AAD-12 (v2)* de pDAB725 se transfirió al vector de expresión de *Pseudomonas*, pMYC1803, como un fragmento XbaI – XhoI. Las colonias positivas se confirmaron por digestión de enzimas de restricción. La construcción pDAB739 completa se transformó en las cepas de expresión MB217 y MB324 de *Pseudomonas*.

3.3 – Finalización de vectores binarios

El gen optimizado para la planta *AAD-12 (v1)* se recibió de Picoscript (se completó el diseño de reconstrucción génica (véase más arriba) y se subcontrató a Picoscript para la construcción), y la secuencia se verificó (SEC ID NO:3) internamente, para confirmar que no hubiera alteraciones de la secuencia esperada. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con cebadores M13 Directo (SEC ID NO:6) y M13 Inverso (SEC ID NO:7) usando los reactivos “Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit” de Beckman Coulter como antes. Se analizaron los datos de la secuencia y los resultados indicaron que no había anomalías presentes en la secuencia de ADN *AAD-12 (v1)* optimizada para la planta. El gen *AAD-12 (v1)* se clonó en pDAB726 como un fragmento Nco I – Sac I. La construcción resultante se designó pDAB723, conteniendo: [promotor AtUbi10: Nt OSM 5’UTR: *AAD-12 (v1)*: Nt OSM3’UTR: ORF1 políA 3’UTR] (verificado con digestores de restricción PvuII y Not I). Luego

se clonó un fragmento Not I-Not I que contenía el casete descrito en el sitio Not I del vector binario pDAB3038. El vector binario resultante, pDAB724, que contenía el siguiente cassette [promotor AtUbi10: Nt OSM5'UTR: AAD-12 (v1): Nt OSM 3'UTR: ORF1 poliA 3'UTR: promotor CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR] se digirió con restricción (con Bam HI, Nco I, Not I, SacI, y Xmn I) para verificar la orientación correcta. La construcción completa verificada (pDAB724) se usó para la transformación en *Agrobacterium* (véase la sección 7.2).

3.4 – Clonación de construcciones de transformación adicionales

Todas las demás construcciones creadas para la transformación en especies vegetales apropiadas se realizaron mediante procedimientos similares a los descritos previamente en la presente, y mediante otros métodos de clonación molecular estándar (Maniatis *et al.*, 1982). La **Tabla 8** enumera todas las construcciones de transformación usadas con promotores apropiados y características definidas, así como también el cultivo transformado.

Tabla 8. Construcciones binarias usadas en la transformación de diversas especies vegetales.

pDAB #	pDAS #	Especies* Transformadas en	Gen de interés (GOI)	Promotor	Característica 1	Característica 2	GOI 2	Promotor	Gen de Selección	Gen de selección bacteriana	Gen de Selección de Planta	Promotor	Método Trxn
724	-	A, Ct, S	AAD12 v1	AtUbi10	NIOsm	-	-	-	Eritromicina	-	pat	CsVMV	Agro-binario
3274	-	A	AAD12 v1	AtUbi10	NIOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	-	-	Agro-binario
3278	1580	T	AAD12 v1	CsVMV	NIOsm	RB7 Mar v2			Espectinomicina	-	pat	AtUbi10	Agro-binario
3285	-	A	AAD12 v1	CsVMV	NIOsm	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	pat	AtUbi10	Agro-binario
3759	-	A, Ca, S	AAD12 v1	CsVMV	NIOsm	RB7 Mar v2	EPSPS	AtUbi10	Espectinomicina	-	pat	AtUbi10	Agro-binario
4101	1863	Cn, R	AAD12 v1	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Ampicilina	-	AHAS v3	OsAct1	Barbas / Gun
4464	-	S	AAD12 v1	CsVMV	-	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	pat	CsVMV	Agro-binario
4468	-	S	AAD12 v1	AtUbi10	-	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	pat	CsVMV	Agro-binario
4472	-	S	AAD12 v1	AtUbi3	-	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	pat	CsVMV	Agro-binario
4476	-	S	AAD12 v1	ZmUbi1	-	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	pat	CsVMV	Agro-binario
4480	-	S	AAD12 v1	AtAct2	-	RB7 Mar v2	-	-	Espectinomicina	-	pat	CsVMV	Agro-binario

*A = <i>Arabidopsis</i>	CsVMV = Promotor del Virus del Mosaico de la Vena de la Mandioca	ZmUbi1 = Promotor de Ubiquitina 1 de <i>Zea mays</i>
T = Tabaco	AtUbi10 = Promotor de Ubiquitina 10 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	HptII = higromicina fosfotransferasa
S = Soja	Atubi3 = Promotor de Ubiquitina 3 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	
Ct = Algodón	AtAct2 = Promotor de Actina 2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	
R = Arroz	RB7 Mar v2 = Región asociada a matriz (MAR) de <i>Nicotiana tabacum</i>	
Cn = Maíz	Nt Osm = Región no Traducida 5' de Osmotina de <i>Nicotiana tabacum</i> y la Región no Traducida 3' de Osmotina de <i>Nicotiana tabacum</i>	
Ca = Canola		

Ejemplo 4 – Expresión y Purificación de AAD-12 (v2) recombinante en *Pseudomonas fluorescens*

4.1 – Fermentación de *Pseudomonas fluorescens*

Para el experimento en matraz de agitación, se usaron 200 µl de la construcción pDAB739 (sec 3.2) de AAD-12 (v2) portada en caldo de glicerol de cepa de *Pseudomonas fluorescens* MB324 para inocular 50 ml de medio LB fresco suplementado con 30 µg/ml de tetraciclina/HCl. El cultivo (en un matraz Erlenmeyer deflector de 250 ml) se incubó en un agitador (New Brunswick Scientific Modelo Innova 44) a 300 rpm y 30°C durante 16 horas. Se transfirieron 20 ml del cultivo de semillas a 1 L de medio de cultivo de *Pseudomonas fluorescens* (Extracto de levadura, 5 g/L; K₂HPO₄, 5 g/L; (NH₄)₂PO₄, 7,5 g/L; (NH₄)₂SO₄; MgSO₄-7H₂O, 1 g/L; KCl, 0,5 g/L; CaCl₂-2H₂O, 0,5 g/L; NaCitrato-2H₂O, 15 g/L; Glicerol, 95 g/L; Solución de oligoelemento, 10 ml/L; Solución de oligoelemento: FeCl₃-6H₂O, 5,4 g/L; MnCl₂-4H₂O, 1 g/L; ZnSO₄-7H₂O, 1,45 g/L; CuSO₄-5H₂O, 0,25 g/L; H₃BO₃, 0,1 g/L; (NH₄)₆MO₇O₂₄, 0,1 g/L; HCl concentrado, 13 ml/L) suplementado con 20 µg/ml de tetraciclina/HCl y 250 µl de Pluronic L61 (antiespuma) en un matraz Erlenmeyer deflector de 2,8 L. Los cultivos se incubaron a 30°C y 300 rpm durante 24 horas. Se agregó β-D-1-

tiogalactopiranosida de isopropilo (IPTG) a 1 mM final en los cultivos y se continuó incubando durante aproximadamente 48 horas a 25°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 7 krpm a 4°C durante 15 minutos, y la pasta celular se almacenó a -80°C o se procesó inmediatamente para su purificación.

Para los experimentos en tanques, se inoculó 1 ml de cada uno del caldo de glicerol a un matraz deflector de 1 L que contenía 200 ml de medio LB suplementado con 30 µg/ml de tetraciclina/HCl a 300 rpm y 32°C durante 16-24 hs. Luego el cultivo combinado de los tres matraces (600 ml) se transfirió de modo aséptico a un fermentador de 20 L (B. Braun Bioreactor Systems) que contenía 10 L de medio definido propiedad de Dow (a través de Teknova, Hollister, CA) diseñado para soportar un elevado crecimiento de densidad celular. La temperatura de crecimiento se mantuvo a 32°C y el pH se controló en el punto fijo deseado a través de la adición de amoníaco acuoso. Se mantuvo oxígeno disuelto en un nivel positivo en el cultivo de líquidos regulando el flujo de aire rociado y las velocidades de agitación. El proceso de fermentación de lote alimentado se llevó a cabo durante aproximadamente 24 hs hasta que la densidad celular alcanzó 170-200 OD₅₇₅. Se adicionó IPTG a 1 mM para inducir la expresión de proteína recombinante y la temperatura se redujo y se mantuvo hasta 25°C utilizando la circulación de un suministro de agua fría. Se dejó que la fase de inducción de la fermentación continuara durante otras 24 hs. Se recogieron las muestras (30 ml) para diversos análisis para determinar la densidad celular y el nivel de expresión de proteínas a los puntos temporales de 6, 12, y 18 hs post-inducción. Al final de una serie de fermentación, las células se cosecharon mediante centrifugación a 10 krpm durante 30 min. Los pelets celulares se congelaron a -80°C para el procesamiento adicional.

4.2 – Purificación de AAD-12 (v2) para la Caracterización Bioquímica y la Producción de Anticuerpos

Aproximadamente 100-200 g de células de *Pseudomonas* congeladas (o frescas) se descongelaron y se resuspendieron en 1-2 L de buffer de extracción que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, y 25 ml de Cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma cat# P8465). Las células se rompieron sobre hielo utilizando Microfluidizer (modelo M110L o 110Y) (Microfluidics, Newton, MA) con una pasada a 75842360 -82737120 Pa (11.000-12.000 psi). El lisado se centrifugó a 24.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió y se dializó contra 10 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, durante la noche a 4°C, o se diafiltró con este buffer y se filtró a través de una membrana de 0,45 µm antes de aplicarse a las separaciones de la columna. Todas las separaciones de proteínas subsiguientes se realizaron usando Pharmacia AKTA Explorer 100 y se llevaron a cabo a 4°C. Antes de la cargarse, se equilibró una columna de Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia XK 50/00, tamaño de lecho 500 ml) con el buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,5. La muestra se aplicó a la columna a 15 ml/min y luego se lavó con este buffer hasta que el OD₂₈₀ del eluato volvió a la línea basal. Las proteínas se eluyeron con 2 L de gradiente lineal de NaCl desde 0 hasta 0,3 M a una velocidad de flujo de 15 ml/min, mientras se recolectaban fracciones de 45 ml. Se combinaron las fracciones que contenían actividad de AAD-12 según lo determinado por el ensayo enzimático colorimétrico y correspondiendo también con el peso molecular predicho de la proteína AAD-12 (una banda de aproximadamente 32 kDa en SDS-PAGE). Se agregó a la muestra sulfato de amonio sólido hasta 0,5 M final, y luego se aplicó a una columna Phenyl HP (Pharmacia XK 50/20, tamaño de lecho 250 ml) equilibrada en sulfato de amonio 0,5 M en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Esta columna se lavó con el buffer de unión a 10 ml/min hasta que el OD₂₈₀ del eluato volvió a la línea basal, las proteínas se eluyeron dentro de 2 volúmenes de

columna a 10 ml/min mediante un gradiente lineal de Sulfato de amonio desde 0,5 M hasta 0 en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, y se recolectaron fracciones de 12,5 ml. Las fracciones de los principales picos que contenían AAD-12 se combinaron, y de ser necesario, se concentraron usando un dispositivo de filtro centrífugo con membrana recortada MWCO 10 kDa (Millipore). En algunos casos la muestra se aplicó además a una columna de filtración de gel Superdex 75 (Pharmacia XK 16/60, tamaño de lecho 110 ml) con buffer PBS a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las fracciones pico que contenían AAD-12 pura se combinaron y se almacenaron a -80°C. En la mayoría de los casos, la pureza de la proteína AAD-12 se encuentra aproximándose o por encima del 99% luego de la separación en dos etapas de la columna de interacción hidrofóbica y de la columna de intercambio iónico secuencial. Un rendimiento típico para la AAD-12 purificada es de 12-18 mg/g de células húmedas. La muestra de la proteína a granel se formuló en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 0,1 M, DTT 2 mM, y 1% Trehalosa mediante diafiltración, y se liofilizó en el Virtis Freezemobile Modelo 25EL (Virtis, Cardiner, NY) durante un almacenamiento a largo plazo.

La concentración proteica se midió inicialmente a través del ensayo de Bradford usando el kit de ensayo Bio-Rad Protein (cat# 500-0006) con albúmina sérica bovina como estándar. De ser necesario, se determinó una concentración proteica más exacta utilizando hidrólisis total de aminoácidos. La muestra se analizó en el sistema Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) con estándares de calibración de aminoácidos (cat# PN5061-3330) adquirido de Agilent.

Se determinó la actividad de AAD-12 a través de los procesos a fin de asegurar que no hubiera pérdida de la actividad de enzima por cada tratamiento y manipulación, tal como se describe en el Ejemplo 5 siguiente. La pureza proteica se monitoreó usando SDS-PAGE y cromatografía analítica por exclusión de

tamaño. La muestra de proteína purificada además se verificó y confirmó por secuenciamiento de aminoácidos N-terminales, y se demostró que consiste de los residuos previstos AQTTLQITPT en su N-término. Se evaluó la estabilidad de la proteína a corto y a largo plazo por actividad enzimática y por análisis en gel de SDS-PAGE y PAGE nativo en condiciones no reductoras y reductoras. Y se advirtió que AAD-12 tiende a la oligomerización por formación de enlaces disulfuro, por lo que generalmente se usó DTT 2 mM para el almacenamiento de la proteína. Se evaluaron salina con buffer fosfato (PBS) y salina con buffer Tris (TBS) para la liofilización de proteínas, con y sin la presencia de 1% de trehalosa. Además, el contexto de endotoxina y de contaminante de ADN de la muestra purificada se midieron respectivamente, y también se evaluó la integridad de la proteína AAD-12 mediante análisis de focalización isoelectrica (IEF).

Se entregaron diez miligramos de AAD-12 (v2) purificada a Zymed Laboratories, Inc. (Sur de San Francisco, CA) para la producción de anticuerpos policlonales de conejo. El conejo recibió 5 inyecciones durante un período de 5 semanas donde cada inyección contenía 0,5 mg de la proteína purificada suspendida en 1 ml de Adyuvante de Freund completo. Los sueros se evaluaron tanto por experimentos ELISA como Western blotting para confirmar la especificidad y la afinidad antes de la purificación por afinidad, y la conjugación con peroxidasa de rábano (HRP) (Zymed Lab Inc.).

Ejemplo 5 – Ensayos *in vitro* de la actividad de AAD-12

5.1 – Ensayo por detección colorimétrica de fenol

La actividad enzimática se midió por detección colorimétrica del producto fenol utilizando un protocolo modificado a partir de aquél de Fukumori y Hausinger (1993) (*J. Biol. Chem.* 268: 24311-24317) para permitir el despliegue en un formato de microplacas de 96 pocillos. El ensayo colorimétrico se ha descripto

para usar en la medición de la actividad de dioxigenasas que escinden 2,4-D y diclorprop para liberar el producto 2,4-diclorofenol. El rendimiento de color de diversos fenoles se comparó con aquél del 2,4-diclorofenol usando el método de detección previamente descrito para asegurar qué productos de fenol se podían detectar rápidamente. Los fenoles y los análogos de fenol se evaluaron a una concentración final de 100 μM en 0,15 ml de MOPS 20 mM, pH 6,75 que contenía 200 μM de $\text{NH}_4(\text{FeSO}_4)_2$, 200 μM de ascorbato de sodio. Los piridinoles derivados de fluroxipir y triclopir no produjeron un color significativo. El rendimiento de color del 2,4-diclorofenol fue lineal y proporcional a la concentración de fenol en el ensayo hasta $\sim 500 \mu\text{M}$. Una curva de calibración realizada en condiciones de ensayo estándar (160 μl de volumen de ensayo final) indicó que se obtuvo una absorbancia a 510 nm de 0,1 a partir de 17,2 μM de fenol.

Se realizaron ensayos enzimáticos en un volumen total de 0,16 ml de MOPS 20 mM pH 6,75 que contenía 200 μM de NH_4FeSO_4 , 200 μM de ascorbato de sodio, α -cetoglutarato 1 mM, el sustrato apropiado (agregado a partir de una solución madre de 100 mM preparada en DMSO), y la enzima. Los ensayos se iniciaron mediante el agregado del sustrato ariloxialcanoato, la enzima o el α -cetoglutarato en el tiempo cero. Al cabo de 5 minutos de incubación a 25°C, la reacción se finalizó mediante el agregado de 30 μl de una mezcla 1:1:1 de Na EDTA 50 mM; buffer pH 10 (3,09 g de ácido bórico + 3,73 g de KCl + 44 ml de KOH 1 N) y 0,2% de 4-aminoantipirina. Luego se añadieron 10 μl de ferricianuro de potasio 0,8% y al cabo de 5 o 10 minutos, se registró la absorbancia a 510 nm en un lector espectrofotométrico de microplacas. Los blancos contenían todos los reactivos excepto la enzima para explicar la ocasional contaminación leve de algunos de los sustratos con pequeñas cantidades de fenoles.

5.2 – Ensayo por detección de cloropiridinol

La acción de AAD-12 sobre potenciales sustratos tales como el herbicida triclopir que contiene una piridina sustituida (en lugar de anillos benceno) liberará un piridinol sobre la escisión del enlace ariloxialcanoato. No se detectaron piridinoles utilizando la detección de aminoantipirina/ferricianuro fenol descrita en la sección anterior. Sin embargo, se descubrió que el producto cloropiridinoles absorbe fuertemente en el UV cercano con $\lambda_{\text{máx}}$ de 325 nm a pH 7 (coeficiente de extinción $\sim 8.400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Esto se usó para crear un ensayo espectrofotométrico continuo basado en microplacas. Los ensayos se realizaron en un volumen total de 0,2 ml de MOPS 20 mM pH 6,75 que contenía 200 μM de NH_4FeSO_4 , 200 μM de ascorbato de sodio, α -cetoglutarato 1 mM, el sustrato apropiado (agregado a partir de una solución madre de 100 mM preparada en DMSO), y la enzima. Los ensayos se iniciaron mediante el agregado del sustrato ariloxialcanoato, la enzima o el α -cetoglutarato en el tiempo cero y el aumento de la absorbancia se siguió durante 10 minutos a 325 nm en un lector de microplacas. Los primeros 2 minutos de la reacción se usaron para determinar las velocidades iniciales. Una curva de calibración realizada en condiciones de ensayo estándar (200 μl de volumen de ensayo final) indicó que se obtuvo una absorbancia a 510 nm de 0,1 a partir de 11,9 μM de cloropiridinol.

5.3 – Ensayo colorimétrico usando 2-(2-cloro,4-nitrofenoxi)propionato

Se diseñó un conveniente ensayo de AAD-12 usando 2-(2-cloro,4-nitrofenoxi)propionato (CNPP) como sustrato. La escisión de CNPP por parte de AAD-12 libera 2-cloro,4-nitrofenol. Este fenol tiene una absorbancia amarilla brillante a 410 nm a pH 7 lo que permite seguir la reacción de manera continua o por análisis de puntos finales. La presencia de actividad de AAD-12 se puede monitorear visualmente sin necesidad de agregar otros reactivos. Se realizaron ensayos espectrofotométricos basados en microplacas en un volumen total de 0,2 ml de MOPS 20 mM pH 6,75 que contenía 200 μM de NH_4FeSO_4 , 200 μM de

ascorbato de sodio, α -cetoglutarato 1 mM, la cantidad apropiada de CNPP (agregada a partir de una solución madre de 10 mM preparada en DMSO), y la enzima. Los ensayos se iniciaron mediante el agregado de CNPP, la enzima o el α -cetoglutarato en el tiempo cero, y el aumento de la absorbancia se siguió durante 10 minutos a 410 nm en un lector de microplacas. Los primeros 2 minutos de la reacción se usaron para determinar las velocidades iniciales. Una curva de calibración realizada en condiciones de ensayo estándar (200 μ l de volumen de ensayo final) indicó que se obtuvo una absorbancia a 410 nm de 0,1 a partir de 25,1 μ M de 2-cloro,4-nitrofenol. Usando este ensayo, las constantes cinéticas para CNPP como sustrato se determinaron en $K_m = 31 \pm 5,5 \mu\text{M}$ y $k_{cat} = 16,2 \pm 0,79 \text{ min}^{-1}$.

Ejemplo 6 – Actividad *in vitro* de AAD-12 sobre diversos sustratos

6.1 – Actividad de AAD-12 (v2) sobre (R,S)-diclorprop, (R)-diclorprop, (S)-diclorprop y 2,4-D

Usando el ensayo de detección de fenol descrito en el Ejemplo 5.1, se ensayaron cuatro fenoxialcanoatos en una mezcla de reacción que contenía 4,4 μ g de AAD-12 (v2) purificada. Se evaluó (R,S)-diclorprop (R,S-DCP) a 1 mM y se evaluaron (R)-diclorprop, (S)-diclorprop y 2,4-D a 0,5 mM. Los resultados se muestran en la **Figura 3**, la cual ilustra la actividad de AAD-12 (v2) sobre 2,4-D y los enantiómeros de diclorprop. Se incubaron 4,4 μ g de AAD-12 (v2) con sustrato 0,5 mM (1 mM para (R,S)-diclorprop), y la reacción se inició mediante el agregado de α -cetoglutarato. Al cabo de 5 minutos, la reacción se extinguió, y la absorbancia a 510 nm se determinó luego de la adición de reactivos de detección colorimétrica. Se restó el valor antecedente sin la enzima.

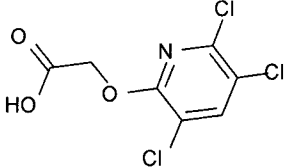
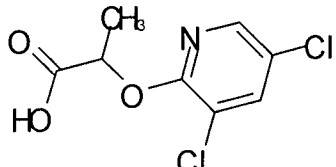
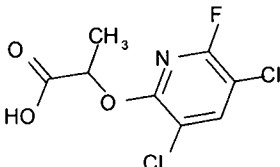
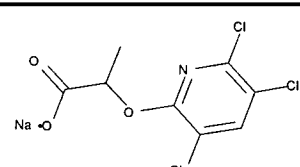
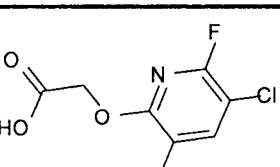
AAD-12 (v2) tiene una excelente actividad sobre (R,S)-diclorprop y (S)-diclorprop y tiene una actividad mínima sobre (R)-diclorprop. Esto indica que AAD-

12 (v2) tiene una clara preferencia (S)-enantiomérica. La actividad de AAD-12 (v2) sobre 2,4-D fue equivalente a aquella sobre (S)-diclorprop, lo que indica que la enzima puede procesar oxipropionato y oxiacetatos de manera efectiva.

6.2 – Actividad de AAD-12 (v2) sobre piridiloxialcanoatos

Usando el ensayo de piridinol descrito en el Ejemplo 5.2, se ensayaron cinco piridiloxialcanoatos a 1 mM en una mezcla de reacción que contenía 6,8 µg de AAD-12 (v2) purificada. Las velocidades de cada reacción se monitorearon y se presentan en la Tabla 9. Todos los cinco piridiloxialcanoatos se escindieron para liberar piridinoles por AAD-12 (v2). Las velocidades para los sustratos de oxipropionato 116844 y 91767 fueron algo más rápidas que aquellas de los correspondientes acetatos (triclopir y 93833 respectivamente) lo que indica una preferencia de AAD-12 (v2) por las cadenas laterales de oxipropionato en comparación con las de oxiacetato. Estos datos demuestran que AAD-12 (v2) es capaz de degradar de manera efectiva herbicidas con piridiloxialcanoato tales como el triclopir.

Tabla 9: Velocidades de escisión de piridiloxialcanoato por parte de AAD-12 (v2). Se incubaron 6,8 µg de AAD-12 (v2) con sustrato 1 mM, la reacción se inició mediante el agregado de α-cetoglutarato y el posterior aumento de la absorbancia se monitoreó a 325 nm. La velocidad antecedente de 1,4 mAU/min sin α-cetoglutarato se restó de velocidades con sustrato

ESTRUCTURA	ID	Velocidad (mAU/min)	Velocidad relativa al triclopir
	triclopir	97	1
	66357	225	2,3
	91767	190	0,8
	116844	257	1,4
	93833	118	0,5

6.3 – Constantes cinéticas de AAD-12 (v2) para 2,4-D, (R,S)-DCP y triclopir

Los valores de K_m y k_{cat} de AAD-12 (v2) purificada para los herbicidas 2,4-D, (R,S)-diclorprop y triclopir se determinaron usando el método de ensayo apropiado. La inhibición del sustrato se produjo a altas concentraciones (>1 mM) de 2,4-D y (R,S)-DCP, de modo que las concentraciones por debajo de éstas se usaron para ajustar los datos a la ecuación de Michaelis-Menten usando Grafit 4,0 (Erithacus Software, Reino Unido). No se observó inhibición del sustrato para el triclopir hasta 2 mM. Las constantes cinéticas se resumen en la Tabla 10. A partir de estos datos, el índice de escisión de AAD-12 (v2) del triclopir es ~5% del de 2,4-D, en condiciones de velocidad máxima.

Tabla 10. Constantes cinéticas de AAD-12 (v2) para tres sustratos de herbicidas				
Sustrato	K_m , μM ($\pm SE$)	k_{cat} , min^{-1} ($\pm SE$)	Método de ensayo	Inhibición del sustrato a 2 mM
2,4-D	102 ($\pm 18,4$)	54,1 ($\pm 3,1$)	Detección de fenol	55%
(R,S)-diclorprop	122 ($\pm 2,7$)*	63,4 ($\pm 0,5$)	Detección de fenol	55%
Triclopir	241 (± 30)	2,6 ($\pm 0,1$)	$\Delta A_{325\text{ nm}}$	0%

* Debido a la preferencia (S)-enantiomérica de AAD-12, el valor de K_m se calculó suponiendo que un 50% de la mezcla racémica estaba disponible como sustrato

Ejemplo 7 – Transformación en *Arabidopsis* y Selección

7.1 – Condiciones de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

Se suspendieron semillas de *Arabidopsis* de tipo salvaje en una solución de agarosa 0,1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Las semillas suspendidas se

almacenaron a 4°C durante 2 días para completar los requisitos de dormancia y asegurar la germinación sincrónica de las semillas (estratificación).

Se cubrió una Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) con vermiculita fina y se subirrigó con solución de Hoagland hasta humedecerla. La mezcla de tierra se dejó drenar durante 24 horas. Se cultivaron semillas estratificadas sobre la vermiculita y se cubrieron con cúpulas de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 7 días.

Las semillas germinaron y las plantas se cultivaron en Conviron (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) en condiciones de día prolongado (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una intensidad de luz de 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{seg}$ a temperatura (22°C) y humedad (40-50%) constantes. Las plantas se regaron inicialmente con solución de Hoagland y luego con agua desionizada para mantener la tierra húmeda pero no mojada.

7.2 – Transformación de *Agrobacterium*.

Se usó una placa de LB + agar con eritromicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) que contenía una colonia estriada DH5 α para proporcionar una colonia para inocular 4 ml de cultivos mini prep (LB líquido + eritromicina). Los cultivos se incubaron durante la noche a 37°C con agitación constante. Se usaron Qiagen (Valencia, CA) Spin Mini Preps, realizados según las instrucciones del fabricante, para purificar el ADN del plásmido.

Se prepararon células electro-competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (cepas Z707s, EHA101s, y LBA4404s) usando un protocolo de Weigel y Glazebrook (2002). Las células competentes de *Agrobacterium* se transformaron usando un método de electroporación adaptado a partir de Weigel y Glazebrook (2002). Se descongelaron 50 μl de agro-células competentes sobre hielo y se

agregó a las células 10-25 ng del plásmido deseado. El ADN y la mezcla de células se agregaron a las probetas de electroporación pre-congeladas (2 mm). Se usó un electroporador Eppendorf 2510 para la transformación con las siguientes condiciones, Voltaje: 2,4 kV, Longitud del pulso: 5 mseg.

Luego de la electroporación, se añadió 1 ml de caldo YEP (por litro: 10 g de extracto de levadura, 10 g de Bacto-peptona, 5 g de NaCl) a la probeta, y la suspensión de células-YEP se transfirió a un tubo de cultivo de 15 ml. Las células se incubaron a 28°C en un baño de agua con agitación constante durante 4 horas. Luego de la incubación, el cultivo se colocó en placas sobre YEP + agar con eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomycin (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 estriaron sobre placas de YEP + agar fresco con eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomycin (250 mg/L) y se incubaron a 28°C durante 1-3 días. Las colonias se seleccionaron para su análisis PCR a fin de verificar la presencia del inserto génico usando cebadores específicos del vector. Se usaron Qiagen Spin Mini Preps, realizados según las instrucciones del fabricante, para purificar el ADN del plásmido a partir de las colonias de *Agrobacterium* seleccionadas con la siguiente excepción: se usaron alícuotas de 4 ml de un cultivo mini prep de 15 ml durante la noche (YEP líquido + eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomycin (250 mg/L)) para la purificación del ADN. Una alternativa al uso de Qiagen Spin Mini Prep ADN consistió en lisar las células transformadas de *Agrobacterium*, suspendidas en 10 µl de agua, a 100°C durante 5 minutos. El ADN del plásmido del vector binario usado en la transformación de *Agrobacterium* se incluyó como control. La reacción de PCR se completó usando Taq ADN polimerasa de Takara Mirus Bio Inc. (Madison, Wisconsin) según las instrucciones del fabricante a

concentraciones de 0,5x. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Ciclador Térmico MJ Research Peltier programado con las siguientes condiciones: 1) 94°C durante 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 luego de la ciclación. La amplificación se analizó por electroforesis con gel de agarosa al 1% y se visualizó por tinción con bromuro de etidio. Se seleccionó una colonia cuyo producto PCR era idéntico al control con plásmido.

7.3 – Transformación de *Arabidopsis*.

La *Arabidopsis* se transformó usando el método de inmersión floral. La colonia seleccionada se usó para inocular uno o más precultivos de caldo YEP de 15-30 ml que contenían eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomicina (250 mg/L). El(os) cultivo(s) se incubaron durante la noche a 28°C con agitación constante a 220 rpm. Cada pre-cultivo se usó para inocular dos cultivos de caldo YEP de 500 ml que contenían eritromicina (200 mg/L) o espectinomicina (100 mg/L) y estreptomicina (250 mg/L) y los cultivos se incubaron durante la noche a 28°C con agitación constante. 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 medios de infiltración que contenían: 1/2x de sales de Murashige y Skoog/vitaminas B5 de Gamborg, 10% (p/v) de sacarosa, 0,044 µM de bencilaminopurina (10 µl/litro de una solución madre de 1 mg/ml en DMSO) y 300 µl/litro de Silwet L-77. Las plantas de aproximadamente 1 mes de vida se sumergieron en los medios durante 15 segundos, asegurando que se sumergiera la inflorescencia más nueva. Luego las plantas se colocaron de costado y se cubrieron (con un cobertor transparente u opaco) durante 24 horas, luego se lavaron con agua, y se colocaron en posición vertical. Las plantas se

cultivaron a 22°C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Aproximadamente 4 semanas después de la inmersión, se cosecharon las semillas.

7.4 – Selección de plantas transformadas.

Las semillas T₁ recién cosechadas [gen *AAD-12 (v1)*] 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 de ellas alícuotas de 200 mg de semillas T₁ estratificadas (~10.000 semillas) que se habían suspendido previamente en 40 ml de solución de agarosa al 0,1% y almacenadas a 4°C durante 2 días para completar los requisitos de dormancia y asegurar la germinación sincrónica de las semillas.

Se cubrió una Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) con vermiculita fina y se subirrigó con solución de Hoagland hasta humedecerla, luego se dejó drenar por gravedad. Cada alícuota de 40 ml de semillas estratificadas se sembró de manera uniforme sobre la vermiculita con una pipeta y se cubrió con cúpulas de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4-5 días. Las cúpulas se quitaron 1 día antes de la selección de transformante inicial usando un aerosol post-emergencia de glufosinato (seleccionando el gen *PAT* cotransformado).

Siete días después de la plantación (DAP) y nuevamente 11 DAP, las plantas T₁ (cotiledóneas y en la etapa 2-4-lf, respectivamente) se rociaron con una solución al 0,2% de herbicida Liberty (200 g ai/L de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) a un volumen de rociado de 10 ml/bandeja (703 L/ha) usando una boquilla pulverizadora de aire comprimido DeVilbiss para suministrar una proporción efectiva de 280 g ai/ha de glufosinato por aplicación. Las sobrevivientes (plantas que crecieron activamente) fueron identificadas 4-7 días después de la pulverización final y se transplantaron de manera individual a

macetas de 7,62 centímetros (3 pulgadas) preparadas con medios de relleno (Metro Mix 360). Las plantas transplantadas se cubrieron con cúpulas de humedad durante 3-4 días y se colocaron en una cámara de crecimiento a 22°C como antes o se llevaron directamente al invernadero. Las cúpulas se quitaron posteriormente y las plantas se cultivaron en el invernadero ($22 \pm 5^\circ\text{C}$, $50 \pm 30\%$ humedad relativa, 14 horas de luz:10 horas de oscuridad, luz natural mínima $500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ + luz complementaria) al menos 1 día antes del ensayo para determinar la capacidad de *AAD-12 (v1)* (gen optimizado para la planta) para proporcionar resistencia al herbicida de fenoxi auxina.

Luego las plantas T_1 se asignaron de manera aleatoria a diversas proporciones de 2,4-D. Para la *Arabidopsis*, 50 g ae/ha de 2,4-D es una dosis efectiva para distinguir plantas sensibles de otras con significativos niveles de resistencia. También se aplicaron proporciones elevadas para determinar los niveles relativos de resistencia (50, 200, 800 o 3200 g ae/ha). Las Tablas 10 y 11 muestran comparaciones hechas con un gen resistente al herbicida de ariloxialcanoato (*AAD-1 (v3)*) previamente descrito en PCT/US2005/014737.

Todas las aplicaciones de herbicida de auxina se realizaron usando el pulverizador DeVilbiss como se describió anteriormente para aplicar 703 L/ha de volumen de rociado (0,4 ml de solución/maceta de 7,62 centímetros (3 pulgadas)) o se aplicaron con un rociador de hileras a un volumen de rociado de 187 L/ha. El 2,4-D usado fue o bien de grado técnico (Sigma, St. Louis, MO) disuelto en DMSO y diluido en agua (concentración final de DMSO $<1\%$) o bien la formulación de sal dimetilamina comercial (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO). El diclorprop usado fue de grado comercial formulado como sal de potasio de R-diclorprop (600 g ai/L, AH Marks). A medida que las proporciones de herbicidas aumentaban por sobre 800 g ae/ha, el pH de la solución en rocío se volvía extremadamente ácido, quemando las hojas de las plantas jóvenes, tiernas de *Arabidopsis* y complicando

la evaluación de los efectos primarios de los herbicidas. Se volvió una práctica estándar aplicar estas altas proporciones de herbicidas en buffer HEPES 200 mM, pH 7,5.

Algunos ejemplares de T_1 se sometieron a herbicidas comerciales alternativos en lugar de a una de fenoxi auxina. Un punto de interés fue determinar si los herbicidas de piridiloxiacetat oauxina, triclopir y fluroxipir, podían degradarse de manera efectiva *en la planta*. Los herbicidas se aplicaron a plantas T_1 mediante el uso de un rociador de hileras a un volumen de rociado de 187 L/ha. Además en la generación de T_2 se accedió a plantas T_1 que presentaron tolerancia a 2,4-D DMA.

7.5 – Resultados de la selección de plantas transformadas

Las primeras transformaciones de *Arabidopsis* se llevaron a cabo usando AAD-12 (v1) (gen optimizado para la planta). Los transformantes T_1 se seleccionaron primero a partir de las semillas no transformadas antecedentes usando un esquema de selección de glufosinato. Se seleccionaron más de 300.000 semillas T_1 y se identificaron 316 plantas resistentes al glufosinato (gen PAT), lo que equivale a una frecuencia de transformación/selección de 0,10% la cual se ubica en el rango normal de frecuencia de selección de las construcciones donde se usan PAT + Liberty para la selección. Las plantas T_1 seleccionadas anteriormente se transplantaron luego a macetas individuales y se pulverizaron con diversas proporciones de herbicidas de ariloxialcanoato comerciales. La Tabla 11 compara la respuesta de los genes AAD-12 (v1) y de control para otorgar resistencia a 2,4-D a transformantes T_1 de *Arabidopsis*. La respuesta se presenta en términos de % de daño visual 2 WAT. Los datos se presentan como un histograma de ejemplares que presentan poco o ningún daño (<20%), daño moderado (20-40%), o daño grave (>40%). Como cada T_1 es un evento de transformación independiente, se puede esperar una significativa variación de las

respuestas T_1 individuales dentro de una proporción determinada. Se presenta una desviación estándar y media aritmética para cada tratamiento. El rango en la respuesta individual también se indica en la última columna para cada índice y transformación. *PAT/Arabidopsis Cry1F*-transformada sirvió como control transformado sensible a la auxina. El gen *AAD-12 (v1)* otorgó resistencia al herbicida a plantas T_1 individuales de *Arabidopsis*. Dentro de un tratamiento determinado, el nivel de la respuesta de la planta varió en gran medida y esto se puede atribuir al hecho de que cada planta representa un evento de transformación independiente. Cabe destacar que, a cada proporción de 2,4-D evaluada, hubo ejemplares que no fueron afectados mientras que otros resultaron gravemente afectados. En la Tabla 11 se presenta un promedio de daño para la población general por proporción simplemente para demostrar la significativa diferencia entre las plantas transformadas con *AAD-12 (v1)* frente a los controles de tipo salvaje o *PAT/Cry1F*-transformados. Los niveles de daño tienden a ser mayores y la frecuencia de plantas no dañadas fue menor a proporciones elevadas de hasta 3.200 g ae/ha (o 6x proporción de campo). Además a estos altos índices, la solución en spray se vuelve altamente ácida a menos que se le agregue buffer. La *Arabidopsis* que se cultiva mayormente en la cámara de crecimiento posee una cutícula muy delgada y los efectos de quemaduras graves pueden complicar el ensayo a estos índices elevados. No obstante, muchos ejemplares han sobrevivido a 3.200 g ae/ha de 2,4-D con poco o ningún daño.

Tabla 11. Respuesta de *Arabidopsis* T₁ transformada con AAD-12 (v1) a un rango de proporciones de 2,4-D aplicadas postemergencia, en comparación con una población resistente homocigota de AAD-1 v3 (T₄), o un control *Pat-Cry1F* transformado, sensible a la auxina.

Transformantes T ₁ del gen	% de Daño			% de Daño	
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv.
AAD-12 v1					
Promedios					Est.
Control-buffer no tratado	6	0	0	0	0
50 g ae/ha de 2,4-D	6	0	2	16	24
200 g ae/ha de 2,4-D	6	1	1	11	18
800 g ae/ha de 2,4-D	5	2	1	15	20
3200 g ae/ha de 2,4-D	8	0	0	6	6
PAT/Cry1F (control transformado)					
Promedios					Est.
Control-buffer no tratado	10	0	0	0	0
50 g ae/ha de 2,4-D	4	1	5	31	16
200 g ae/ha de 2,4-D	0	0	10	70	2
800 g ae/ha de 2,4-D	0	0	10	81	8
3200 g ae/ha de 2,4-D	0	0	10	91	2
Plantas T₄ con gen AAD-1 (v3) homocigotas					
Promedios					Est.
Control-buffer no tratado	10	0	0	0	0
50 g ae/ha de 2,4-D	10	0	0	0	0
200 g ae/ha de 2,4-D	10	0	0	0	0
800 g ae/ha de 2,4-D	10	0	0	0	0

3200g ae/ha de 2,4-D	9	1	0	2	6
----------------------	---	---	---	---	---

La Tabla 12 muestra una respuesta de dosis de *Arabidopsis* T₁ al ácido fenoxipropiónico, diclorprop conducida de manera similar. Los datos demuestran que el isómero (R-) del diclorprop activo desde el punto de vista herbicida no sirve como sustrato adecuado para AAD-12 (v1). El hecho de que AAD-1 metabolice el R-diclorprop lo suficientemente bien como para otorgar una tolerancia aceptable desde el punto de vista comercial constituye una característica distintiva que separa los dos genes. (Tabla 12). AAD-1 y AAD-12 se consideran α-ketoglutarato dioxigenasas R- y S-específicas, respectivamente.

Tabla 12. Respuesta de *Arabidopsis* T₁ a un rango de proporciones de R-diclorprop aplicadas postemergencia.

% de Daño				% de Daño	
Gen AAD-12 v1				Desv.	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Est.
Control no tratado	6	0	0	0	0
50 g ae/ha de R-diclorprop	0	0	8	63	7
200 g ae/ha de R-diclorprop	0	0	8	85	10
800 g ae/ha de R-diclorprop	0	0	8	96	4
3200 g ae/ha de R-diclorprop	0	0	8	98	2
PAT/Cry1F				% de Daño	
Promedios				Desv.	
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Est.
Control no tratado	10	0	0	0	0
50 g ae/ha de R-diclorprop	0	10	0	27	2
200 g ae/ha de R-diclorprop	0	0	10	69	3
800 g ae/ha de R-diclorprop	0	0	10	83	6
3200 g ae/ha de R-diclorprop	0	0	10	90	2
Plantas T ₄ con gen AAD-1 (v3) homocigotas				% de Daño	
	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Est.
Control no tratado	10	0	0	0	0
50 g ae/ha de R-diclorprop	10	0	0	0	0
200 g ae/ha de R-diclorprop	10	0	0	0	0
800 g ae/ha de R-diclorprop	10	0	0	0	0

3200 g ae/ha de R-diclorprop	10	0	0			0	0
------------------------------	----	---	---	--	--	---	---

7.6 – AAD-12 (v1) como marcador seleccionable.

La capacidad para usar AAD-12 (v1) como marcador seleccionable utilizando 2,4-D como agente de selección se analizó inicialmente con *Arabidopsis* transformada como se describió antes. Aproximadamente 50 semillas de *Arabidopsis* generación T₄ (homocigotas para AAD-12 (v1)) se introdujeron en aproximadamente 5.000 semillas de tipo salvaje (sensibles). Se compararon varios tratamientos, cada bandeja de plantas recibió uno o dos cronogramas de aplicación de 2,4-D en uno de los siguientes esquemas de tratamiento: 7 DAP, 11 DAP, o 7 seguidos de 11 DAP. Como todos los ejemplares también contenían el gen *PAT* en el mismo vector de transformación, se pudo comparar directamente AAD-12 seleccionada con 2,4-D con *PAT* seleccionado con glufosinato.

Los tratamientos se aplicaron con una boquilla pulverizadora DeVilbiss como se describió anteriormente. Las plantas fueron identificadas como Resistentes o Sensibles 17 DAP. El tratamiento óptimo de 75 g ae/ha de 2,4-D aplicados 7 y 11 días después de la plantación (DAP), fue igualmente efectivo en la frecuencia de selección, y dio como resultado menos daño herbicida a los ejemplares transformados que el esquema de selección de Liberty. Estos resultados indican que AAD-12 (v1) puede usarse de manera efectiva como marcador seleccionable alternativo para una población de *Arabidopsis* transformada.

7.7 – Herecabilidad.

Se autopolinizó una variedad de eventos T₁ para producir semillas T₂. Se evaluó la progenie de estas semillas aplicando 2,4-D (200 g ae/ha) a 100 hermanos T₂ al azar. Cada planta T₂ individual se transplantó a macetas

cuadradas de 7,5 cm antes de la aplicación del rocío (rociador de hileras con una proporción de aplicaciones de 187 L/ha). Setenta y cinco por ciento de las familias T_1 (plantas T_2) fueron segregadas en el modelo anticipado Resistente 3:Sensible 1 para un locus único heredado de modo dominante con herencia mendeliana según lo determinado por análisis de Chi cuadrado ($P > 0,05$).

Se recogieron semillas de entre 12 y 20 ejemplares T_2 (semillas T_3). Se evaluó la progenie de veinticinco hermanos T_3 de cada una de las ocho familias T_2 seleccionadas al azar como se describió antes. En cada línea se ha identificado aproximadamente un tercio de las familias T_2 anticipadas por ser homocigotas (poblaciones no segregantes). Estos datos demuestran que *AAD-12 (v1)* está integrada de manera estable y es heredada en forma mendeliana por al menos tres generaciones.

7.8 – Aplicaciones foliares adicionales en *Arabidopsis* AAD-12 resistente a herbicidas.

La capacidad de *AAD-12 (v1)* para proporcionar resistencia a otros herbicidas de ariloxialcanoato auxina en *Arabidopsis* transgénica se determinó mediante la aplicación foliar de diversos sustratos. Las semillas de *Arabidopsis* generación T_2 se estratificaron, y se sembraron en bandejas de selección muy parecidas a aquélla de la *Arabidopsis* (Ejemplo 6.4). Se plantó una línea de control transformada que contenía *PAT* y el gen de resistencia a insectos *Cry1F* de manera similar. Las plántulas se transfirieron a macetas individuales de 7,62 centímetros (3 pulgadas) en el invernadero. Todas las plantas se rociaron con el uso de un rociador de hileras fijo en 187 L/ha. Las plantas se rociaron con un rango de herbicidas de piridiloxiacetato: 280-2240 g ae/ha de triclopir (Garlon 3A, Dow AgroSciences) y 280-2240 g ae/ha de fluroxipir (Starane, Dow AgroSciences); y el metabolito 2,4-D que resultó de la actividad de AAD-12, 2,4-diclorofenol (DCP, Sigma) (a un equivalente molar de 280-2240 g ae/ha de 2,4-D,

se usó DCP de grado técnico). Todas las aplicaciones se formularon en agua. Cada tratamiento se replicó 3-4 veces. Las plantas se evaluaron al cabo de 3 y 14 días después del tratamiento.

No hay efecto del metabolito 2,4-D, 2,4-diclorofenol (DCP), sobre la *Arabidopsis* transgénica de control sin AAD-12 (*Pat/Cry1F*). Las plantas transformadas con AAD-12 también se protegieron claramente contra la lesión por herbicida triclopir y fluroxipir que se observó en los controles transformados no resistentes (véase la Tabla 13). Estos resultados confirman que AAD-12 (*v1*) en *Arabidopsis* provee resistencia a las auxinas piridiloxiacéticas evaluadas. Éste es el primer informe de una enzima con significativa actividad sobre los herbicidas de ácido piridiloxiacético. No se ha informado acerca de ninguna otra enzima que degrade 2,4-D con actividad similar.

Tabla 13. Comparación de la respuesta de T ₂ AAD-12 (<i>v1</i>) y las plantas de <i>Arabidopsis</i> de control transformadas a diversos herbicidas auxínicos aplicados foliarmente.			
Auxinas piridiloxiacéticas			
Tratamiento Herbicida	con	% de Daño Promedio 14 DAT	
		Plantas segregantes T ₂ AAD-12 (<i>v1</i>) (pDAB724.01.120)	Pat/Cry1f - Control
280 g ae/ha de Triclopir		0	52
560 g ae/ha de Triclopir		3	58
1120 g ae/ha de Triclopir		0	75*
2240 g ae/ha de Triclopir		3	75*
280 g ae/ha de Fluroxipir		0	75*
560 g ae/ha de Fluroxipir		2	75*

Tabla 13. Comparación de la respuesta de T₂ AAD-12 (v1) y las plantas de *Arabidopsis* de control transformadas a diversos herbicidas auxínicos aplicados foliarmente.

1120 g ae/ha de Fluroxipir	3	75*
2240 g ae/ha de Fluroxipir	5	75*
Metabolito DCP inactivo		
280 g ae/ha de 2,4-DCP	0	0
560 g ae/ha de 2,4-DCP	0	0
1120 g ae/ha de 2,4-DCP	0	0
2240 g ae/ha de 2,4-DCP	0	0

* Las plantas en este experimento estaban atrofiadas y gravemente epinásticas, pero permanecieron verdes y no recibieron una calificación del daño > 75%.

7.9 – Análisis molecular de *Arabidopsis* AAD-12 (v1).

Se llevó a cabo un Ensayo Invader (métodos de Third Wave Agbio Kit Procedures) para el análisis de la cantidad de copias de genes *PAT* con el ADN total obtenido del kit Qiagen DNeasy en múltiples líneas homocigotas de AAD-12 (v1) a fin de determinar la integración estable de la unidad de transformación vegetal que contenía *PAT* y AAD-12 (v1). El análisis supuso un vínculo físico directo de estos genes ya que estaban contenidos en el mismo plásmido.

Los resultados demostraron que todas las plantas resistentes a 2,4-D sometidas a ensayo, contenían *PAT* (y por ende por inferencia AAD-12 (v1)). El análisis de la cantidad de copias demostró que los insertos totales oscilaban entre 1 y 5 copias. Esto se correlaciona, también, con los datos sobre la expresión de la proteína AAD-12 (v1) que indican que la presencia de la enzima produce niveles

significativamente altos de resistencia a todos los ácidos fenoxiacéticos y piridiloxiacéticos disponibles en el comercio.

7.10 – *Arabidopsis* transformada con una pila molecular de AAD-12 (v1) y un gen de resistencia a glifosato.

Se produjeron semillas de *Arabidopsis* T₁, como se describió anteriormente, que contenían el plásmido pDAB3759 (AAD-12 (v1) + EPSPS) que codifica un rasgo presunto de resistencia a glifosato. Los transformantes T₁ se seleccionaron usando AAD-12 (v1) como marcador seleccionable como se describe en el ejemplo 7.6. Las plantas T₁ (eventos transformados de manera individual) se recuperaron del primer intento de selección y se transfirieron a macetas de 7,62 centímetros (tres pulgadas) en el invernadero como se describió anteriormente. También se evaluaron tres líneas de control diferentes de *Arabidopsis*: las líneas homocigotas Columbia-0 de tipo salvaje, AAD-12 (v1) + PAT T₄ (pDAB724-transformadas), y la línea homocigota PAT + Cry1F (control transformado). Las plantas transformadas pDAB3759 y pDAB724 se preseleccionaron en la etapa de plántulas según su tolerancia a 2,4-D. Cuatro días después del transplante, las plantas fueron divididas de manera uniforme para su tratamiento foliar con un rociador de hileras como se describió anteriormente con 0, 26,25, 105, 420, o 1680 g ae/ha de glifosato (Glyphomax Plus, Dow AgroSciences) en agua. Todos los tratamientos fueron replicados entre 5 y 20 veces. Las plantas se evaluaron al cabo de 7 y 14 días después del tratamiento.

La evaluación de resistencia inicial indicó que las plantas tolerantes a 2,4-D luego eran tolerantes a glifosato cuando se comparaban con la respuesta de las tres líneas de control. Estos resultados indican que la resistencia se puede otorgar a plantas respecto de dos herbicidas con diferentes modos de acción, incluyendo la tolerancia a 2,4-D y glifosato, lo cual permite la aplicación de ambos herbicidas

postemergencia. Además, se usaron AAD-12 + 2,4-D efectivamente como marcador seleccionable para una verdadera selección de resistencia.

Tabla 14. Respuesta de T₁ *Arabidopsis* a un rango de proporciones de glifosato aplicadas postemergencia (14 DAT).

Gen AAD-12 v1 + % de Daño				% de Daño	
EPSPS + HptII					
(pDAB3759) (Promedios)	<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Est.
Control no tratado	5	0	0	0	0
26,25 g ae/ha de glifosato	13	2	1	11	16
105 g ae/ha de glifosato	10	1	5	34	38
420 g ae/ha de glifosato	5	6	5	44	37
1680 g ae/ha de glifosato	0	0	16	85	9
PAT/Cry1F				% de Daño	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Prom	Desv. Est.
Control no tratado	5	0	0	0	0
26,25 g ae/ha de glifosato	0	0	5	67	7
105 g ae/ha de glifosato	0	0	5	100	0
420 g ae/ha de glifosato	0	0	5	100	0
1680 g ae/ha de glifosato	0	0	5	100	0

Tipo salvaje (Col-0)		% de Daño			% de Daño	
Promedios		<20%	20-40%	>40%	Prom	Desv. Est.
Control no tratado		5	0	0	0	0
26,25 g ae/ha de glifosato		0	0	5	75	13
105 g ae/ha de glifosato		0	0	5	100	0
420 g ae/ha de glifosato		0	0	5	100	0
1680 g ae/ha de glifosato		0	0	5	100	0
pDAB724 T ₄ (PAT + AAD-12)		% de Daño		% de Daño		
Promedios		<20%	20-40%	>40%	Prom.	Desv. Est.
Control no tratado		5	0	0	0	0
26,25 g ae/ha de glifosato		0	0	5	66	8
105 g ae/ha de glifosato		0	0	5	100	0
420 g ae/ha de glifosato		0	0	5	100	0
1680 g ae/ha de glifosato		0	0	5	100	0

7.11 – Arabidopsis AAD-12 genéticamente apilada con AAD-1 para proporcionar un espectro más amplio de tolerancia a herbicidas.

Las plantas AAD-12 (v1) (pDAB724) y AAD-1 (v3) (pDAB721) se cruzaron de manera recíproca y se recogieron semillas F₁. Se plantaron ocho semillas F₁ y se dejaron crecer para producir semillas. Se tomaron muestras de tejido de las ocho plantas F₁ y se las sometió a un análisis Western para confirmar la presencia de ambos genes. Se llegó a la conclusión de que las 8 plantas evaluadas

expresaban ambas proteínas AAD-1 y AAD-12. La semilla se amontonó y se dejó secar durante una semana antes de plantarla.

Se cultivaron cien semillas F_2 y se aplicó 280 g ai/ha de glufosinato. Noventa y seis plantas F_2 sobrevivieron a la selección de glufosinato lo que se ajusta a una ración de segregación esperada para dos loci de clasificación independiente para la resistencia a glufosinato (15 R:1S). Luego las plantas resistentes a glufosinato se trataron con 560 g ae/ha de R-diclorprop + 560 g ae/ha de triclopir, aplicado a las plantas bajo el mismo régimen de rociado que se usó para el otro ensayo. Las plantas se calificaron a los 3 y 14 DAT. Sesenta y tres de las 96 plantas que sobrevivieron a la selección de glufosinato también sobrevivieron a la aplicación del herbicida. Estos datos son consistentes con un patrón de segregación esperado (9R:6S) de dos rasgos dominantes de clasificación independiente donde cada gen proporciona resistencia a sólo uno de los herbicidas auxínicos (ya sea R-diclorprop o triclopir). Los resultados indican que *AAD-12* (pDAB724) puede apilarse exitosamente con *AAD-1* (pDAB721), incrementando en consecuencia los herbicidas de espectro que se pueden aplicar al cultivo de interés [(2,4-D + R-diclorprop) y (2,4-D + fluroxipir + triclopir), respectivamente]. Ello podría ser útil para llevar la tolerancia a 24-D a especies muy sensibles a través del apilamiento convencional de dos genes de resistencia a 24-d separados. Además, si se usara cualquiera de los genes como marcador seleccionable para un tercer y cuarto gen de interés a través de actividades de transformación independientes, entonces cada par génico podría unirse a través de actividades de reproducción convencionales y posteriormente seleccionarse en la generación F_1 por medio de aerosoles apareados con herbicidas que son exclusivos entre las enzimas AAD-1 y AAD-12 (como se muestra con R-diclorprop y triclopir para AAD-1 y AAD-12, respectivamente, más arriba).

Otros AAD agrupados también están dentro del alcance de la presente invención. La proteína TfdA analizada en otra parte de la presente (Streber *et al.*), por ejemplo, se puede usar junto con los genes AAD-12 objetivo para otorgar nuevos espectros de resistencia a herbicidas en las plantas transgénicas de la presente invención

Ejemplo 8 – Transformación del maíz mediada por BARBAS usando una selección de imazetapir

8.1 – Clonación de AAD-12 (v1).

El gen AAD-12 (v1) se recortó del vector intermediario pDAB3283 como un fragmento Nco1/Sac1. Éste se ligó direccionalmente al vector pDAB3403 recortado de manera similar que contenía el promotor monocotiledóneo ZmUbi1. Los dos fragmentos se ligaron entre sí usando T4 ADN ligasa y se transformaron en células DH5 α . Se realizaron mini-preps sobre las colonias resultantes usando el kit QIA Spin mini prep de Qiagen, y las colonias se digirieron para verificar la orientación. La primera construcción intermediaria (pDAB4100) contiene el casete ZmUbi1 : AAD-12 (v1). Esta construcción fue digerida con Not1 y Pvu1 para liberar el casete génico y digerir la estructura principal no deseada. Ésta se ligó al corte Not1 pDAB2212, que contiene el marcador seleccionable AHAS impulsado por el promotor de Actina del Arroz OsAct1. La construcción final se designó pDAB4101 o pDAS1863, y contiene ZmUbi1/AAD-12 (v1)/ZmPer5::OsAct1/AHAS/LZmLip.

8.2 – Iniciación de callos/suspensión.

Para obtener embriones inmaduros para iniciar el cultivo de callos, se realizaron cruza de F₁ entre los progenitores Hi-II cultivados en invernadero A y B (Armstrong *et al.* 1991). Cuando los embriones alcanzaron un tamaño de 1,0-1,2 mm (aproximadamente 9-10 días después de la polinización), se cosecharon

mazorcas y se esterilizó la superficie refregándolas con jabón Liqui-Nox®, se sumergieron en etanol al 70% durante 2-3 minutos, luego se sumergieron en blanqueador comercial al 20% (hipoclorito de sodio al 0,1%) durante 30 minutos.

Las mazorcas se enjuagaron con agua destilada estéril, y los embriones cigóticos inmaduros se escindieron de modo aséptico y se cultivaron en 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 (digestor enzimático), L-prolina 25 mM, 10 mg/L de AgNO₃, 2,5 g/L de Gelrite, pH 5,8) durante 2-3 semanas con el escutelo no dirigido hacia el medio. El tejido que mostraba la morfología apropiada (Welter *et al.*, 1995) fue transferido selectivamente a intervalos bisemanales a medio fresco 15Ag10 durante aproximadamente 6 semanas, luego fue transferido a medio 4 (Medio N6, 1,0 mg/L de 2,4-D, 20 g/L de sacarosa, 100 mg/L de hidrolizado de caseína (digestor enzimático), L-prolina 6 mM, 2,5 g/L de Gelrite, pH 5,8) a intervalos bisemanales durante aproximadamente 2 meses.

Para iniciar los cultivos de suspensión embriogénicos, se agregaron aproximadamente 3 ml de volumen celular compactado (PCV) de tejido de callos originado a partir de un solo embrión a aproximadamente 30 ml de medio líquido H9CP+ (mezcla de sal basal MS (Murashige y Skoog, 1962), Vitaminas MS modificadas que contenían 10 veces menos de ácido nicotínico y 5 veces más de tiamina-HCl, 2,0 mg/L de 2,4-D, 2,0 mg/L de ácido α -naftalenacético (NAA), 30 g/L de sacarosa, 200 mg/L de hidrolizado de caseína (digestor ácido), 100 mg/L de *mio*-inositol, L-prolina 6 mM, 5% v/v de agua de coco (agregada justo antes del subcultivo), pH 6,0). Los cultivos de suspensión se mantuvieron en condiciones de oscuridad en matraces Erlenmeyer de 125 ml en un equipo agitador controlado por temperatura a 125 rpm a 28°C. Las líneas celulares normalmente se establecieron dentro de los 2 a 3 meses luego de la iniciación. Durante el establecimiento, las suspensiones se subcultivaron cada 3,5 días agregando 3 ml

de PCV de células y 7 ml de medio acondicionado a 20 ml de medio líquido fresco H9CP+ usando una pipeta de calibre ancho. Una vez que el tejido comenzó a duplicar su crecimiento, las suspensiones se aumentaron gradualmente y se mantuvieron en matraces de 500 ml desde los cuales se transfirieron 12 ml de PCV de células y 28 ml de medio acondicionado a 80 ml de medio H9CP+. Una vez que las suspensiones estuvieron totalmente establecidas, se crioconservaron para un uso futuro.

8.3 – Crioconservación y descongelamiento de suspensiones

Dos días después del subcultivo, 4 ml de PCV de células de suspensión y 4 ml de medio acondicionado se agregaron a 8 ml de crioprotector (disuelto en medio H9CP+ sin agua de coco, glicerol 1 M, DMSO 1 M, sacarosa 2 M, esterilizada por filtro) y se dejó en agitación a 125 rpm a 4°C durante 1 hora en un matraz de 125 ml. Al cabo de 1 hora se añadieron 4,5 ml a un criovial Corning de 5,0 ml enfriado. Una vez llenos los viales individuales 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 que alcanzaron una temperatura final de 40°C. Luego de alcanzar la temperatura final, los viales se transfirieron a cajas dentro de soportes en el interior de una unidad de almacenamiento Cryoplus 4 (Forma Scientific) llena de vapores de nitrógeno líquido.

Para descongelarlos, los viales se retiraron de la unidad de almacenamiento y se colocaron en un recipiente cerrado que contenía hielo seco, luego se sumergieron en un baño de agua mantenido a 40-45°C hasta que disminuyó la “ebullición”. Cuando estuvieron descongelados, los contenidos se vertieron sobre una pila de ~8 papeles de filtro estériles Whatman de 70 mm (No. 4) en placas de Petri cubiertas de 100 x 25 mm. Se dejó que los filtros absorbieran el líquido durante varios minutos, luego el filtro superior que contenía las células se transfirió a 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. Al cabo de 1 semana, sólo se transfirió el tejido con una morfología promisorio desde el papel de filtro directamente sobre medio GN6 fresco. Este tejido se subcultivó cada 7-14 días hasta que se dispuso de 1 a 3 gramos para iniciar 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, en cuyo momento el subcultivo se llevó a cabo como se describió anteriormente.

8.4 Transformación Estable

Aproximadamente 24 horas antes de la transformación, se subcultivaron 12 ml de PCV de las células de suspensión de maíz embriogénicas previamente criopreservadas más 28 ml de medio acondicionado en 80 ml de medio líquido GN6 (medio GN6 sin Gelrite) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, y se colocaron en un agitador a 125 rpm a 28°C. Esto se repitió 2 veces usando la misma línea celular de modo tal que se distribuyó un total de 36 ml de PCV en 3 matraces. Al cabo de 24 horas se eliminó el medio líquido GN6 y se lo 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 *mio*-inositol, pH 6,0) por matraz, de modo de plasmolizar las células. Los matraces se colocaron en un agitador agitado a 125 RPM en oscuridad durante 30-35 minutos a 28°C, y durante este lapso se preparó una suspensión de barbas de carburo de silicio de 50 mg/ml agregando el volumen apropiado de 8,1 ml de medio líquido GN6 S/M a ~405 mg de barbas de carburo de silicio estériles, preautoclavadas (Advanced Composite Materials, Inc.).

Luego de la incubación en GN6 S/M, los contenidos de cada matraz se combinaron dentro de una botella de centrífuga de 250 ml. Una vez que todas las células se asentaron en el fondo, se extrajo todo menos ~14 ml del líquido GN6

S/M y se recogió en un matraz estéril de 1 L para su uso futuro. La suspensión prehumedecida de barbas se sometió a vórtex durante 60 segundos a máxima velocidad y luego se añadió 8,1 ml a la botella, a lo cual se agregó 170 µg de ADN como última etapa. La botella se colocó de inmediato en una mezcladora de pintura comercial modificada Red Devil 5400 y se agitó durante 10 segundos. Luego de la agitación, el cóctel de células, medios, barbas y ADN se agregó a los contenidos del matraz de 1 L junto con 125 ml de medio líquido fresco GN6 para reducir el osmotizante. Se dejó que las células se recuperaran en un agitador a 125 RPM durante 2 horas a 28°C antes de filtrarlas sobre un papel de filtro Whatman # 4 (5,5 cm) usando una unidad recolectora de células de vidrio conectada a una línea de vacío interna.

Aproximadamente 2 ml de la suspensión dispersada se pipetearon sobre la superficie del filtro a medida que se extraía el vacío. Los filtros se colocaron sobre placas de 60 x 20 mm de medio GN6. Las placas se cultivaron durante 1 semana a 28°C en una caja oscura.

Al cabo de 1 semana, los papeles de filtro se transfirieron a placas de 60 x 20 mm de medio GN6 (3P) (Medio N6, 2,0 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de *mio*-inositol, 3 µM de imazetapir de Pursuit® DG, 2,5 g/L de Gelrite, pH 5,8). Las placas se colocaron en cajas y se cultivaron durante otra semana.

Dos semanas después de la transformación, el tejido se insertó raspando todas las células sobre 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 *mio*-inositol, 7 g/L de agarosa Sea Plaque, pH 5,8, autoclavada durante sólo 10 minutos a 121°C) que contenía 3 µM de imazetapir de Pursuit® DG. El tejido se rompió y los 3 ml de agarosa y tejido se vertieron de manera uniforme sobre la superficie de una placa de GN6 (3P) de 100 x 15 mm. Esto se repitió para todas las placas restantes. Una

vez embutidas, las placas se sellaron individualmente con Nescofilm® o Parafilm M®, y luego se cultivaron hasta que aparecieron los presuntos aislados.

8.4.1 – Protocolo para la regeneración y recuperación de aislados.

Los eventos presuntamente transformados se aislaron de placas insertadas que contenían Pursuit® aproximadamente 9 semanas después de la transformación al transferirlas a medio de selección fresco de la misma concentración en placas de 60 x 20 mm. Si el crecimiento sostenido resultaba evidente al cabo de aproximadamente 2-3 semanas, el evento se consideró resistente y se sometió a un análisis molecular.

La regeneración se inició transfiriendo el tejido de callos a un medio de inducción con base de citoquinina, 28 (3P), que contenía 3 μM de imazetapir de Pursuit® DG, vitaminas y sales MS, 30,0 g/L de sacarosa, 5 mg/L de BAP, 0,25 mg/L de 2,4-D, 2,5 g/L de Gelrite; pH 5,7. Las células se dejaron crecer con luz baja ($13 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante una semana, luego con luz más alta ($40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante otra semana, antes de transferirlas a medio de regeneración, 36 (3P), que era idéntico a 28 (3P) excepto que carecía de reguladores del crecimiento vegetal. Se removieron pequeñas plántulas (3-5 cm) y se colocaron en tubos de cultivo de 150 x 25 mm que contenían medio SHGA libre de selección (vitaminas y sales basales de Schenk y Hildebrandt, 1972; 1 g/L de *mio*-inositol, 10 g/L de sacarosa, 2,0 g/L de Gelrite, pH 5,8). Una vez que las plántulas desarrollaron un sistema de raíces y brotes suficiente, se transplantaron a la tierra en el invernadero.

De los 4 experimentos, plántulas totales, que comprendían un brote y una raíz, se formaron *in vitro* sobre las placas de selección insertadas en condiciones de oscuridad sin pasar por una fase tradicional de callo. El tejido de hoja de nueve de estos “regeneradores tempranos” se sometió para el PCR de la región codificadora y el PCR de la Unidad de Transcripción Vegetal (PTU) para el casete del gen y el gen AAD-12, respectivamente. Todos tenían una región codificadora

AAD-12 intacta, mientras que 3 no tenían un PTU de longitud total (Tabla 15). Estos “regeneradores tempranos” fueron identificados como eventos 4101 para diferenciarlos de los eventos derivados de modo tradicional, que se identificaron como eventos “1283”. Las plantas de 19 eventos adicionales, obtenidas por medio de selección y regeneración estándar, fueron enviadas al invernadero, cultivadas hasta la maduración y sometidas a polinización cruzada con una línea endogámica de propiedad a fin de producir semillas T_1 . Algunos de los eventos parecen ser clones entre sí debido a patrones de banda similares según Southern blot, por lo que sólo se representaron 14 eventos únicos. Las plantas T_0 provenientes de los eventos eran tolerantes a 70 g/ha de imazetapir. El análisis Invader (gen *AHAS*) indicó una complejidad de inserción que variaba entre 1 a > de 10 copias. Trece eventos contenían la región codificadora completa para *AAD-12*; sin embargo, el análisis posterior indicó que la unidad de transformación completa de la planta no había sido incorporada por nueve eventos. Ninguno de los 1863 eventos comprometidos habían avanzado más allá del estadio T_1 y la posterior caracterización utilizó los 4101 eventos.

8.5 – Análisis Molecular: Materiales y Métodos para el Maíz.

8.5.1 – Aislamiento y cuantificación de ADN para cosecha de tejidos. Se coloca tejido fresco en tubos y se lo liofiliza a 4°C durante 2 días. Cuando el tejido está completamente seco, se coloca una perla de tungsteno (Valenita) en el tubo y las muestras se someten a 1 minuto de molienda en seco usando un molino de perlas Kelco. Luego sigue un procedimiento de aislamiento de ADN estándar DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). A continuación una alícuota del ADN extraído se tiñe con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se lee en el fluorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/μl.

8.5.2 – Análisis del ensayo Invader. Las muestras de ADN se diluyen hasta 20 ng/μl y luego se desnaturalizan por incubación en un termociclador a 95°C durante 10 minutos. Luego se prepara una mezcla Signal Probe usando la oligomezcla proporcionada y MgCl₂ (Third Wave Technologies). Se coloca una alícuota de 7,5 μl en cada cavidad de la placa de ensayo Invader seguida de una alícuota de 7,5 μl de controles, estándares, y 20 ng/μl de muestras desconocidas diluidas. Cada cavidad se cubre 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 % de la señal sobre el antecedente para la sonda blanco dividida por el % de la señal sobre la sonda de control interna antecedente dará como resultado la relación. La relación de estándares de copias conocidos desarrollada y validada con un análisis de Southern blot se usa para identificar la copia estimada de los eventos desconocidos.

8.5.3 – Reacción en cadena de polimerasa. Se usa un total de 100 ng de ADN total como la plantilla. Se usa 20 mM de cada cebador con el kit de Polimerasa Takara Ex Taq PCR (Mirus TAKRR001A). Los cebadores para AAD-12 (v1) PTU son (Directo – GAACAGTTAGACATGGTCTAAAGG) (SEC ID NO:8) e (Inverso – GCTGCAACACTGATAAATGCCAACTGG) (SEC ID NO:9). La

reacción PCR se realiza en el termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo a las muestras a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 63°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 45 segundos seguido de 72°C durante 10 minutos.

Los Cebadores para la Región Codificadora AAD-12 (v1) PCR son (Directo – ATGGCTCAGACCACTCTCCAAA) (SEC ID NO:10) e (Inverso – AGCTGCATCCATGCCAGGGA) (SEC ID NO:11). La reacción PCR se realiza en el termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo a las muestras a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 45 segundos seguido de 72°C durante 10 minutos. Los productos PCR se analizan por electroforesis sobre un gel de agarosa 1% teñido con EtBr.

8.5.4 – Análisis de Southern blot.

El análisis de Southern blot se realiza con ADN genómico obtenido del kit Qiagen DNeasy. Se somete un total de 2 µg de ADN genómico de hoja o 10 µg de ADN de callos genómicos a digestión durante la noche utilizando enzimas de restricción BSM I y SWA I para obtener datos PTU.

Luego de la digestión durante la noche se hace correr una alícuota de ~100 ng sobre un gel al 1% para asegurar la digestión completa. Tras asegurarse de ello las muestras se hacen correr sobre gran cantidad de gel de agarosa al 0,85% durante la noche a 40 voltios. El gel se desnaturaliza luego en NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. Luego el gel se neutraliza en Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,5 durante 30 minutos. Luego se coloca un aparato de gel que contiene 20x SSC para obtener una transferencia por gravedad de gel a membrana de nailon (Millipore INYC00010) durante la noche. Luego de la transferencia durante la noche la membrana entonces se somete a luz UV por medio de un entrecruzador (Stratagene UV stratalinker 1800) a 1200 X100 microjoules. La

membrana se lava luego en SDS al 0,1%, 0,1 SSC durante 45 minutos. Al cabo del lavado de 45 minutos, la membrana se hornea durante 3 horas a 80°C y después se almacena a 4°C hasta la hibridación. El fragmento de plantilla de hibridación se prepara usando la región codificadora anterior PCR usando ADN del plásmido. El producto se hace correr sobre un gel de agarosa al 1% y se escinde y luego se extrae en gel mediante el procedimiento de extracción de gel Qiagen (28706). La membrana se somete entonces a una etapa de prehibridación a 60°C durante 1 hora en buffer Perfect Hyb (Sigma H7033). Se emplea el procedimiento Prime it RmT dCTP-labeling rxn (Stratagene 300392) para desarrollar la sonda con base de p32 (Perkin Elmer). La sonda se limpia usando las columnas Probe Quant. G50 (Amersham 27-5335-01). Se utilizan dos millones de recuentos CPM para hibridar los Southern blots durante la noche. Luego de la hibridación durante la noche los blots se someten entonces a dos lavados de 20 minutos a 65°C en SDS al 0,1%, 0,1 SSC. Los blots se exponen entonces a una incubación con película durante la noche a -80°C.

8.6 Tolerancia a herbicidas postemergencia en Maíz T₀ transformado por AAD-12

Cuatro eventos T₀ se dejaron aclimatar en el invernadero y se cultivaron hasta que aparecieron del espiral 2-4 hojas nuevas, con apariencia normal (es decir, plantas que habían pasado desde el cultivo de tejido hasta las condiciones de cultivo del invernadero). Las plantas se cultivaron a 27°C en condiciones de 16 horas de luz:8 horas de oscuridad en el invernadero. Las plantas se trataron luego con formulaciones comerciales de Pursuit® (imazetapir) o 2,4-D Amina 4. Se roció Pursuit® para demostrar la función del gen marcador seleccionable presente dentro de los eventos evaluados. Las aplicaciones del herbicida se realizaron con un rociador de hileras con un volumen de rociado de 187 L/ha, una altura de rociado de 50 cm. Las plantas se rociaron con una dosis letal de imazetapir (70 g

ae/ha) o una proporción de sal 2,4-D DMA capaz de causar un daño significativo a líneas de maíz no transformadas (2240 g ae/ha). Una dosis letal se define como la proporción que causa un >95% de daño a Hi-II endogámico. Hi-II es el antecedente genético de los transformantes de la presente invención.

Algunos individuos fueron tolerantes a los herbicidas a los cuales los respectivos genes fueron a proporcionar resistencia. El clon individual '001' del evento "001" (también conocido como, 4101(0)-001-001), sin embargo, causó un daño menor pero se recuperó en 14 DAT. Tres de los cuatro eventos avanzaron y los individuos se cruzaron con 5XH751 y se llevaron a la siguiente generación. Cada planta tolerante a herbicida era positiva para la presencia de la región codificadora de AAD-12 (ensayo de PCR) o la presencia del gen AHAS (ensayo Invader) para plantas tolerantes a 2,4-D e imazetapir, respectivamente. Se detectó la proteína AAD-12 en todos los eventos de las plantas T₀ tolerantes a 2,4-D que contienen una región codificadora intacta. La cantidad de copias del(os) transgen(es) (AHAS, y por inferencia AAD-12) varió significativamente de 1 a 15 copias. Las plantas T₀ individuales se cultivaron hasta la madurez y se sometieron a polinización cruzada con una línea endogámica de propiedad a fin de producir semillas T₁.

Tabla 15. Caracterización de plantas de maíz T ₀ transformadas con AAD-12.						
Evento	Tratamiento con Rocío	% de Daño (14 DAT)	AAD-12 ELISA (ppm TSP)	AAD12 PCR (Región Codificadora)	AAD12 PCR (PTU)	AHAS Copia # (Invader)
4101(0)003.001	2240 g ae/ha de 2,4-D	0	146,9	+	+	1
4101(0)003.003	2240 g ae/ha	0	153,5	+	+	1

	de 2,4-D					
4101(0)005.001	2240 g ae/ha de 2,4-D	0	539,7	+	+	9
4101(0)005.0012	0 g ae/ha de 2,4-D	0	562,9	+	+	7
4101(0)001.001	70 g ae/ha de imazetapir	5	170,7	+	+	6
4101(0)002.001	0 g ae/ha de imazetapir	0	105,6	+	-	2
4101(0)002.002	70 g ae/ha de imazetapir	0	105,3	+	-	2
4101(0)003.002	70 g ae/ha de imazetapir	0	0	+	banda más pequeña de lo esperado	15

8.7 – Verificación de alta tolerancia a 2,4-D en maíz T₁.

Semillas T₁ AAD-12 (v1) se plantaron en macetas de 7,62 centímetros (3 pulgadas) que contenían medio Metro Mix y a un estadio de 2 hojas se rociaron con 70 g ae/ha de imazetapir para eliminar nulos. Las plantas sobrevivientes se transplantaron a macetas de 3,78 l (1 galón) que contienen medio Metro Mix y se colocaron en las mismas condiciones de cultivo que las antes mencionadas. En el estadio V3-V4 se rociaron las plantas con el equipo de rociado de hileras fijado en 187 L/ha a 560 o 2240 g ae/ha de 2,4-D DMA. Las plantas se calificaron a 3 y 14 y se compararon con las plantas de control 5XH751 x Hi II. Se desarrolló una escala de graduación de 0-10 (sin daño a daño extremo por auxina) para

distinguir el daño a la raíz de sostén. Los grados de Raíz de Sostén se tomaron a 14 DAT para mostrar la tolerancia a 2,4-D. 2,4-D causa malformación de la raíz de sostén, y es un indicador constante del daño de herbicida auxínico en el maíz. Los datos de Raíz de Sostén (tal como se observan en la tabla siguiente) demuestran que 2 de los 3 eventos evaluados eran muy tolerantes a 2240 g ae/ha de 2,4-D DMA. El evento “pDAB4101(0)001.001” era aparentemente inestable; sin embargo, los otros dos eventos eran muy tolerantes a 2,4-D y 2,4-D + imazetapir o a 2,-4 D + glifosato (véase la Tabla 16).

Tabla 16. Daño de Raíz de Sostén de plantas T ₁ transformadas AAD-12 (v1) y de Plantas de maíz de control no transformadas. Una escala de 0-10, donde 10 era el mayor, se usó para graduar el daño por 2,4-D DMA. Los resultados son un promedio visual de cuatro replicaciones por tratamiento.				
Herbicida	Control no	AAD-12 (v1)	AAD-12	AAD-12 (v1)
	Transformado	pDAB4101(0)003.003	(v1)pDAB4101(0)001.001	pDAB4101(0)005.001
	Daño Promedio de Raíz de Sostén (Escala 0-10)			
0 g ae/ha de 2,4-D DMA	0	0	0	0
2240 g ae/ha de 2,4-D DMA	9	1	8	0

PATENTE
DE

NOM
265

Organización y
Digitalización CSA Ltda

INVENCIÓN

08/53430

3/3

8.8 – Heredabilidad de AAD-12 (v1) en el maíz.

También se realizó una prueba de progenie en siete familias AAD-12 (v1) T₁ que se habían cruzado con 5XH751. Las semillas se plantaron en macetas de 7,62 centímetros (tres pulgadas) tal como se describió antes. En el estadio de 3 hojas todas las plantas se rociaron con 70 g ae/ha de imazetapir en el rociador de hileras tal como se describió con anterioridad. Después de 14 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Cuatro de las seis líneas evaluadas segregaron como locus único, un rasgo mendeliano dominante (1R:1S) tal como se determinó por análisis de Chi cuadrado. Las plantas sobrevivientes luego se rociaron con 2,4-D y todas las plantas se consideraron tolerantes a 2,4-D (proporciones $\geq$ 560 g ae/ha). AAD-12 se hereda como un gen fuerte de resistencia a ariloxialcanoato auxina en múltiples especies cuando se cruzan recíprocamente con un híbrido comercial.

8.9 – Apilamiento de AAD-12 (v1) para aumentar el espectro de herbicida

Se cruzaron recíprocamente AAD-12 (v1) (pDAB4101) y el endogámico de elite Roundup Ready (BE1146RR) y se recogieron las semillas F₁. La semilla de dos líneas F₁ se plantaron y trataron con 70 g ae/ha de imazetapir en el estadio V2 para eliminar nulos. De las plantas sobrevivientes, se separaron las réplicas y se trataron con 1120 g ae/ha de 2,4-D DMA + 70 g ae/ha de imazetapir (para confirmar la presencia de gen AHAS) o 1120 g ae/ha de 2,4-D DMA + 1680 g ae/ha de glifosato (para confirmar la presencia de gen Round Up Ready) en un rociador de hileras calibrado hasta 187 L/ha. Las plantas se calificaron a 3 y 16 DAT. Los datos de rociado demostraron que AAD-12 (v1) se puede apilar convencionalmente con un gen de tolerancia a glifosato (por ejemplo el gen Roundup CP4-EPSPS) u otros genes de tolerancia a herbicidas para proveer un espectro aumentado de herbicidas que se pueden aplicar con seguridad al maíz. De modo similar se observó tolerancia a imidazolinona + 2,4-D + glifosato en

plantas F₁ y no mostró fenotipo negativo mediante las combinaciones de pilas moleculares o de reproducción de estos transgenes múltiples.

Tabla 17. Datos que demuestran el incremento del espectro de tolerancia a herbicidas que resulta de una pila F₁ de AAD-12 (v1) y BE1146RR (un endogámico de elite tolerante a glifosato abreviado como AF).

Herbicida	Control no Transformado	2P782 (Control Roundup Ready)	AAD-12 (v1) pDAB4101(0) 003.R003.AF	AAD-12 (v1) pDAB4101(0) 005.R001.AF
	Promedio de % de Daño 16 DAT			
0 g ae/ha de 2,4-D DMA	0	0	0	0
1120 g ae/ha de 2,4-D DMA	21	19	0	0
1120 g ae/ha de 2,4-D DMA + 70 g ae/ha de imazetapir	100	100	5	1
01120 g ae/ha de 2,4-D DMA + 1680 g ae/ha de glifosato	100	71	2	5

8.10- Tolerancia del campo de plantas de maíz transformadas pDAB4101 a herbicidas 2,4-D, triclopir y fluroxipir.

Los ensayos de tolerancia al nivel del campo se realizaron en dos eventos líneas AAD-12 (v1) pDAB4101 (4101(0)003.R.003.AF y 4101(0)005.R001.AF) y un híbrido de control Roundup Ready (RR) (2P782) en Fowler, Indiana y Wayside, Mississippi. Las semillas se plantaron con sembradora de conos en hileras con 101,60 cm (40 pulgadas) de espaciado en Wayside y 76,20 (30 pulgadas) de

espaciado en Fowler. El diseño experimental era un diseño de bloque completo aleatorizado con 3 replicaciones. Los tratamientos con herbicida fueron con 2,4-D (sal dimetilamina) a 1120, 2240 y 4480 g ae/ha, triclopir a 840 g ae/ha, fluroxipir a 280 g ae/ha y un control no tratado. Los eventos *AAD-12 (v1)* contenían el gen *AHAS* como marcador seleccionable. Los eventos de maíz F_2 se segregaron de manera tal que las plantas *AAD-12 (v1)* se trataron con imazetapir a 70 g ae/ha para eliminar las plantas nulas. Los tratamientos con herbicidas se aplicaron cuando el maíz alcanzó el estadio V6 usando un rociador de mochila de aire comprimido suministrando 187 L/ha de volumen portador a una presión de 130-200 kpa. La calificación de daño visual se tomó a los 7, 14 y 21 días luego del tratamiento. Las calificaciones del daño de raíz de sostén se tomaron a 28 DAT en una escala de 0-10 con 0-1 siendo una ligera fusión de raíz de sostén, 1-3 siendo una moderada hinchazón/modificación de raíz de sostén y proliferación de raíz, 3-5 siendo una moderada fusión de raíz de sostén, 5-9 una severa fusión de raíz de sostén y malformación y 10 siendo la inhibición total de raíz de sostén.

Las respuestas de eventos *AAD-12 (v1)* a 2,4-D, triclopir, y fluroxipir a los 14 días después del tratamiento se muestran en la Tabla 18. El daño de cultivos fue más grave a 14 DAT. El maíz de control RR (2P782) tenía un daño grave (44% a 14 DAT) con 2,4-D a 4480 g ae/ha, lo cual es 8 veces (8X) la proporción de uso normal en el campo. Los eventos *AAD-12 (v1)* todos demostraron excelente tolerancia a 2,4-D a 14 DAT con 0% de daño en las proporciones 1, 2 y 4X, respectivamente. El maíz de control (2P782) tenía un daño grave (31% a 14 DAT) con la proporción 2X de triclopir (840 g ae/ha). Los eventos *AAD-12 (v1)* mostraron tolerancia a proporciones de 2X de triclopir con un promedio de 3% de daño a 14 DAT para los dos eventos. El fluroxipir a 280 g ae/ha causó 11% de daño visual al maíz de tipo salvaje a 14 DAT. Los eventos *AAD-12 (v1)* demostraron un aumento de tolerancia con un promedio de 8% de daño a 5 DAT.

Las aplicaciones de herbicidas auxínicos al maíz en el estadio de crecimiento V6 pueden causar malformación de las raíces. La Tabla 18 muestra la gravedad del daño de las raíces de sostén causado por 2,4-D, triclopir, y fluroxipir. El triclopir a 840 g ae/ha causó la más grave malformación y fusión de las raíces de sostén que dan por resultado una calificación promedio de daño de raíz de sostén de 7 en el maíz de tipo control 2P782. Ambos eventos de maíz AAD-12 (v1) no mostraron daño de raíz de sostén por el tratamiento con triclopir. El daño de raíz de sostén en maíz 2P782 aumentó con mayores proporciones de 2,4-D. A 4480 g ae/ha de 2,4-D, los eventos AAD-12 no mostraron daño de raíz de sostén; mientras que, se observó una grave malformación y fusión de las raíces de sostén en el híbrido 2P782. El fluroxipir solo causó una moderada hinchazón y modificación de la raíz de sostén en el maíz de tipo salvaje mientras que los eventos AAD-12 (v1) no mostraron daño de raíz de sostén.

Estos datos claramente demuestran que AAD-12(v1) genera un alto nivel de tolerancia en el maíz a 2,4-D, triclopir y fluroxipir con proporciones que exceden en mucho las de uso comercial y que causan un grave daño visual y de raíz de sostén al maíz sin AAD-12 (v1).

Tabla 18. Daño Visual de eventos de AAD-12 y maíz de tipo salvaje tras las aplicaciones foliares de 2,4-D, triclopir y fluroxipir en condiciones de campo.				
% de Daño Visual 14 DAT				
Proporción		AAD-12		2P782
Tratamiento	(g ae/ha)	4101(0)003.R.003.AF	4101(0)005.001.AF	control
No tratado	0	0	0	0
2,4-D	1120	0	0	9
2,4-D	2240	0	1	20
2,4-D	4480	0	1	34

Fluroxipir	280	1	5	11
Triclopir	840	3	4	31
Dicamba	840	8	8	11

Tabla 19. Calificacines de daño de raíz de sostén para plantas de maíz de tipo salvaje y AAD-12 en respuesta a 2,4-D, triclopir y fluroxipir en condiciones de campo.

Calificación de Daño de Raíz de Sostén (escala 0-10) 28 DAT				
Tratamient	Proporció n	Evento AAD-12	Evento AAD-12	Tipo salvaje
o	(g ae/ha)	4101(0)003.R.003.AF	4101(0)005.001.AF	NK603
No tratado	0	0	0	0
2,4-D	1120	0	0	3
2,4-D	2240	0	0	5
2,4-D	4480	0	0	6
Fluroxipir	280	0	0	2
Triclopir	840	0	0	7
Dicamba	840	1	1	1

Ejemplo 9 – Detección de proteínas a partir de plantas transformadas por medio de anticuerpos

9.1 – Extracción de AAD-12 (v1) a partir de hojas de plantas.

Se cortaron aproximadamente entre 50 y 100 mg de tejidos de hojas en pequeños trozos (o 4 discos de hojas perforados con un solo orificio) y se colocaron en tubos acumulados de 2 ml que contenían 2 perlas de BB de acero inoxidable (4,5 mm; Daisy Co., cat. # 145462-000). A cada muestra se agregaron quinientos microlitros de de buffer de extracción vegetal (PBS que contenía Tween 20 al 0,05% y Albúmina sérica bovina al 1%). Los tubos se taparon y se

aseguraron en el Geno/Grinder (Modelo 2000-115, Certiprep, Metuchen, NJ) y se agitaron durante 6 minutos con una regulación a 1x de 500 rpm. Los tubos se centrifugaron a 5000x g durante 10 minutos y el sobrenadante que contenía las proteínas solubles se analizó para determinar AAD-12 (v1) por Western Blots y ELISA.

9.2 – Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente a menos que se indicara de otro modo. Se recubrieron cien microlitros de anticuerpo anti-AAD-12 purificado (0,5 µg/ml) sobre una placa de microtitulación de 96 pocillos y se incubaron a 4°C durante 16 horas. La placa se lavó cuatro veces con buffer de lavado (salina con buffer de fosfato (PBS; pH 7,4) 100 mM que contenía Tween 20 al 0,05%) usando una lavadora de placas, a lo que siguió el bloqueo con leche descremada al 4% disuelta en PBS durante 1 hora. Luego del lavado, se incubaron en los pocillos 100 µL de AAD-12 estándar de extractos de plantas o concentraciones conocidas de diferentes muestras. Para la curva estándar, se diluyó AAD-12 purificada 2 veces en serie de 52 a 0,813 ng/ml por triplicado. Los extractos de plantas se diluyeron 5, 10, 20, y 40 veces en PBS y se analizaron por duplicado. Luego de 1 hora de incubación, la placa se lavó como se describió antes. Se incubaron en cada pocillo cien microlitros de conjugado anticuerpo anti-AAD-12-HRP (0,5 µg/ml) durante 1 hora antes del lavado. Se incubaron en cada pocillo cien micro-litros de sustrato HRP, 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (Pierce, Rockford, IL), durante 10 minutos antes de detener la reacción mediante el agregado de 100 µL de H₂SO₄ 0,4 N. El OD de cada pocillo se midió usando un lector de microplacas a 450 nm. Para determinar las concentraciones de AAD-12 (v1) en el extracto de planta, el valor de OD de los duplicados se promedió y se extrapoló a partir de la curva estándar usando el Softmax® Pro ver. 4.0 (Molecular Devices).

A los fines de la comparación, cada muestra se normalizó con su peso fresco y se calculó la expresión porcentual.

9.3 – Análisis de Western blotting.

Se incubaron extractos de plantas o estándares AAD-12 (5 y 0,5 µg/ml) con buffer de muestra Laemmli a 95°C durante 10 minutos y se separaron electroforéticamente en gel Premoldeado de Tris-Glicina al 8-16%. Luego las proteínas se electro-transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa usando un protocolo estándar. Luego del bloqueo en leche descremada al 4% en PBS, se detectó la proteína AAD-12 por el antisuero anti-AAD-12 seguido de conjugados de cabra anti-conejo/HRP. La proteína detectada se visualizó por Reactivo de Análisis ECL Western de sustrato de quimioluminiscencia (Amersham, NJ).

Ejemplo 10 – Transformación del Tabaco

La transformación del tabaco con *Agrobacterium tumefaciens* se llevó a cabo mediante un método similar a los métodos publicados, pero no idéntico (Horsch *et al.*, 1988). A fin de proporcionar tejido fuente para la transformación, las semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Kentucky 160) se esterilizaron en superficie y se plantaron sobre la superficie de medio TOB, el cual es un medio de Murashige y Skoog libre de hormonas (Murashige y Skoog, 1962) solidificado con agar. Las plantas se cultivaron durante 6-8 semanas en una sala incubadora iluminada a 28-30°C, y se recogieron las hojas en forma estéril para usar en el protocolo de transformación. Se cortaron de estas hojas trozos de aproximadamente un centímetro cuadrado de manera estéril, excluyendo la vena central. Los cultivos de las cepas de *Agrobacterium* (EHA101S que contenía pDAB3278, también conocido como pDAS1580, AAD-12 (v1) + PAT), cultivadas durante la noche en un matraz sobre un equipo agitador fijo en 250 rpm a 28°C, se peletizaron en una centrífuga y se resuspendieron en sales estériles de

Murashige y Skoog, y se regularon hasta una densidad óptica final de 0,5 a 600 nm. Los trozos de hojas se sumergieron en esta suspensión bacteriana durante aproximadamente 30 segundos, luego se tiñeron y secaron sobre toallas de papel estériles y se colocaron con el lado derecho hacia arriba sobre medio TOB+ (medio de Murashige y Skoog que contenía 1 mg/L de ácido indol acético y 2,5 mg/L de benciladenina) y se incubaron en la oscuridad a 28°C. Dos días después los trozos de hojas se pasaron a medio TOB+ que contenía 250 mg/L de cefotaxima (Agri-Bio, North Miami, Florida) y 5 mg/L de glufosinato de amonio (ingrediente activo en Basta, Bayer Crop Sciences) y se incubaron a 28-30°C a la luz. Los trozos de hojas se pasaron a medio TOB+ fresco con cefotaxima y Basta dos veces por semana durante las primeras dos semanas y una vez por semana de allí en más. De cuatro a seis semanas luego de que los trozos de hojas fueran tratados con las bacterias, las pequeñas plantas que surgieron de los focos transformados fueron removidas de esta preparación de tejidos y plantadas en 250 mg/L de cefotaxima y 10 mg/L de Basta que contenían medio TOB en recipientes Phytatray™ II (Sigma). Estas plántulas fueron cultivadas en una sala incubadora iluminada. Al cabo de 3 semanas, se tomaron los cortes de tallos y se reenraizaron en el mismo medio. Las plantas estuvieron listas para ser enviadas al invernadero luego de otras 2-3 semanas.

Las plantas fueron trasladadas al invernadero lavando el agar desde las raíces, transplantándolas a tierra en macetas cuadradas de 13,75 cm, colocando la maceta dentro de una bolsa Ziploc® (SC Johnson & Son, Inc.), colocando agua corriente en el fondo de la bolsa, y ubicándolas bajo luz indirecta en un invernadero a 30°C durante una semana. Luego de 3-7 días, se abrió la bolsa; las plantas fueron fertilizadas y se las dejó crecer dentro de la bolsa abierta hasta que se aclimataron al invernadero, tras lo cual se retiró la bolsa. Las plantas fueron

cultivadas en condiciones normales de invernadero cálido (30°C, 16 horas de día, 8 horas de noche, luz natural mínima + luz complementaria = 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^1$).

Antes de la propagación, las plantas T_0 se muestrearon para un análisis de ADN a fin de determinar la cantidad de copias del inserto. El gen *PAT* que se ligó molecularmente a *AAD-12 (v1)* fue sometido a ensayo por motivos de conveniencia. Se colocó tejido fresco en tubos y se los liofilizó a 4°C durante 2 días. Luego de que el tejido estuvo completamente seco, se colocó una perla de tungsteno (Valenita) en el tubo y las muestras se sometieron a 1 minuto de molienda en seco usando un molino de perlas Kelco. Luego siguió el procedimiento de aislamiento de ADN estándar DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). A continuación una alícuota del ADN extraído se tiñó con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se leyó en el fluorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/ μl .

Las muestras de ADN se diluyeron hasta 9 ng/ μl y luego se desnaturalizaron por incubación en un termociclador a 95°C durante 10 minutos. Luego se preparó una mezcla Signal Probe usando la oligo mezcla proporcionada y MgCl_2 (Third Wave Technologies). Se colocó una alícuota de 7,5 μl en cada pocillo de la placa del ensayo Invader, seguida de una alícuota de 7,5 μl de controles, estándares, y 20 ng/ μl de muestras desconocidas diluidas. Cada cavidad se recubrió con 15 μl de aceite mineral (Sigma). Luego las placas se incubaron a 63°C durante 1,5 horas y se leyeron en el fluorómetro (Biotek). El cálculo del % de la señal sobre el antecedente para la sonda blanco dividido por el % de la señal sobre la sonda de control interna antecedente da como resultado la relación. La relación de estándares de copias conocidos desarrollada y validada con un análisis de Southern blot se usó para identificar la copia estimada de los eventos desconocidos.

También se ensayaron todos los eventos en cuanto a la presencia del gen *AAD-12 (v1)* mediante PCR utilizando las mismas muestras de ADN extraídas. Se utilizó como plantilla un total de 100 ng del total de ADN. Se utilizaron 20 mM de cada cebador con el kit Takara Ex Taq PCR Polymerase. Los cebadores para la Unidad de Transcripción de Planta (PTU) PCR *AAD-12* fueron (SdpacodF ATGGCTCA TGCTGCCCTCAGCC) (SEC ID NO:12) y (SdpacodR CGGGCAGGCCTAACTCCACC AA) (SEC ID NO:13). La reacción PCR se realizó en el termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo a las muestras hasta 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 64°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 45 segundos seguidos por 72°C durante 10 minutos. Los productos PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% teñido con EtBr. Se regeneraron y se trasladaron al invernadero cuatro a 12 linajes clonales de cada uno de los 18 eventos PCR positivos con 1-3 copias de gen PAT (y presumiblemente *AAD-12 (v1)* puesto que estos genes se encuentran físicamente unidos).

10.1 – Tolerancia a herbicida posemergencia en tabaco T_0 transformado con *AAD-12 (v1)*

Las plantas T_0 de cada uno de los 19 eventos fueron estimuladas con un amplio rango de 2,4-D, triclopir, o fluroxipir rociado sobre plantas de 7,62-10,16 centímetros (3-4 pulgadas) de altura. Las aplicaciones en forma de rocío se realizaron según lo descrito con anterioridad utilizando un rociador de hileras con un volumen de rociado de 187 L/ha. Se aplicó sal dimetilamina 2,4-D (Riverside Corp) a 0, 140, 560, o 2240 g ae/ha a clones representativos de cada evento mezclados en agua desionizada. El fluroxipir se aplicó de modo similar a 35, 140, o 560 g ae/ha. El triclopir se aplicó a 70, 280, o 1120 g ae/ha. Cada tratamiento se replicó 1-3 veces. Las clasificaciones de daños se registraron 3 y 14 DAT. Cada evento evaluado fue más tolerante a 2,4-D que la línea de control no transformada

KY160. En varios eventos, tuvo lugar una epinastia inicial relacionada con herbicidas auxínicos en dosis de 560 g ae/ha de 2,4-D o menores. Algunos eventos no presentaron lesiones en 2,4-D aplicado a 2240 g ae/ha (equivalente a 4X proporción de campo). En general, los eventos AAD-12 (v1) fueron más sensibles al fluroxipir, seguido de triclopir, y se vieron menos afectados por 2,4-D. La calidad de los eventos con respecto a la magnitud de resistencia se diferenció utilizando respuestas de plantas T0 a 560 g ae/ha de fluroxipir. Los eventos se categorizaron como "bajo" (>40% de daño 14 DAT), "medio" (20-40% de daño), "elevado" (<20% de daño). Algunos eventos no tuvieron respuestas concordantes entre las replicaciones y se los consideró "variables".

Tabla 20. Eventos T0 de tabaco transformado con pDAS1580 (AAD-12 (v1) + PAT)						
# Tubo	ID de la Planta	Copia # PAT	PTU PCR AAD12	PTU completo y Debajo de 2	PTU completo y 1 copia	Tolerancia al Herbicida Relativa *
1	1580[1]-001	6	+			No evaluada
2	1580[1]-002	8	+			No evaluada
3	1580[1]-003	10	+			No evaluada
4	1580[1]-004	1	+	*	*	Elevada
5	1580[1]-005	2	+	*		Variable
6	1580[1]-006	6	+			No evaluada
7	1580[1]-007	4	+			No evaluada
8	1580[1]-008	3	+			Variable
9	1580[1]-009	4	+			No evaluada
10	1580[1]-010	8	+			No evaluada
11	1580[1]-011	3	+			Elevada
12	1580[1]-012	12	+			No evaluada
13	1580[1]-013	13	+			No evaluada
14	1580[1]-014	4	+			No evaluada
15	1580[1]-015	2	+	*		Elevada
16	1580[1]-016	1 ?	+	*	*	Elevada
17	1580[1]-017	3	+			Elevada
18	1580[1]-018	1	+	*	*	Variable
19	1580[1]-019	1	+	*	*	Variable
20	1580[1]-020	1	+	*	*	No evaluada
21	1580[1]-021	1	+	*	*	No evaluada
22	1580[1]-022	3	+			Variable

23	1580[1]-023	1	+	*	*	Variable
24	1580[1]-024	1	+	*	*	Variable
25	1580[1]-025	5	+			No evaluada
26	1580[1]-026	3	+			Variable
27	1580[1]-027	3	+			Baja
28	1580[1]-028	4	+			No evaluada
29	1580[1]-029	3	+			Variable
30	1580[1]-030	1	+	*	*	Elevada
31	1580[1]-031	1	+	*	*	Elevada
32	1580[1]-032	2	+	*		Elevada

* La diferenciación del rendimiento de la tolerancia a herbicidas de los eventos requirió la evaluación de la tolerancia relativa cuando se trató con 560 g ae/ha de fluroxipir cuando la tolerancia fue variable a través de los eventos.

10.2 – Verificación de tolerancia alta a 2,4-D en T₁ de tabaco.

Entre dos y cuatro ejemplares T₀ que sobrevivieron a índices elevados de 2,4-D y fluroxipir se rescataron de cada evento y se les permitió autofertilizarse en el invernadero para dar origen a la semilla T₁. La semilla T₁ se estratificó, y se sembró en bandejas de selección muy similares a la de *Arabidopsis* (Ejemplo 7.4), seguido por una eliminación selectiva de nulas no transformadas en esta población segregante con 560 g ai/ha de glufosinato (selección de genes *PAT*). Los sobrevivientes se transfirieron a macetas individuales de 7,62 centímetros (3 pulgadas) en el invernadero. Estas líneas suministraron altos niveles de resistencia a 2,4-D en la generación T₀. Una consistencia de respuesta mejorada se anticipa en las plantas T₁ que no provienen de modo directo del cultivo de tejido. Estas plantas se compararon con el tabaco KY160 de tipo salvaje. Todas las plantas se rociaron usando un rociador de hileras fijo en 187 L/ha. Las plantas

se rociaron en un rango de 140-2240 g ae/ha de sal dimetilamina (DMA) 2,4-D, 70-1120 g ae/ha de triclopir o 35-560 g ae/ha de fluroxipir. Todas las aplicaciones se formularon en agua. Cada tratamiento se repitió 2-4 veces. Las plantas se evaluaron a los 3 y los 14 días luego del tratamiento. A las plantas se les asignó una clasificación de daño con respecto a atrofia, clorosis, y necrosis. La generación T_1 es segregante, por lo que se espera alguna respuesta variable debido a la diferencia en la cigosidad.

No se observó lesión alguna en una proporción de campo de 4X (2240 g ae/ha) para 2,4-D o menor. Se observaron algunos daños en tratamientos con triclopir en una línea de evento, pero el mayor daño se observó con fluroxipir. El daño con fluroxipir tuvo una corta duración y el crecimiento nuevo en un evento prácticamente no podía distinguirse del control no tratado durante 14 DAT (Tabla 21). Es importante advertir que el tabaco no transformado es excesivamente sensible al fluroxipir. Estos resultados indicaron que la tolerancia a 2,4-D de nivel comercial puede ser suministrada por *AAD-12* (v1), aún en cultivos de dicotiledóneas sensibles a las auxinas como el tabaco. Estos resultados también muestran que puede otorgarse resistencia a los herbicidas de ácido piridiloxiacético, triclopir y fluroxipir. La capacidad de prescribir tratamientos en un cultivo tolerante a herbicidas protegido por *AAD-12* con diversos ingredientes activos que tienen espectros variables de control de malezas es extremadamente útil para los agricultores.

Tabla 21. Evaluación de tolerancia cruzada de la respuesta de plantas de tabaco AAD-12 (v1) T ₁ a diversos herbicidas de fenoxi y piridiloxi auxina.			
Herbicida	KY160 – Tipo salvaje	1580(1)-004 (tolerancia alta en la generación T ₀)	1580(1)-018 (tolerancia alta en la generación T ₀)
	% Promedio de Daño de Replicaciones 14 DAT		
140 g ae/ha de 2,4-D DMA	45	0	0
560 g ae/ha de 2,4-D DMA	60	0	0
2240 g ae/ha de 2,4-D DMA	73	0	0
70 g ae/ha de triclopir	40	0	5
280 g ae/ha de triclopir	65	0	5
1120 g ae/ha de triclopir	80	0	8
35 g ae/ha de fluroxipir	85	0	8
140 g ae/ha de fluroxipir	93	0	10
560 g ae/ha de fluroxipir	100	3	18

10.3 – Heredabilidad de AAD-12 (v1) en el tabaco

Una prueba de progenie en 100 plantas también se realizó en siete líneas T1 de líneas AAD-12 (v1). Las semillas se estratificaron, se cultivaron, y se transplantaron con respecto al procedimiento descrito con anterioridad con la excepción de que las plantas nulas no se retiraron por selección Liberty. Todas las plantas luego se rociaron con 560 g ae/ha de 2,4-D DMA tal como se describió con anterioridad. Luego de 14 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Cinco de las siete líneas evaluadas segregaron como locus único, un rasgo mendeliano dominante (3R:1S) según lo determinado por análisis Chi

cuadrado. AAD-12 es heredable como un gen fuerte de resistencia a auxinas ariloxialcanoato en múltiples especies.

10.4 – Tolerancia de campo de plantas de tabaco pDAS1580 a los herbicidas 2,4-D, dicloprop, triclopir y fluroxipir.

Los ensayos de nivel de tolerancia de campo se realizaron en tres líneas AAD-12 (v1) (eventos PDAS1580-[1]-018.001, PDAS1580-[1]-004.001 y PDAS1580-[1]-020.016) y en una línea de tipo salvaje (KY160) en estaciones de campo en Indiana y Mississippi. Los trasplantes de tabaco se cultivaron en el invernadero plantando semilla T1 en superficies planas para trasplante de 72 pocillos (Hummert International) que contenían medios Metro 360 de acuerdo con las condiciones de cultivo ya indicadas. Las plantas nulas fueron eliminadas de modo selectivo mediante la selección Liberty tal como ya se ha descrito. Las plantas trasplantadas se transportaron a las estaciones de campo y se las plantó a una distancia de 35,6 o 61 cm (14 o 24 pulgadas) utilizando plantadores de vegetales industriales. Para que las plantas crecieran con vigor se utilizó riego por goteo en la localidad de Mississippi y riego aéreo en la localidad de Indiana.

El diseño experimental era un diseño de lote dividido con 4 replicaciones. El lote principal era un tratamiento con herbicida y el sublote era una línea de tabaco. Los tratamientos con herbicidas eran 2,4-D (sal dimetilamina) en 280, 560, 1120, 2240 y 4480 g ae/ha, triclopir en 840 g ae/ha, fluroxipir en 280 g ae/ha y un control sin tratamiento. Los lotes eran de una hilera por 7,5-9 metros (25-30 pies). Los tratamientos con herbicida se aplicaron 3-4 semanas luego del trasplante usando un rociador de mochila de aire comprimido con una suministrando 187 L/ha de volumen portador a una presión de 130-200 kpa. La calificación visual del daño, de la inhibición de crecimiento, y la epinastía se tomó a los 7, 14 y 21 días luego del tratamiento.

La respuesta del evento de AAD-12 (v1) a 2,4-D, triclopir, y fluroxipir se muestra en la Tabla 22. La línea de tabaco no transformada sufrió graves daños (63% a 14 DAT) por 2,4-D a 560 g ae/ha que se considera la proporción de aplicación en campo de 1X. Todas las líneas AAD-12 (v1) demostraron una tolerancia excelente al 2,4-D en 14 DAT con un daño promedio de 1, 4, y 4% de daño observado en las proporciones 2, 4 y 8X, respectivamente. La línea de tabaco no transformada sufrió un daño grave (53% a 14 DAT) por la proporción de 2X de triclopir (840 g ae/ha); mientras que, las líneas AAD-12 (v1) demostraron tolerancia con un promedio de 5% de daño en 14 DAT a través de las tres líneas. El fluroxipir en 280 g ae/ha causó un daño grave (99%) a la línea no transformada en 14 DAT. Las líneas AAD-12 (v1) demostraron una tolerancia incrementada con un promedio de 11% de daño en 14 DAT.

Estos resultados indican que las líneas de eventos transformadas AAD-12 (v1) desplegaron un alto nivel de tolerancia a 2,4-D, triclopir y fluroxipir en múltiples de las proporciones de uso comercial que fueron letales o causaron graves malformaciones epinásticas al tabaco no transformado en condiciones representativas de campo.

Tabla 22. Respuesta de plantas de tabaco AAD-12 (v1) a 2,4-D, triclopir, y fluroxipir en condiciones de campo.					
<u>Tratamiento con Herbicida</u>			<u>% Promedio de Daño a través de las ubicaciones a los 14 DAT</u>		
Ingrediente		Tipo	PDAS1580-	PDAS1580-	PDAS1580-
Activo	Proporción	salvaje	[1]-004.001	[1]-020.016	[1]-018.001
2,4-D	280 GM AE/HA	48	0	0	0
2,4-D	560 GM AE/HA	63	0	0	2
2,4-D	1120 GM AE/HA	78	1	1	2

2,4-D	2240 GM AE/HA	87	4	4	4
2,4-D	4480 GM AE/HA	92	4	4	4
Triclopir	840 GM AE/HA	53	5	5	4
Fluroxipir	280 GM AE/HA	99	11	11	12

10.5 – Protección AAD-12 (v1) contra proporciones elevadas de 2,4-D

Los resultados que muestran la protección AAD-12 (v1) contra proporciones elevadas de 2,4-D DMA en el invernadero se muestran en la Tabla 23. Plantas T₁ AAD-12 (v1) de un evento que segrega 3R:1S cuando se selecciona con 560 g ai/ha de Liberty usando el mismo protocolo según se describió con anterioridad (sic). También se plantaron semillas T₁ AAD-1 (v3) para los controles de tabaco transformado (véase PCT/US2005/014737). KY160 sin transformar también sirvió como control sensible. Las plantas se rociaron utilizando un rociador de hileras fijo en 187 L/ha a 140, 560, 2240, 8960, y 35840 g ae/ha de 2,4-D DMA y se evaluaron a los 3 y 14 DAT.

Ambos AAD-12 (v1) y AAD-1 (v3) protegieron de modo efectivo al tabaco frente al daño de 2,4-D en dosis hasta 4X las proporciones de uso comercial. Sin embargo, AAD-12 (v1), demostró claramente una marcada ventaja con respecto a AAD-1 (v3) al proteger hasta 64X las proporciones de campo estándar.

Tabla 23. Resultados que demuestran la protección brindada por AAD-12 (v1) y AAD-1 (v3) contra proporciones elevadas de 2,4-D.			
	Control KY160	AAD-1 (v3)	AAD-12 (v1)
Tratamiento	Promedio de porcentaje de daño 14 DAT		
2240 g ae/ha de 2,4-D	95	4	0
8960 g ae/ha de 2,4-D	99	9	0
35840 g ae/ha de 2,4-D	100	32	4

10.6 – Acumulación de AAD-12 a fin de incrementar el espectro del herbicida.

Ambas plantas homocigóticas AAD-12 (v1) (pDAS1580) y AAD-1 (v3) (pDAB721) (véase PCT/US2005/014737 para la última) fueron cruzadas de modo recíproco y se recogió la semilla F₁. La semilla F₁ obtenida de dos cruces recíprocos de cada gen se estratificaron y se trataron 4 réplicas de cada cruce se trataron con el mismo régimen de rociado utilizado para las otras evaluaciones con uno de los siguientes tratamientos: 70, 140, 280 g ae/ha de fluroxipir (selectivo para el gen AAD-12 (v1)); 280, 560, 1120 g ae/ha de R-Dicloroprop (selectivo para el gen AAD-1 (v3)); o 560, 1120, 2240 g ae/ha de 2,4-D DMA (para confirmar la tolerancia a 2,4-D). También se plantaron plantas T₂ homocigóticas de cada gen para usar como controles. Las plantas se calificaron en 3 y 14 DAT. Los resultados del rociado se muestran en la Tabla 24.

Los resultados confirman que AAD-12 (v1) puede acumularse con éxito con AAD-1 (v3), incrementando en consecuencia el espectro de herbicidas que se pueden aplicar al cultivo de interés (ácidos fenoxiacéticos + ácidos fenoxipropiónicos frente a ácidos penoxiacéticos (sic) + ácidos piridiloxiacéticos para AAD-1 y AAD-12, respectivamente). La naturaleza complementaria de los patrones de resistencia cruzada de los herbicidas permite el uso conveniente de estos dos genes como marcadores seleccionables de campo acumulables y complementarios. En cultivos donde la tolerancia con un gen único puede ser marginal, un experto en la técnica reconoce que se puede incrementar la tolerancia apilando un segundo gen de tolerancia para el mismo herbicida. Ello puede efectuarse usando el mismo gen con los mismos o diferentes promotores; sin embargo, según se observa aquí, el apilamiento y el rastreo de dos rasgos complementarios se puede facilitar a través de la distintiva protección cruzada

para los ácidos fenoxipropiónicos [de AAD-1 (v3)] o los ácidos piridiloxiacéticos [de AAD-12 (v1)]

Tabla 24. Comparación de la tolerancia cruzada a herbicidas auxínicos de plantas T₂ AAD-12 (v1) (pDAS1580) y AAD-1 (v3) (pDAB721) en comparación con la cruza AAD-12 X AAD-1 F1 y con el tipo salvaje.

Tratamiento	Control de tipo salvaje KY160	AAD-12 (v1) (pDAS1580)	AAD-1 (v3) (pDAB721)	AAD-12 (v1) x AAD-1 (v3) F ₁
	% Promedio de Daño 14 DAT			
560 g ae/ha de 2,4-D	63	0	0	0
1120 g ae/ha de 2,4-D	80	0	4	0
2240 g ae/ha de 2,4-D	90	0	9	0
280 g ae/ha de R-dicloroprop	25	15	0	0
560 g ae/ha de R-dicloroprop	60	50	0	0
1120 g ae/ha de R-dicloroprop	80	70	3	0
70 g ae/ha de fluroxipir	40	0	40	0
140 g ae/ha de fluroxipir	65	0	60	0
280 g ae/ha de fluroxipir	75	3	75	3

Ejemplo 11 Transformación de la Soja

La mejora de la soja mediante técnicas de transferencia de genes se ha logrado para rasgos tales como la tolerancia a herbicidas (Padgett *et al.*, 1995), modificación de aminoácidos (Falco *et al.*, 1995), y resistencia a insectos (Parrott *et al.*, 1994). La introducción de rasgos foráneos en las especies de cultivos

requiere métodos que permitirán la producción de rutina de líneas transgénicas que utilizan secuencias de marcadores seleccionables, que contienen insertos simples. Los transgenes deberían ser heredados como un locus funcional único a fin de simplificar la reproducción. Se ha informado el suministro de genes foráneos en soja cultivada mediante bombardeo de microproyectiles de ejes embrionarios cigóticos (McCabe *et al.*, 1988) o cultivos embriogénicos somáticos (Finer y McMullen, 1991), y la transformación de explantes cotiledonares mediada por *Agrobacterium* (Hinchee *et al.*, 1988) o embriones cigóticos (Chee *et al.*, 1989).

Los transformantes derivados de las transformaciones mediadas por *Agrobacterium* tienden a poseer insertos simples con un número de copia bajo (Birch, 1991). Existen beneficios y desventajas asociados con cada uno de los tres tejidos objetivo investigados respecto de la transferencia de genes en la soja, eje embrionario cigótico (Chee *et al.*, 1989; McCabe *et al.*, 1988), cotiledonar (Hinchee *et al.*, 1988) y cultivos embriogénicos somáticos (Finer y McMullen, 1991). El último ha sido investigado ampliamente como un tejido objetivo para la transferencia directa de genes. Los cultivos embriogénicos tienden a ser bastante prolíficos y se pueden mantener durante un período prolongado. Sin embargo, la esterilidad y las aberraciones cromosómicas de los transformantes primarios se han asociado con la edad de las suspensiones embriogénicas (Singh *et al.*, 1998) y así el inicio continuo de cultivos nuevos parece ser necesario para los sistemas de transformación de la soja que utilizan este tejido. Este sistema necesita un nivel alto de 2,4-D, una concentración de 40 mg/L, para iniciar el callo embriogénico y esto presenta un problema fundamental en lo referente al uso del gen *AAD-12 (v1)* dado que el locus transformado no podría desarrollarse más con 2,4-D en el medio. Por ende, la transformación basada en el meristemo es ideal para el desarrollo de plantas resistentes a 2,4-D utilizando *AAD-12 (v1)*.

11.1 Clonación de entrada de construcciones binarias

La secuencia codificadora *AAD-12 (v1)* se clonó en cinco vectores de Donante de Entrada diferentes que contenían diferentes promotores vegetales. Los casetes de expresión vegetal *AAD-12 (v1)* resultantes luego se clonaron en un vector Binario de Destino de Entrada mediante la reacción LR Clonase (Invitrogen Corporation, Carlsbad Ca, Cat # 11791-019).

Un fragmento NcoI – SacI que contenía la secuencia codificadora de *AAD-12 (v1)* se digirió de DASPICO12 y se ligó en los correspondientes sitios de restricción NcoI – SacI dentro de los siguientes vectores de Donante de Entrada: pDAB3912 (attL1 // promotor CsVMV // *AtuORF23* 3'UTR // attL2); pDAB3916 (attL1 // promotor *AtUbi10* // *AtuORF23* 3'UTR // attL2); pDAB4458 (attL1 // promotor *AtUbi3* // *AtuORF23* 3'UTR // attL2); pDAB4459 (attL1 // promotor *ZmUbi1* // *AtuORF23* 3'UTR // attL2); y pDAB4460 (attL1 // promotor *AtAct2* // *AtuORF23* 3'UTR // attL2). Las construcciones resultantes que contenían los siguientes casetes de expresión vegetal se designaron: pDAB4463 (attL1 // promotor CsVMV // *AAD-12 (v1)* // *AtuORF23* 3'UTR // attL2); pDAB4467 (attL1 // promotor *AtUbi10* // *AAD-12 (v1)* // *AtuORF23* 3'UTR // attL2); pDAB4471 (attL1 // promotor *AtUbi3* // *AAD-12 (v1)* // *AtuORF23* 3'UTR // attL2); pDAB4475 (attL1 // promotor *ZmUbi1* // *AAD-12 (v1)* // *AtuORF23* 3'UTR // attL2); y pDAB4479 (attL1 // promotor *AtAct2* // *AAD-12 (v1)* // *AtuORF23* 3'UTR // attL2). Estas construcciones se confirmaron por medio de digestión con enzimas de restricción y la determinación de secuencias.

Los casetes de expresión vegetal se recombinaron en el vector Binario de Destino de Entrada pDAB4484 (RB7 MARv3 // attR1 – ccdB – resistencia a cloranfenicol– attR2 // promotor CsVMV // *PATv6* // *AtuORF1* 3'UTR) mediante la reacción de Entrada LR Clonase. La Tecnología de Entrada usa recombinación de sitio específico basada en fago lambda en lugar de la ligasa y endonucleasa de

restricción para insertar un gen de interés dentro de un vector de expresión. Invitrogen Corporation, Gateway Technology: A Universal Technology to Clone DNA Sequences for Functional Analysis and Expression in multiple Systems, Technical Manual, Catálogo # 12535-019 y 12535-027, Gateway Technology Version E, 9/22/2003, #25-022. Las secuencias de recombinación de ADN (attL, y attR,) y la mezcla de enzima de LR Clonase permite que cualquier fragmento de ADN flanqueado por un sitio de recombinación se transfiera dentro de cualquier vector que contiene un sitio correspondiente. El sitio attL1 del vector donante se corresponde con attR1 del vector binario. De modo similar, el sitio attL2 del vector donante se corresponde con attR2 del vector binario. Mediante la Tecnología de Entrada el casete de expresión vegetal (del vector donante) que está flanqueado por los sitios attL se puede recombinar dentro de los sitios attR del vector binario. Las construcciones resultantes que contenían los siguientes casetes de expresión vegetal se rotularon como: pDAB4464 (RB7 MARv3 // promotor CsVMV // AAD-12 (v1) // AtuORF23 3'UTR // promotor CsVMV // PATv6 // AtuORF1 3'UTR); pDAB4468 (RB7 MARv3 // promotor AtUbi10 // AAD-12 (v1) // AtuORF23 3'UTR // promotor CsVMV // PATv6 // AtuORF1 3'UTR); pDAB4472 (RB7 MARv3 // promotor AtUbi3 // AAD-12 (v1) // AtuORF23 3'UTR // promotor CsVMV // PATv6 // AtuORF1 3'UTR); pDAB4476 (RB7 MARv3 // promotor ZmUbi1 // AAD-12 (v1) // AtuORF23 3'UTR // promotor CsVMV // PATv6 // AtuORF1 3'UTR); y pDAB4480 (RB7 MARv3 // promotor AtAct2 // AAD-12 (v1) // AtuORF23 3'UTR // promotor CsVMV // PATv6 // AtuORF1 3'UTR) (véase la Tabla 8). Estas construcciones se confirmaron mediante la digestión con enzimas de restricción y la determinación de secuencias.

11.2 Método de Transformación 1: transformación de nudo cotiledonar de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Los primeros informes de transformación de soja se dirigían a las células meristemáticas en la región del nudo cotiledonar (Hinchee *et al.*, 1988) y la multiplicación de brotes desde meristemos apicales (McCabe *et al.*, 1988). En el método de nudo cotiledonar en base a *A. tumefaciens*, la preparación del explantado y la composición de los medios de cultivo estimulan la proliferación de meristemos auxiliares en el nudo (Hinchee *et al.*, 1988). Sigue sin estar claro si un cultivo de callo verdaderamente desdiferenciado, pero totipotente, se inicia mediante estos tratamientos. La recuperación de clones múltiples de un evento de transformación a partir de un explantado único y la recuperación poco común de plantas quiméricas (Clemente *et al.*, 2000; Olhoft *et al.*, 2003) indican un origen celular único seguido por la multiplicación de la célula transgénica para producir ya sea un cultivo de meristemo transgénico proliferante o un brote transformado de modo uniforme que experimenta a una mayor multiplicación de brotes. El método de multiplicación de brotes de soja, originariamente basado en el bombardeo de microproyectiles (McCabe *et al.*, 1988) y, más recientemente, adaptado para la transformación mediada por *Agrobacterium* (Martinell *et al.*, 2002), aparentemente no experimenta el mismo nivel o tipo de desdiferenciación que el método del nudo cotiledonar debido a que el sistema se basa en la identificación exitosa de quimeras de línea germinal. El rango de genotipos que se han transformado a través del método del nudo cotiledonar basado en *Agrobacterium* crece firmemente (Olhoft y Somers, 2001). Este método de multiplicación de brotes y meristemo *de novo* se encuentra menos limitado a genotipos específicos. Además, este es un protocolo que no está basado en 2,4-D lo cual sería ideal para el sistema de selección de 2,4-D. En consecuencia, el método del nudo cotiledonar puede ser el método de elección para desarrollar cultivos de soja resistentes a 2,4-D. A pesar de que este método se describió ya en el año 1988 (Hinchee *et al.*, 1988), sólo muy recientemente se lo ha optimizado

para la transformación de alta frecuencia de rutina de varios genotipos de soja (Zhang *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2004).

11.2.1 – Producción de la transformación de plantas de fenotipos tolerantes a AAD-12 (v1).

Se usaron explantes derivados de semillas del protocolo de transformación de nudo cotiledonar “Maverick” y mediado por *Agrobacterium* para producir plantas transgénicas AAD-12 (v1).

11.2.2 – Preparación e inoculación de *Agrobacterium*.

Para iniciar la transformación se usó la cepa de *Agrobacterium* EHA101 (Hood *et al.* 1986), portadora de cada uno de cinco vectores binarios pDAB (Tabla 8). Cada vector binario contiene el gen AAD-12 (v1) y un casete de gen seleccionable vegetal (*PAT*) dentro de la región ADN-T. Cada gen es impulsado por los promotores listados en la Tabla 8 y estos plásmidos se movilaron dentro de la cepa EHA101 de *Agrobacterium* por electroporación. Luego las colonias seleccionadas se analizaron para la integración de genes antes del tratamiento con *Agrobacterium* de los explantes de soja. Las semillas Maverick se usaron en todos los experimentos de transformación y las semillas se obtuvieron de la Universidad de Missouri, Columbia, MO.

La transformación mediada por *Agrobacterium* de soja (*Glycine max*) mediante el gen *PAT* como marcador seleccionable acoplado con el herbicida glufosinato como agente selectivo se llevó a cabo según un procedimiento modificado de Zeng *et al.* (2004). Las semillas se germinaron en medio basal B5 (Gamborg *et al.* 1968) solidificado con 3 g/L de Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.); se agregó 1-cisteína al medio de cocultivo a 400 mg/L y el cocultivo duró 5 días (Olhoft y Somers 2001); la iniciación de brotes, la elongación de brotes, y el medio de formación de raíces se suplementaron con 50 mg/L de cefotaxima, 50 mg/L de timentina, 50 mg/L de vancomicina, y se solidificaron con 3 g/L de

Phytigel. Los brotes seleccionados luego se transfirieron al medio de formación de raíces. El esquema de selección óptimo fue el uso de glufosinato a 8 mg/L a través de la primera y la segunda etapa de iniciación de brotes en el medio y 3–4 mg/L durante la elongación de brotes en el medio.

Antes de transferir los brotes elongados (3–5 cm) al medio de formación de raíces, el extremo seccionado de los internudos se sumergió en 1 mg/L de ácido indol-3-butírico durante 1–3 min para estimular la formación de raíces (Khan et al. 1994). Los brotes echaron raíces en tubos de cultivo de vidrio de 25×100 mm que contenían medio de formación de raíces y luego se transfirieron a mezcla de suelo para la aclimatación de las plántulas en Metro-mix 200 (Hummert International, Earth City, Mo.) en cajas Magenta abiertas en Conviron. Se usó glufosinato, el ingrediente activo del herbicida Liberty (Bayer Crop Science), para la selección durante la iniciación y la elongación de los brotes. Las plántulas con raíces se aclimataron en cajas Magenta abiertas durante varias semanas antes de ser analizadas y transferidas al invernadero para la posterior aclimatación y establecimiento.

11.2.3 – Ensayo de plántulas presuntamente transformadas, y análisis para establecer plantas T_0 en el invernadero.

Las hojuelas terminales de hojas seleccionadas de estas plántulas se pintaron en las hojas con 50 mg/L de glufosinato dos veces con un intervalo de una semana para observar los resultados para analizar los posibles transformantes. Las plántulas analizadas luego se transfirieron al invernadero y después de la aclimatación las hojas se volvieron a pintar con glufosinato para confirmar el estado de tolerancia de estas plántulas en el invernadero y se consideraron posibles transformantes.

Las plantas transferidas al invernadero se pueden someter a ensayo en cuanto a la presencia de un gen *PAT* activo además con una manera no

destruictiva pintando una sección de hoja del transformante primario T_0 , o la progenie del mismo, con una solución de glufosinato [0,05-2% v/v de Herbicida Liberty, de preferencia 0,25-1,0% (v/v),=500-2000 ppm de glufosinato, Bayer Crop Science]. Dependiendo de la concentración usada, se puede hacer la evaluación del daño por glufosinato 1-7 días después del tratamiento. Las plantas también se pueden evaluar en cuanto a la tolerancia a 2,4-D en una manera no destructiva mediante la aplicación selectiva de una solución de 2,4-D en agua (0,25-1% v/v de formulación comercial de sal dimetilamina 2,4-D, de preferencia 0,5% v/v = 2280 ppm 2,4-D ae) a la hojuela terminal de los uno o dos, de preferencia dos, nudos trifoliados recién expandidas por debajo del trifoliado emergente más joven. Este ensayo permite evaluar plantas sensibles a 2,4-D 6 horas hasta varios días después de la aplicación mediante la evaluación del vuelco o rotación de la hoja >90 grados respecto del plano de las hojuelas adyacentes. Las plantas tolerantes a 2,4-D no responderán a 2,4-D. Las plantas T_0 se dejarán autofertilizar en el invernadero para dar origen a la semilla T_1 . Las plantas T_1 (y hasta el grado de que se produzcan suficientes clones de plantas T_0) se rociarán con un rango de dosis de herbicida para determinar el nivel de protección de herbicida proporcionado por los genes *AAD-12 (v1)* y *PAT* en soja transgénica. Las proporciones de 2,4-D usadas en plantas T_0 generalmente comprenderán una o dos proporciones selectivas en el rango de 100-1120 g ae/ha usando un rociador de hileras tal como se describió con anterioridad. Las plantas T_1 se tratarán con una dosis de herbicida más amplia que varía de 50-3200 g ae/ha de 2,4-D. De modo similar, las plantas T_0 y T_1 se pueden analizar en cuanto a la resistencia a glufosinato mediante el tratamiento postemergencia con 200-800 y 50-3200 g ae/ha de glufosinato, respectivamente. El gen de resistencia a glifosato (en plantas transformadas con construcciones que contienen EPSPS) u otro gen de tolerancia a glifosato se puede evaluar en la generación T_1 mediante aplicaciones

postemergencia de glifosato con un rango de dosis de 280-2240 g ae/ha de glifosato. El análisis de la expresión de proteínas tendrá lugar tal como se describe más adelante. Las plantas T_0 individuales se evaluaron en cuanto a la presencia de la región codificadora del gen de interés (*AAD-12 (v1)* o *PAT v6*) y el número de copias. La determinación de la herencia de *AAD-12 (v1)* se efectuará utilizando segregación de la progenie T_1 y T_2 respecto de la tolerancia al herbicida tal como se describió en los ejemplos anteriores.

Un subconjunto de los transformantes iniciales se evaluó en la generación T_0 de acuerdo con los métodos anteriores. Se confirmó que cualquier planta tenía la región codificadora *AAD-12 (v1)*, con independencia de si el promotor que impulsaba el gen no respondía a las pinturas de las hojas con 2,4-D mientras que sí lo hizo la soja de tipo salvaje Maverick (Tabla Sec 11.2.3). Las plantas transformadas sólo con *PAT* respondieron del mismo modo que las plantas de tipo salvaje a las aplicaciones de 2,4-D con pintura de hojas.

Se aplicó 2,4-D a un subconjunto de las plantas que eran de tamaño similar a las plantas de control de tipo salvaje o bien con 560 o 1120 g ae de 2,4-D. Todas las plantas que contenían *AAD-12 (v1)* eran claramente resistentes a la aplicación del herbicida respecto de la soja de tipo salvaje Maverick. Se observó un ligero nivel de daño (2 DAT) en dos plantas *AAD-12 (v1)*, sin embargo, el daño fue temporario y no se observó daño 7 DAT. Las plantas de control de tipo salvaje se dañaron gravemente 7-14 DAT a 560 g ae/ha de 2,4-D y murieron a 1120 g ae/ha. Estos datos concuerdan con el hecho de que *AAD-12 (v1)* puede otorgar gran tolerancia (>2X proporciones de campo) a un cultivo sensible tal como la soja. Luego se tomaron muestras de las plantas analizadas para los análisis moleculares y bioquímicos para la confirmación de la integración de genes *AAD12 (v1)*, números de copia, y sus niveles de expresión de genes tal como se describe a continuación y se informa en la Tabla 25.

Tabla 25 Respuesta de soja T₀ a la pintura de hojas con 2,4-D y a la aplicación por rocío de 2,4-D

				NUDO		Ensayo de vuelco de hoja 2,4-D a (18 HAT)												
Construcción (pDAB#)	Gen	Promotor	Evento	HOJAS PINTADAS	Nudo		POST Rocio sobre la parte superior con 2,4-D (g ae/ha)	Etapa en apl (# nudos)	ELISA (ng/mL)	Número de copia de Southern	Región codificadora PCR	% de daño 2 DAT	% de daño 7 DAT	% de daño 14 DAT				
					N-1	N-2												
4464	AAD-12	CsVMV	D-1-14		N-1	0	0	>10	5246,83	2	+	X	X	0				
4464	AAD-12	CsVMV	D-2-9		N-2	0	0	>10	204,27	1	+	X	X	0				
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-7		N-2	0	0	>10	4,65	1	+	0	0	0				
4468	AAD-12	AtUbi10	D-4-11B		N-2	0	0	8	1452,84	2	+	0	0	0				
4468	AAD-12	AtUbi10	D-4-16		N-2	0	0	>10	653,21	2	+	X	X	0				
4480	AAD-12	AtAct2	D-9-1		N-2	0	0	>10	248,33	3 o 4	+	X	X	0				
4464	AAD-12	CsVMV	D-2-14		N-2	0	560	7	4917,43	2	+	0	0	0				
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-5		N-2	0	560	8	365,75	1	+	0	0	0				
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-6		N-1	0	560	5	714,79	3	+	0	0	0				

4472	AAD-12	AtUbi3	D-5-2	N-1	0		560	6	0,58	1	+	5	0	0
4468	AAD-12	AtUbi10	D-3-9	N-2		0	1120	6	2657,26	3	+	0	0	0
4468	AAD-12	AtUbi10	D-4-17	N-2		0	1120	7	286,14	5	+	5	0	0
4499	PAT	CsVMV	D-2-3	N-2		1	0	>10	2,36	5	+	X	X	0
Maverick	WT		WT-10	NT		1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Maverick	WT		WT-2	NT		1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Maverick	WT		WT-3	NT			0	4	ND	ND	ND	0	0	0
Maverick	WT		WT-4	NT			0	4	ND	ND	ND	0	0	0
Maverick	WT		WT-5	NT			560	4	ND	ND	ND	50	60	60
Maverick	WT		WT-6	NT			560	4	ND	ND	ND	70	90	80
Maverick	WT		WT-7	NT			560	4	ND	ND	ND	70	80	80
Maverick	WT		WT-10	NT			1120	4	ND	ND	ND	70	90	100
Maverick	WT		WT-8	NT			1120	4	ND	ND	ND	70	95	100
Maverick	WT		WT-9	NT			1120	4	ND	ND	ND	70	95	100
					1=Vuelco			ND=No determinado						
					0= Sin Vuelco									

11.2.4- Análisis Moleculares: Soja

11.2.4.1 – Cosecha de tejidos para el aislamiento y cuantificación de ADN. Se coloca tejido fresco en tubos y se liofiliza a 4°C durante 2 días. Luego de secado completamente el tejido, se coloca una perla de tungsteno (Valenita) en el tubo y las muestras se someten a 1 minuto de molienda en seco usando un molino de perlas Kelco. Luego sigue el procedimiento de aislamiento de ADN estándar DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). A continuación se tiñe una alícuota del ADN extraído con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se lee en el fluorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/μl.

11.2.4.2. Reacción en cadena de polimerasa. Un total de 100 ng del ADN total se utiliza como plantilla. Se utilizan 20 mM de cada cebador con el kit Takara Ex Taq PCR Polymerase (Mirus TAKRR001A). Los cebadores para PTU AAD-12 (v1) son (Directo – ATAATGCCAGCCTGTAAACGCC) (SEC ID NO:8) e (Inverso – CTCAAGCATATGAATGACCTCGA) (SEC ID NO:9). La reacción de PCR se lleva a cabo en el termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo a las muestras a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 63°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 45 segundos seguido por 72°C durante 10 minutos. Los cebadores para la Región Codificadora PCR AAD-12 (v1) son (Directo – ATGGCTCATGCTGCCCTCAGCC) (SEC ID NO:10) e (Inverso – CGGGCAGGCCTAACTCCACCAA) (SEC ID NO:11). La reacción de PCR se lleva a cabo en el termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo a las muestras a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto y 45 segundos seguido por 72°C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se analizan mediante electroforesis sobre un gel de agarosa 1% teñido con EtBr.

11.2.4.3 – Análisis de Southern blot. El análisis de Southern blot se realiza con ADN total obtenido con un kit Qiagen DNeasy. Un total de 10 μg de ADN

genómico se somete a digestión durante la noche para obtener datos de integración. Luego de la digestión durante la noche se hace correr una alícuota de ~100 ng sobre un gel al 1% para asegurar la digestión completa. Tras asegurarse de esto las muestras se hacen correr sobre gran cantidad de gel de agarosa al 0,85% durante la noche a 40 voltios. Luego el gel se desnaturaliza en NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M durante 30 minutos. A continuación el gel se neutraliza en Tris HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,5 durante 30 minutos. Luego se coloca un aparato de gel que contiene 20x SSC para obtener una transferencia por gravedad de gel a membrana de nailon (Millipore INYC00010) durante la noche. Luego de la transferencia durante la noche la membrana se somete entonces a luz UV por medio de un entrecruzador (Stratagene UV stratalinker 1800) a 1200 X100 microjoules. La membrana se lava luego en SDS al 0,1%, 0,1 SSC durante 45 minutos. Al cabo del lavado de 45 minutos, la membrana se hornea durante 3 horas a 80°C y después se almacena a 4°C hasta la hibridación. El fragmento de plantilla de hibridación se prepara usando la región codificadora anterior PCR usando ADN del plásmido. El producto se hace correr sobre un gel de agarosa al 1% y se escinde y luego se extrae en gel mediante el procedimiento de extracción de gel Qiagen (28706). La membrana se somete entonces a una etapa de prehibridación a 60°C durante 1 hora en buffer Perfect Hyb (Sigma H7033). Se emplea el procedimiento Prime it RmT dCTP-labeling rxn (Stratagene 300392) para desarrollar la sonda con base de p32 (Perkin Elmer). La sonda se limpia usando las columnas Probe Quant. G50 (Amersham 27-5335-01). Se utilizan dos millones de recuentos CPM para hibridar los Southern blots durante la noche. Luego de la hibridación durante la noche los blots se someten entonces a dos lavados de 20 minutos a 65°C en SDS al 0,1%, 0,1 SSC. Los blots se exponen entonces a una incubación con película durante la noche a -80°C.

11.2.5 – Análisis Bioquímicos: Soja

11.2.5.1- Muestreo de Tejido y Extracción de proteína AAD-12 (v1) de hojas de soja. Se tomaron de muestra aproximadamente 50 a 100 mg de tejido de hoja de las hojas N-2 que se pintaron con 2,4-D, pero después de 1 DAT. Las hojuelas N-2 terminales se quitaron y se cortaron en trozos pequeños o en discos de hojas perforados con 2 orificios únicos (~0,5 cm de diámetro) y se congelaron sobre hielo seco al instante. Luego se completó el análisis de proteínas (análisis ELISA y Western) de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 9.

11.2.6- Evaluación de progenie T₁. Plantas T₀ se dejarán autofertilizar para derivar familias T₁. El análisis de la progenie (análisis de segregación) se someterá a ensayo usando glufosinato a 560 ai/ha como agente de selección aplicado en la etapa de crecimiento V1-V2. Las plantas sobrevivientes además se someterán a ensayo para determinar la tolerancia a 2,4-D en una o más etapas de crecimiento de V2-V6. Las semillas se producirán a través de autofertilización para permitir una más amplia evaluación del herbicida sobre la soja transgénica.

Se generaron plantas de soja Maverick transgénicas AAD-12 (v1) mediante un sistema de transformación de nudos cotiledonares mediada por *Agrobacterium*. Las plantas T₀ obtenidas toleraron hasta niveles 2x de 2,4-D en aplicaciones de campo y desarrollaron semillas fértiles. La frecuencia de las plantas de soja transgénicas fértiles alcanzó el 5,9%. La integración del gen AAD-12 (v1) en el genoma de soja se confirmó por análisis de Southern blot. Este análisis indicó que la mayor parte de las plantas transgénicas contenían baja cantidad de copias. Las plantas analizadas con anticuerpos AAD-12 (v1) fueron positivas para ELISA y la banda apropiada en el análisis Western.

11.3 Método de Transformación 2: Transformación mediada por rayo en aerosol de tejido de callo embriogénico de soja

El cultivo de tejido de callo embriogénico de soja y la posterior emisión de rayo se pueden lograr tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6.809.232 (Held *et al.*) para crear transformantes usando una o más construcciones en la Tabla 8.

11.4. Método de Transformación 3. Bombardeo biolístico de Soja.

Ello se puede lograr usando meristemos de ejes embrionarios derivados de semillas maduras (McCabe *et al.* (1988)). Siguiendo los métodos de bombardeo biolístico establecidos, se puede esperar la recuperación de plantas de soja transformadas. Una vez que las plantas son regeneradas se pueden evaluar los eventos tal como se describió en el Ejemplo 11.2.

11.5. Método de Transformación 4. Transformación mediada por barbas.

La preparación de barbas y la transformación de barbas se pueden prever de acuerdo con los métodos descritos previamente por Terakawa *et al.* (2005). Siguiendo los métodos de bombardeo biolístico establecidos, se puede esperar la recuperación de plantas de soja transformadas. Una vez regeneradas las plantas se pueden evaluar los eventos tal como se describió en el Ejemplo 11.2.

Las semillas Maverick se esterilizaron en superficie en etanol al 70% durante 1 min seguido de inmersión en hipoclorito de sodio 1% durante 20 min. y luego se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril. Las semillas se remojaron en agua destilada durante 18-20 h. Los ejes embrionarios se retiraron de las semillas, y los meristemos apicales se expusieron al extraer las hojas primarias. Los ejes embrionarios se colocaron en medio de bombardeo [BM: MS (Murashige y Skoog 1962) medio basal con sales, sacarosa 3% y phytigel Sigma 0,8%, pH 5,7] con la región apical dirigida hacia arriba en placas de cultivo de 5 cm que contienen 12 ml de medio de cultivo.

11.6. Método de Transformación 5. La transformación mediada por bombardeo de partículas de tejido de callo embriogénico se puede optimizar de

acuerdo con métodos previos (Khalafalla et al, 2005; El-Shemy et al, 2004, 2006). Las plantas regeneradas también se pueden evaluar de acuerdo con el Ejemplo 11.2.

Ejemplo 12 – AAD-12 (v1) en el Algodón

12.1 – Protocolo de transformación del algodón.

Se esterilizan en superficie semillas de algodón (genotipo Co310) en etanol al 95% durante 1 minuto, se enjuagan, se esterilizan con blanqueador comercial al 50% durante veinte minutos, y luego se enjuagan 3 veces con agua destilada estéril antes de germinarse en medio G (Tabla 26) en recipientes Magenta GA-7 y se mantienen bajo una alta intensidad de luz de 40-60 $\mu\text{E}/\text{m}^2$, con el fotoperíodo regulado en 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 28°C.

Se aíslan segmentos de cotiledón (~5 mm) cuadrados de plántulas germinadas de 7-10 días de vida en medio líquido M (Tabla 26) en placas de Petri (Nunc, artículo #0875728). Los segmentos cortados se tratan con una solución de *Agrobacterium* (durante 30 minutos) luego se transfieren a medio M semisólido (Tabla 26) y se someten a co-cultivo durante 2-3 días. Tras el cocultivo, los segmentos se transfieren a medio MG (Tabla 26). La carbenicilina es el antibiótico utilizado para destruir el *Agrobacterium* y glufosinato-amonio es el agente de selección que permitirá el crecimiento solamente de aquellas células que contengan el gen transferido.

Preparación de *Agrobacterium*. Se inoculan 35 ml de medio Y (Tabla 26) (que contiene estreptomycin (100 mg/ml de solución madre) y eritromicina (100 mg/ml de solución madre)), con un asa de bacterias para que crezcan durante la noche en la oscuridad a 28°C, mientras se agita a 150 rpm. Al día siguiente, se vierte la solución de *Agrobacterium* en un tubo oakridge estéril (Nalge-Nunc, 3139-0050), y se centrifuga en Beckman J2-21 a 8.000 rpm durante 5 minutos. Se

separa por vertido el sobrenadante y se resuspende el pelet en 25 ml de líquido M (Tabla 26) y se somete a vórtex. Se coloca una alícuota dentro de un tubo de cultivo de vidrio (Fisher, 14-961-27) para lectura Klett (Klett-Summerson, modelo 800-3). Se diluye la suspensión nueva usando medio líquido M para una toma de lecturas de medidas Klett de 10^8 unidades formadoras de colonias con un volumen total de 40 ml.

Después de tres semanas, se aísla el callo de los segmentos del cotiledón y se transfiere al medio MG nuevo. El callo se transfiere por 3 semanas adicionales a medio MG. En una comparación a la vez, el medio MG se puede suplementar con diclorprop (añadido al medio a una concentración de 0,01 y 0,05 mg/L) para suplementar la degradación de la 2,4-D, puesto que el diclorprop no es un sustrato para la enzima AAD-12, no obstante el diclorprop es más activo en el algodón que 2,4-D. En una comparación separada, los segmentos que se colocaron en placas en medio MG que no contenía regulador del crecimiento en comparación con el medio MG estándar, demostraron menos callosidad, pero aún hay desarrollo de callos. El callo se transfiere luego a medio CG (Tabla 26), y se transfiere nuevamente a medio de selección nuevo después de tres semanas. Luego de otras tres semanas el tejido del callo se transfiere a medio D (Tabla 26) que carece de reguladores del crecimiento de la planta para la inducción de callo embriogénico. Al cabo de 4-8 semanas en este medio, se forma el callo embriogénico, y se puede distinguir de los callos no embriogénicos por su color amarillento-blanco y sus células granulares. Los embriones comienzan a regenerarse poco después y son de distintos colores verdes. El algodón puede demorar en regenerarse y formar embriones, una de las formas de acelerar este proceso es tensar el tejido. La desecación es una forma común de lograrlo, a través de cambios en el micromedioambiente del tejido y la placa, usando menos

medio de cultivo y/o adoptando diversos modos de cierre de la placa (cinta frente parafilm).

Los embriones más grandes, bien desarrollados se aíslan y se transfieren a medio DK (Tabla 26) para el desarrollo embrionario. Después de 3 semanas (o cuando los embriones se han desarrollado), los embriones germinados se transfieren a medio nuevo para desarrollo de brotes y raíces. Después de 4-8 semanas, las plantas bien desarrolladas se transfieren a la tierra y se dejan crecer hasta madurar. Después de un par de meses, la planta ha crecido hasta un punto que se puede rociar para determinar si tiene resistencia a 2,4-D.

Tabla 26. Medios para la Transformación del Algodón

Ingredientes en 1 litro	G	Líquido M	M	MG	CG	D	DK	Y
Sales LS (5X)	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml			
Glucosa		30 gramos	30 gramos	30 gramos	30 gramos	20 gramos		
vit B5 modificada (1000x)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	10 ml	1 ml	
cinetina (1 mM)		1ml	1 ml	1 ml	4,6 ml		0,5 ml	
2,4-D (1 mM)		1ml	1 ml	1 ml				
Agar	8 gramos		8 gramos	8 gramos	8 gramos	8 gramos	8 gramos	
Sales DKW (D190)						1 paquete	1 paquete	
MYO-Inositol (100x)						1 ml	10 ml	
Sacarosa 3%	30 gramos						30 gramos	10 gramos
NAA								
Carbenicilina (250 mg/ml)				2 ml	0,4 ml			
GLA (10 mg/ml)				0,5 ml	0,3 ml			
Peptona								10 gramos
Extracto de Levadura								10 gramos
NaCl								5 gramos

12.2 – Transformación celular.

Se iniciaron diversos experimentos en los que se trataron segmentos de cotiledón con pDAB724 que contenía *Agrobacterium*. Más de 2000 de los segmentos resultantes se trataron usando distintas opciones de auxina para la proliferación de callo de algodón pDAB724, ya sea: 0,1 o 0,5 mg/L de R-diclorprop, concentración de 2,4-D estándar y sin tratamiento de auxina. El callo se seleccionó sobre glufosinato-amonio, debido a la inclusión del gen *PAT* en la construcción. Se utilizarán el análisis de línea de callo en la forma de PCR e Invader para determinar y asegurar si el gen estuvo presente en la etapa del callo; luego las líneas de callos que son embriogénicas se enviarán para análisis Western, esencialmente según se describió en la sección 11.2.3. El callo de algodón embriogénico se tensó usando técnicas de desecación para mejorar la calidad y cantidad del tejido recuperado.

Se han analizado casi 200 eventos de callos para PTU intacto y la expresión usando el análisis Western para el gen *AAD-12* (v1). A continuación se muestra un subconjunto de datos para algunos de los callos de algodón que se han evaluado.

Construcción	Número de Línea	AAD-12 PTU	AAD-12 Invader	AAD-12 ng/ml
pDAB724	1	+	+	79,89
pDAB724	2	+	+	17,34
pDAB724	3	+	+	544,80
pDAB724	4	+	+	32,63
pDAB724	5	+	+	82,77
pDAB724	83	+	+	795,50
pDAB724	84	+	+	613,35

pDAB724	85	+	+	1077,75
pDAB724	86	+	+	437,74
pDAB724	87	+	+	286,51
pDAB724	88	+	+	517,59
pDAB724	89	+	+	1250,70

12.3 – Regeneración de la planta.

Las líneas de algodón *AAD-12 (v1)* que han producido plantas de acuerdo con el protocolo anterior se enviarán al invernadero. Para demostrar que el gen *AAD-12 (v1)* proporciona resistencia a 2,4-D en el algodón, se rociarán tanto las plantas de algodón de tipo salvaje como las plantas de algodón *AAD-12 (v1)* con un rociador de hileras que suministra 560 g ae/ha de 2,4-D a un volumen de rociado de 187 L/ha. Las plantas se evaluarán a los 3 y 14 días después del tratamiento. Las plantas que sobrevivan a una proporción selectiva de 2,4-D se autopolinizarán para crear una semilla T₁ o se cruzarán con una línea de algodón de elite para producir una semilla F₁. La semilla subsiguiente producida se plantará y se evaluará en cuanto a su resistencia a herbicidas tal como se describió previamente. Los eventos *AAF-12(v1)* se pueden combinar con otros rasgos (sic) HT o IR según se describe en los experimentos 18, 19, 22, y 23.

Ejemplo 13 – Transformación de *Agrobacterium* de Otros Cultivos

En vista de la presente descripción, se pueden transformar cultivos adicionales de acuerdo con la presente invención usando métodos que son conocidos en la técnica. Para la transformación de centeno mediada por *Agrobacterium*, véase, p. ej., Popelka y Altpeter (2003). Para la transformación de soja mediada por *Agrobacterium*, véase, p. ej., Hinchee et al., 1988. Para la transformación de sorgo mediada por *Agrobacterium*, véase, p. ej., Zhao et al.,

2000. Para la transformación de cebada mediada por *Agrobacterium*, véase, p. ej., Tingay *et al.*, 1997. Para la transformación trigo mediada por *Agrobacterium* de, véase, p. ej., Cheng *et al.*, 1997. Para la transformación de arroz mediada por *Agrobacterium*, véase, p. ej., Hiei *et al.*, 1997.

A continuación se proporcionan los nombres en latín para estas y otras plantas. Debería estar claro que se pueden utilizar estas y otras técnicas de transformación (sin *Agrobacterium*) para transformar AAD-12 (v1), por ejemplo, en estas y otras plantas, incluyendo sin limitación Maíz (*Zea mays*), Trigo (*Triticum* spp.), Arroz (*Oryza* spp. y *Zizania* spp.), Cebada (*Hordeum* spp.), Algodón (*Abroma augusta* y *Gossypium* spp.), Soja (*Glycine max*), Remolacha y remolacha azucarera (*Beta* spp), Caña de azúcar (*Arenga pinnata*), Tomate (*Lycopersicon esculentum* y otro spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* y otro spp., y *Cyphomandra betacea*), Papa (*Solanum tuberosum*), Batata (*Ipomoea batatas*), Centeno (*Secale* spp.), Pimientos (*Capsicum annuum*, *sinense*, y *frutescens*), Lechuga (*Lactuca sativa*, *perennis*, y *pulchella*), Repollo (*Brassica* spp), Apio (*Apium graveolens*), Berenjena (*Solanum melongena*), Maní (*Arachis hypogaea*), Sorgo (todas las especies de *Sorghum*), Alfalfa (*Medicago sativa*), Zanahoria (*Daucus carota*), Porotos (*Phaseolus* spp. y otros géneros), Avenas (*Avena sativa* y *strigosa*), Arvejas (*Pisum*, *Vigna*, y *Tetragonolobus* spp.), Girasol (*Helianthus annuus*), Zapallo (*Cucurbita* spp.), Pepino (*Cucumis sativa*), Tabaco (*Nicotiana* spp.), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), Césped (*Lolium*, *Agrostis*, *Poa*, *Cynodon*, y otros géneros), Trébol (*Tifolium*), Veza (*Vicia*). Dichos vegetales, con genes AAD-12 (v1), por ejemplo, se incluyen en la presente invención

AAD-12 (v1) tiene el potencial de aumentar la aplicabilidad de herbicidas auxínicos claves para uso estacional en muchos sistemas de cultivo de madera perenne y caducifolia. Las especies de madera resistentes a triclopir, 2,4-D, y/o fluroxipir aumentarían la flexibilidad del uso sobre la parte superior de estos

herbicidas sin preocupaciones por los daños. Estas especies incluirían, aunque sin limitarse a: Aliso (*Alnus spp.*), fresno (*Fraxinus spp.*), especies de álamo temblón y álamo (*Populus spp.*), haya (*Fagus spp.*), abedul (*Betula spp.*), cerezo (*Prunus spp.*), eucalipto (*Eucalyptus spp.*), nogal americano (*Carya spp.*), arce (*Acer spp.*), roble (*Quercus spp.*), y pino (*Pinus spp.*). El uso de resistencia a auxina para el control selectivo de malezas en especies ornamentales y frutales está también dentro del alcance de esta invención. Los ejemplos podrían incluir, aunque sin limitarse a, rosa (*Rosa spp.*), arbusto quemado (*Euonymus spp.*), petunia (*Petunia spp.*), begonia (*Begonia spp.*), rododendro (*Rhododendron spp.*), manzano silvestre o manzano (*Malus spp.*), pera (*Pyrus spp.*), durazno (*Prunus spp.*), y caléndula (*Tagetes spp.*).

Ejemplo 14 – Evidencias Adicionales de Resultados Sorprendentes: AAD-12 frente a AAD-2

14.1 – Clonación inicial de AAD-2 (v1).

Se identificó otro gen de la base de datos NCBI (véase el sitio web ncbi.nlm.nih.gov; acceso # AP005940) como un homólogo con solamente un 44% de identidad de aminoácido a *tfdA*. En la presente se hace referencia a este gen como AAD-2 (v1) por coherencia. El porcentaje de identidad se determinó traduciendo primero ambas secuencias de ADN AAD-2 y *tfdA* DNA (SEC ID NO:12 de PCT/US2005/014737 y No. de Acceso de GENBANK M16730, respectivamente) a las proteínas (SEC ID NO:13 de PCT/US2005/014737 y No. de Acceso de GENBANK M16730, respectivamente), luego usando ClustalW en el paquete de software VectorNTI para efectuar el alineamiento de secuencia múltiple.

La cepa de *Bradyrhizobium japonicum* que contiene el gen AAD-2 (v1) se obtuvo de Northern Regional Research Laboratory (NRRL, cepa #B4450). La cepa liofilizada se reavivó de acuerdo con el protocolo NRRL y se almacenó a -80°C en glicerol al 20% para uso interno como la cepa Dow Bacterial DB 663. De esta solución madre congelada, se marcó luego una placa de Agar de Soja Tríplica con un asa de células para el aislamiento, y se incubó a 28°C durante 3 días. Se utilizó una sola colonia para inocular 100 ml de Caldo de Soja Tríplico en un matraz de tres bocas de 500 ml, que se incubó durante la noche a 28°C en un agitador de piso a 150 rpm. A partir de esto, se aisló el ADN total con el protocolo gram negativo del kit DNeasy de Qiagen (Qiagen cat. #69504). Se designaron los siguientes cebadores para amplificar el gen diana a partir de ADN genómico, Directo: 5' ACT AGT AAC AAA GAA GGA GAT ATA CCA TGA CGA T 3' [(brjap 5'(speI) SEC ID NO:14 de PCT/US2005/014737 (sitio de restricción Spe I y Sitio de Unión al Ribosoma (RBS) agregados)] e Inverso: 5' TTC TCG AGC TAT CAC TCC GCC GCC TGC TGC TGC 3' [(br jap 3' (xhoI) SEC ID NO:15 de PCT/US2005/014737 (sitio Xho I agregado)].

Se establecieron reacciones de cincuenta microlitros de la siguiente manera: Tampón Fail Safe 25 µl, cada cebador 1 µl (50 ng/µl), ADNg 1 µl (200 ng/µl), H₂O 21 µl, Taq polimerasa 1 µl (2,5 unidades/µl). Se usaron tres Tampones Fail Safe—A, B, y C—en tres reacciones separadas. Luego se llevó a cabo la PCR bajo las siguientes condiciones: 95°C 3,0 minutos de ciclo de desnaturalización por calor; 95°C 1,0 minuto, 50°C 1,0 minuto, 72°C 1,5 minutos, durante 30 ciclos; seguidos de un ciclo final de 72°C 5 minutos, usando el Sistema de PCR FailSafe (Epicenter cat. #FS99100). El producto PCR de ~1 kb resultante se clonó en pCR 2.1 (Invitrogen cat. #K4550-40) siguiendo el protocolo incluido, con TOP10F' *E. coli* químicamente competente como la cepa hospedante, para la verificación de secuencias nucleotídicas.

Diez de las colonias blancas resultantes se recogieron en 3 µl de Caldo Luria + 1000 µg/ml de Ampicilina (LB Amp), y se cultivaron durante la noche a 37°C con agitación. Los plásmidos se purificaron a partir de cada cultivo usando el Kit Nucleospin Plus Plasmid Miniprep (BD Biosciences cat. #K3063-2) y siguiendo el protocolo incluido. La digestión de restricción de los ADN aislados se completó para confirmar la presencia del producto PCR en el vector pCR2.1. El ADN plásmido se digirió con la enzima de restricción EcoRI (New England Biolabs cat. #R0101S). La secuenciación se llevó a cabo con el Kit Beckman CEQ Quick Start (Beckman Coulter cat. #608120) usando cebadores M13 Directo [5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'] (SEC ID NO:6) e Inverso [5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'] (SEC ID NO:7), según las instrucciones de los fabricantes. A esta secuencia génica y su proteína correspondiente se les proporcionó una nueva designación general *AAD-2 (v1)* por coherencia interna.

14.2 – Terminación del vector binario *AAD-2 (v1)*.

El gen *AAD-2 (v1)* se amplificó por PCR a partir de pDAB3202. Durante la reacción PCR se efectuaron alteraciones dentro de los cebadores para introducir los sitios de restricción AflIII y SacI en el cebador 5' y el cebador 3', respectivamente. Véase PCT/US2005/014737. Los cebadores "NcoI of Brady" [5' TAT ACC ACA TGT CGA TCG CCA TCC GGC AGC TT 3'] (SEC ID NO:14) y "SacI of Brady" [5' GAG CTC CTA TCA CTC CGC CGC CTG CTG CTG CAC 3'] (SEC ID NO:15) se utilizaron para amplificar un fragmento de ADN usando el Sistema PCR Fail Safe (Epicentre). El producto PCR se clonó en el vector de clonación pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen) y se verificó la secuencia con cebadores M13 Directo y M13 Inverso utilizando los reactivos de secuenciación "Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit" de Beckman Coulter. Los datos de las secuencias identificaron un clon con la secuencia correcta (pDAB716). El fragmento de gen AflIII/SacI *AAD-2 (v1)* luego se clonó en el vector NcoI/SacI

pDAB726. La construcción resultante (pDAB717); promotor AtUbi10: Nt OSM 5'UTR: AAD-2 (v1): Nt OSM3'UTR: ORF1 poliA 3'UTR se verificó con digestos de restricción (con NcoI/SacI). Esta construcción se clonó en el pDAB3038 binario como un fragmento NotI – NotI ADN. La construcción resultante (pDAB767); promotor AtUbi10: Nt OSM5'UTR: AAD-2 (v1): Nt OSM 3'UTR: ORF1 poliA 3'UTR: promotor CsVMV: PAT: ORF25/26 3'UTR se digirió por restricción (con NotI, EcoRI, HindIII, NcoI, PvuII, y SalI) para la verificación de la orientación correcta. La construcción completada (pDAB767) se utilizó luego para la transformación en *Agrobacterium*.

14.3 – Evaluación de *Arabidopsis* transformado.

Se plantaron semillas T₁ recién cosechadas transformadas con un gen AAD-2 (v1) nativo o AAD-12 (v1) optimizado para la planta y se seleccionaron para la resistencia a glufosinato como se describió previamente. Luego las plantas se asignaron aleatoriamente a diversas proporciones de 2,4-D (50-3200 g ae/ha). Las aplicaciones de herbicida se aplicaron mediante un rociador de hileras en un volumen de rociado de 187 L/ha. La 2,4-D utilizada fue la formulación de sal dimetilamina comercial (456 g ae/L, NuFarm, St Joseph, MO) mezclada en tampón Tris 200 mM (pH 9,0) o tampón HEPES 200 mM (pH 7,5).

AAD-12 (v1) y AAD-2 (v1) proporcionaron resistencia a 2,4-D detectable frente a las líneas de control transformadas y no transformadas; no obstante, las construcciones individuales fueron ampliamente variables en su capacidad para otorgar resistencia a 2,4-D a plantas de T₁ *Arabidopsis* individuales. Sorprendentemente, los transformantes AAD-2 (v1) y AAD-2 (v2) fueron mucho menos resistentes a 2,4-D que el gen AAD-12 (v1), ambos de una frecuencia de plantas altamente tolerantes así como también a daños promedio totales. Ninguna de las plantas transformadas con AAD-2 (v1) sobrevivió a 200 g ae/ha de 2,4-D relativamente sin daños (<20% de daño visual), y el daño total a la población fue

de aproximadamente 83% (véase PCT/US2005/014737). En cambio, AAD-12 (v1) tuvo un daño promedio a la población de aproximadamente 6% cuando se trató con 3.200 g ae/ha de 2,4-D (Tabla 11). La tolerancia mejoró levemente para AAD-2 (v2) optimizado para la planta frente al gen negativo; no obstante, la comparación de ambos genes AAD-12 y AAD-2 optimizados para la planta indica una ventaja significativa para AAD-12 (v1) *in planta*.

Estos resultados son inesperados dado que la comparación *in vitro* de AAD-2 (v1) (véase PCT/US2005/014737) y AAD-12 (v2) indicó que ambos fueron altamente eficaces para degradar 2,4-D y ambos compartieron una especificidad de tipo S con respecto a los sustratos de ariloxialcanoato quirales. AAD-2 (v1) se expresa en plantas T₁ individuales a niveles variables; no obstante, se proporciona poca protección del daño por 2,4-D mediante la esta proteína expresada. No fue evidente ninguna diferencia sustancial en el nivel de expresión de la proteína (*in planta*) para los genes AAD-2 nativos y optimizados para la planta (véase PCT/US2005/014737). Estos datos corroboran hallazgos previos que hacen que la expresión funcional de AAD-12 (v1) *in planta*, y la resistencia herbicida a 2,4-D y herbicidas de piridiloxiacetato resultantes sean inesperadas.

Ejemplo 15 – Aplicaciones de Quemado Previo a la Siembra

Éste y los Ejemplos siguientes son ejemplos específicos de usos de nuevos herbicidas que se tornan posibles mediante la presente invención de AAD-12.

Las aplicaciones de herbicida de quemado previo a la siembra tienen como fin destruir malezas que han surgido durante el invierno o el comienzo de la primavera antes de la plantación de un determinado cultivo. Típicamente estas aplicaciones se aplican en sistemas de manejo sin labranza o con poca labranza donde la eliminación física de las malezas no se completa antes de la plantación. Un programa herbicida, en consecuencia, debe controlar un muy amplio espectro

de malezas de hojas anchas y gramíneas presentes al momento de la plantación. El glifosato, gramoxona, y glufosinato son ejemplos de herbicidas no selectivos, no residuales ampliamente utilizados para aplicaciones de herbicida de quemado previo a la siembra. Algunas malezas, sin embargo, son difíciles de controlar en este momento de la estación debido a uno o más de los siguientes: insensibilidad inherente del biotipo o las especies de malezas al herbicida, tamaño relativamente grande de malezas anuales de invierno, y condiciones climáticas frescas que limitan la actividad y aceptación del herbicida. Se encuentran disponibles varias opciones de herbicidas para mezclas en tanque con estos herbicidas para aumentar el espectro y la actividad en malezas donde los herbicidas no selectivos son débiles. Un ejemplo sería las aplicaciones de mezclas en tanque de 2,4-D con glifosato para ayudar a controlar la *Conyza canadensis* (erigeron del Canadá). El glifosato se puede usar entre 420 y 1680 g ae/ha, más típicamente 560 a 840 g ae/ha, para el control de quemado previo a la siembra de la mayoría de las malezas presentes; sin embargo, se pueden aplicar 280 – 1120 g ae/ha de 2,4-D para auxiliar en el control de las muchas especies de malezas de hojas anchas (*por ejemplo*, erigeron del Canadá). 2,4-D es un herbicida de elección porque es efectivo en un amplia rango de malezas de hojas anchas, efectivo incluso a bajas temperaturas, y extremadamente económico. No obstante, si el cultivo subsiguiente es un cultivo de dicotiledónea sensible, los residuos de 2,4-D en la tierra (si bien de vida corta) pueden impactar negativamente el cultivo. La soja es un cultivo sensible y requiere un período de tiempo mínimo de 7 días (para una proporción de 280 g ae/ha de 2,4-D) hasta al menos 30 días (para aplicaciones de 2,4-D de 1120 g ae/ha) para tener lugar entre aplicaciones de quemado y siembra. 2,4-D está prohibido como tratamiento de quemado previo a la siembra de algodón (véase las etiquetas federales, la mayoría está disponibles en CPR, 2003 o en internet ingresando a cdms.net/manuf/manuf.asp). Con el algodón o la

soja transformados con *AAD-12 (v1)*, estos cultivos deben ser capaces de sobrevivir a residuos de 2,4-D en la tierra a partir de aplicaciones de quemado efectuadas justo hasta e incluso después de la plantación antes de la emergencia del cultivo. El aumento de la flexibilidad y la reducción del costo de los compañeros de mezcla en tanque (o premezcla comercial) mejorará las opciones de control de malezas y aumentará la fuerza de las aplicaciones de quemado en importantes situaciones sin labranza y con poca labranza. Este ejemplo es una de las muchas opciones que estarán disponibles. Aquéllos con experiencia en la técnica de control de malezas notarán una diversidad de otras aplicaciones que incluyen, aunque sin limitarse a gramoxona + 2,4-D o glufosinato + 2,4-D utilizando los productos descritos en las etiquetas herbicidas federales (CPR, 2003) y los usos descritos en Agrilience Crop Protection Guide (2005), como ejemplos. Las personas con experiencia en la técnica también reconocerán que el ejemplo anterior se puede aplicar a cualquier cultivo sensible a 2,4-D (u otro herbicida de fenoxi auxina) que estaría protegido por el gen *AAD-12 (v1)* si estuviese transformado de modo establemente. Asimismo, los únicos atributos de *AAD-12* que permiten la degradación de triclopir y fluroxipir aumentan la utilidad permitiendo la sustitución o las mezclas en tanque de 70-1120 o 35-560 g ae/ha de triclopir y fluroxipir, respectivamente, para aumentar los espectros y/o aumentar la capacidad para controlar las especies de malezas en viñedos o perennes.

Ejemplo 16 – Uso en Cultivos de Herbicidas de Fenoxi Auxinas en Soja, Algodón, y Otros Cultivos de Dicotiledóneas Transformados Únicamente con *AAD-12 (v1)*

AAD-12 (v1) puede posibilitar el uso de herbicidas de fenoxi auxina (p. ej., 2,4-D y MCPA) y de piridiloxi auxinas (triclopir y fluroxipir) para el control de un amplio espectro de malezas de hojas anchas directamente en cultivos

normalmente sensibles a 2,4-D. La aplicación de 2,4-D a 280 hasta 2240 g ae/ha controlaría la mayoría de las especies de malezas de hojas anchas presentes en medioambientes agrónomos. Más típicamente, se utilizan 560 – 1120 g ae/ha. Para el triclopir, las proporciones de aplicación tendrían típicamente un rango desde 70-1120 g ae/ha, más típicamente 140-420 g ae/ha. Para el fluroxipir, las proporciones de aplicación tendrían típicamente un rango desde 35-560 g ae/ha, más típicamente de 70-280 ae/ha.

Una ventaja para esta herramienta adicional es el costo extremadamente bajo del componente herbicida para hojas anchas y el control potencial de malezas residuales de vida corta provisto por mayores proporciones de 2,4-D, triclopir, y fluroxipir cuando se utilizan a proporciones más elevadas, mientras que un herbicida no residual como el glifosato no proporcionaría el control de malezas que germinan luego. Esta herramienta también provee un mecanismo para combinar los modos de acción herbicida con la conveniencia de HTC como una resistencia a herbicida integrada y una estrategia de manejo del desplazamiento de malezas.

Otra ventaja adicional que provee esta herramienta es la capacidad para mezclar en tanque herbicidas de control de malezas de hojas anchas de amplio espectro (por ejemplo 2,4-D, triclopir y fluroxipir) con herbicidas de control de malezas residuales de uso común. Estos herbicidas generalmente se aplican antes o durante la siembra, pero a menudo son menos efectivos con malezas emergidas, establecidas que pueden existir en el campo antes de la siembra. Al extender la utilidad de estos herbicidas de ariloxi auxina para incluir aplicaciones en la siembra, de preemergencia o antes de la siembra, aumenta la flexibilidad de los programas de control de malezas residuales. Un experto en la técnica reconocería que el programa de herbicida residual diferiría sobre la base del cultivo de interés, pero que los programas típicos incluirían herbicidas de las

familias de herbicidas de cloracetamida y dinitroanilina, pero también que incluirían herbicidas tales como clomazona, sulfentrazona, y una variedad de herbicidas inhibidores de ALS, inhibidores de PPO, e inhibidores de HPPD.

Otros beneficios podrían incluir la tolerancia a 2,4-D, triclopir o fluroxipir requerida antes de la siembra luego de la aplicación de herbicidas de auxina de ácido ariloxiacético (véase el ejemplo previo); y la menor cantidad de problemas a partir del daño por contaminación a cultivos de dicotiledóneas que resultan de tanques a granel lavados en forma incompleta que habían contenido 2,4-D, triclopir o fluroxipir. Aún se pueden utilizar dicamba (y muchos otros herbicidas) para el control subsiguiente de voluntarios de cultivos de dicotiledóneas transformados con *AAD-12 (v1)*.

Aquéllos con experiencia en la técnica también reconocerán que el ejemplo previo se puede aplicar a cualquier cultivo sensible a 2,4-D (u otro herbicida de ariloxi auxina) que estaría protegido por el gen *AAD-12 (v1)* si estuviera transformado de modo estable. La persona con experiencia en la técnica de control de malezas reconocerá ahora que el uso de diversos herbicidas de fenoxi o piridiloxi auxina comerciales solos o en combinación con un herbicida es posible mediante la transformación de *AAD-12 (v1)*. Las proporciones específicas de otros herbicidas que representan estos productos químicos se pueden determinar por las marcas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar o en cualquier referencia comercial o académica a la protección de cultivos tal como la Crop Protection Guide de Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo facultado para utilizar en HTC's mediante *AAD-12 (v1)*, ya sea que se use solo, mezclado en tanques, o de modo secuencial, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 17 – Uso en Cultivos de Herbicidas de Fenoxi Auxina y Piridiloxi Auxina en Maíz, Arroz y Otras Especies Monocotiledóneas Transformadas Sólo por AAD-12 (v1)

De modo análogo, la transformación de especies gramíneas (tales como, pero sin limitarse a, el maíz, el arroz, el trigo, la cebada, o los pastos forrajeros y el césped) con AAD-12 (v1) permitiría el uso de fenoxi y piridiloxi auxinas altamente eficaces en cultivos donde normalmente la selectividad no es segura. La mayoría de las especies gramíneas poseen una tolerancia natural a los herbicidas auxínicos tales como las fenoxi auxinas (es decir, 2,4-D). Sin embargo, un nivel relativamente bajo de selectividad de cultivos ha resultado en una utilidad disminuida en estos cultivos debido a una ventana acortada de tiempo de aplicación o a un riesgo de daño inaceptable. Los cultivos monocotiledóneos transformados por AAD-12 (v1) permitirían, en consecuencia, hacer posible el uso de una combinación de tratamientos similar a la descrita para los cultivos dicotiledóneos tales como la aplicación de 2,4-D a 280 hasta 2240 g ae/ha a fin de controlar la mayoría de las especies de maleza de hojas anchas. Más comúnmente, se utiliza 560 – 1120 g ae/ha. Para el triclopir, las proporciones de aplicación variarían por lo común entre 70-1120 g ae/ha, más comúnmente 140-420 g ae/ha. Para el fluroxipir, las proporciones de aplicación variarían por lo común entre 35-560 g ae/ha, más comúnmente 70-280 ae/ha.

Una ventaja de esta herramienta adicional es el extremado bajo costo del componente herbicida de hojas anchas y el potencial control de malezas residuales de duración corta brindado por proporciones más elevadas de 2,4-D, triclopir, o fluroxipir. Por el contrario, un herbicida no residual como el glifosato no brindaría un control de malezas que germinan más tarde. Esta herramienta también brindaría un mecanismo para rotar los modos de acción de los herbicidas con la conveniencia de HTC como estrategia integrada de manejo del

desplazamiento de maleza y de resistencia a herbicida en una estrategia de combinación de cultivo tolerante al glifosato/AAD-12 (v1) HTC, ya sea que se rote las especies de cultivos o no.

Otra ventaja que provee esta herramienta es la capacidad para mezclar en tanques herbicidas de control de malezas de hojas anchas de amplio espectro (por ejemplo 2,4-D, triclopir y fluroxipir) con herbicidas control de malezas residuales de uso común. En general estos herbicidas generalmente se aplican antes o durante la siembra, pero a menudo son menos efectivos con malezas surgidas, establecidas que pueden existir en el campo antes de la siembra. Al extender la utilidad de estos herbicidas de ariloxi auxina para incluir aplicaciones en la siembra, preemergencia, o antes de la siembra, aumenta la flexibilidad de los programas de control de malezas residuales. Un experto en la técnica reconocería que el programa de herbicida residual diferirá sobre la base del cultivo de interés, pero los programas típicos incluirían herbicidas de las familias de herbicidas de cloracetamida y dinitroanilina, pero también incluyendo herbicidas tales como clomazona, sulfentrazona, y una variedad de herbicidas inhibidores de ALS, inhibidores de PPO, e inhibidores de HPPD

La mayor tolerancia del maíz, arroz, y de otras monocotiledóneas a las fenoxi o piridiloxi auxinas permitirá el uso de estos herbicidas en cultivos sin las restricciones de la etapa de crecimiento o el potencial de inclinación del cultivo, fenómenos extendidos tales como la "formación de cola de rata", la inclinación de los cultivos, la fragilidad del tallo inducida por el regulador del crecimiento en el maíz, o las raíces de sostén deformes. Cada herbicida alternativo facultado para su uso en HTCs mediante AAD-12 (v1), ya sea que se lo utilice solo, mezclado en tanque, o de modo secuencial, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 18 – AAD-12 (v1) Agrupada con Rasgos de Tolerancia a Glifosato en Cualquier Cultivo

La gran mayoría de acres de algodón, canola, maíz, y soja plantados en América del Norte contienen un rasgo de tolerancia a glifosato (TG), y la adopción de maíz TG va en aumento. Se han estado desarrollando cultivos de TG adicionales (*por ejemplo*, trigo, arroz, remolacha azucarera, y césped) pero no se han lanzado comercialmente hasta la fecha. Muchas otras especies resistentes a glifosato se encuentran en etapa experimental hasta de desarrollo (por ejemplo, alfalfa, caña de azúcar, girasol, remolachas, arvejas, zanahoria, pepino, lechuga, cebolla, frutilla, tomate, y tabaco; especies forestales como el álamo y liquidámbar; y especies hortícolas como caléndula, petunia, y begonias; isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005 en el Sitio Web Mundial). Los GTC's constituyen herramientas valiosas para la simple respiración de las malezas controladas y la conveniencia y efectividad en cuanto al costo provistas por este sistema. Sin embargo, la utilidad del glifosato como tratamiento base ahora convencional consiste en la selección de malezas resistentes al glifosato. Además, las malezas en las que el glifosato es inherentemente menos eficaz están cambiando a las especies predominantes en los campos en los que se están practicando programas químicos solamente con glifosato. Al agrupar AAD-12 (v1) con un rasgo de TG, ya sea mediante reproducción convencional o conjuntamente como un evento de transformación nuevo, podría mejorarse la eficacia en el control de malezas, la flexibilidad, y la capacidad para manejar los desplazamientos de malezas y el desarrollo de resistencia a herbicidas. Tal como se mencionó en los ejemplos previos, mediante la transformación de los cultivos con AAD-12 (v1), los cultivos de monocotiledóneas tendrán un margen superior de seguridad de fenoxi o piridiloxi auxina, y las fenoxi auxinas se pueden aplicar de modo selectivo en los cultivos de dicotiledóneas. Pueden preverse diversos

argumentos para las opciones de control mejorado de malezas donde AAD-12 (v1) y un rasgo de GT se agrupan en cualquier especie de cultivos de monocotiledóneas o dicotiledóneas:

a) El glifosato se puede aplicar en una proporción de aplicación postemergente estándar (420 a 2160 g ae/ha, con preferencia 560 a 840 g ae/ha) para el control de la mayoría de las especies de gramíneas y malezas de hojas anchas. Para el control de malezas de hojas anchas resistentes a glifosato como *Conyza canadensis* o las malezas que son inherentemente difíciles de controlar con glifosato (por ejemplo, *Commelina* spp, *Ipomoea* spp, etc), se pueden aplicar 280-2240 g ae/ha (con preferencia 560-1120 g ae/ha) de 2,4-D, de modo secuencial, mezclados en tanques, o como una premezcla con glifosato para proporcionar un control efectivo. Para el triclopir, las proporciones de aplicación generalmente oscilarían entre 70-1120 g ae/ha, más generalmente de 140-420 g ae/ha. Para el fluroxipir, las proporciones de aplicación generalmente oscilarían entre 35-560 g ae/ha, más generalmente 70-280 ae/ha.

b) Actualmente, las proporciones de glifosato aplicadas en GTC's generalmente oscilan entre 560 y 2240 g ae/ha por sincronización de aplicación. El glifosato es mucho más eficaz en las especies de gramíneas que en las especies de malezas de hojas anchas. Los rasgos agrupados de AAD-12 (v1) + GT permitirían proporciones de glifosato efectivas para el pasto (105-840 g ae/ha, de mayor preferencia 210-420 g ae/ha). Luego podría aplicarse 2,4-D (a 280-2240 g ae/ha, de mayor preferencia 560-1120 g ae/ha) de modo secuencial, mezclado en tanques, o como una premezcla con proporciones de glifosato efectivas para el pasto a fin de proveer el control necesario de malezas de hojas anchas. El tricopir (sic) y el fluroxipir en las proporciones mencionadas precedentemente serían componentes aceptables en el régimen de tratamiento. La baja proporción de

glifosato también proveería algún beneficio para el control de malezas de hojas anchas; sin embargo, el control primordial sería de 2,4-D, triclopir, o fluroxipir.

Un experto en la técnica de control de malezas reconocerá que el uso de uno o más herbicidas de ariloxi auxina comerciales solos o en combinación (en forma secuencial o en forma independiente) es posibilitado por la transformación con *AAD-12 (v1)* en los cultivos. Las proporciones específicas de otros herbicidas que representan estos productos químicos se pueden determinar por las marcas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, las marcas compiladas en internet (*por ejemplo*, cdms.net/manuf/manuf.asp), o en cualquier guía comercial o académica de protección de cultivos tal como la Crop Protection Guide de Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo facultado para utilizar en HTC's mediante *AAD-12 (v1)*, ya sea que se use solo, mezclado en tanques, o de modo secuencial, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 19 - *AAD-12 (v1)* Agrupada con Rasgos de Tolerancia a Glufosinato en Cualquier Cultivo

La tolerancia a glufosinato (*PAT* o *bar*) se encuentra actualmente presente en una cantidad de cultivos plantados en América del Norte ya sea como marcador seleccionable para un rasgo de ingreso como proteínas de resistencia a insectos o específicamente como un rasgo de HTC. Los cultivos incluyen, pero sin limitación, canola, maíz, y algodón tolerantes a glufosinato. Otros cultivos adicionales tolerantes a glufosinato (*por ejemplo*, arroz, remolacha azucarera, soja, y césped) se han estado desarrollando pero no han sido lanzados comercialmente hasta el momento. El glufosinato, como el glifosato, es un herbicida relativamente no selectivo, de amplio espectro en gramíneas y hojas anchas. El modo de acción del glufosinato difiere de aquél del glifosato. Su

actuación más rápida, resulta en el desecamiento y “quema” de las hojas tratadas 24-48 horas luego de la aplicación del herbicida. Ello es ventajoso para la aparición de un control rápido de malezas. Sin embargo, ello también limita la translocación del glufosinato a regiones meristemáticas de las plantas objetivo resultando en un control de malezas más débil según se evidencia por las evaluaciones del desempeño del control de malezas relativo de los dos compuestos en muchas especies (Agrilience, 2005).

Al agrupar AAD-12 (v1) con un rasgo de tolerancia a glufosinato, ya sea a través de reproducción convencional o conjuntamente como un evento de transformación nuevo, se podría mejorar la eficacia del control de malezas, la flexibilidad, y la capacidad para manejar los desplazamientos de malezas y el desarrollo de resistencia a herbicidas. Pueden preverse diversos argumentos para las opciones de control mejorado de malezas donde AAD-12 (v1) y un rasgo de tolerancia a glufosinato se agrupan en cualquier especie de cultivos de monocotiledóneas o dicotiledóneas:

a) El glufosinato se puede aplicar en una proporción de aplicación postemergente estándar (200 a 1700 g ae/ha, con preferencia 350 a 500 g ae/ha) para el control de muchas especies de gramíneas y malezas de hojas anchas. Hasta la fecha, no se ha confirmado ninguna maleza resistente a glufosinato; sin embargo, el glufosinato posee una mayor cantidad de malezas que son inherentemente más tolerantes que el glifosato.

i) Las especies de malezas de hojas anchas inherentemente tolerantes (por ejemplo, *Cirsium arvensis*, *Apocynum cannabinum*, y *Conyza canadensis*) podrían controlarse mediante una mezcla en tanque de 280-2240 g ae/ha, de mayor preferencia 560-2240 g ae/ha, de 2,4-D para el control efectivo de estas especies perennes más difíciles de controlar y para mejorar la fuerza del control en las especies de malezas de hojas anchas anuales. El triclopir y el

fluroxipir serían componentes aceptables para considerar en el régimen de control de malezas. Para el triclopir, las proporciones de aplicación oscilarían generalmente entre 70-1120 g ae/ha, más generalmente de 140-420 g ae/ha. Para el fluroxipir, las proporciones de aplicación oscilarían generalmente entre 35-560 g ae/ha, más generalmente 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 enumeradas precedentemente), por ejemplo, podría proveer un espectro de control de malezas superpuesto, más fuerte. Adicionalmente, el espectro superpuesto provee un mecanismo adicional para el manejo o retraso de malezas resistentes a herbicidas.

Un experto en la técnica de control de malezas reconocerá que el uso de uno o más herbicidas de auxina ariloxiacética comerciales solos o en combinación (en forma secuencial o en forma independiente) es posibilitado por la transformación con *AAD-12 (v1)* en los cultivos. Las proporciones específicas de otros herbicidas que representan estos productos químicos se pueden determinar por las marcas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, las marcas compiladas en internet (*por ejemplo*, cdms.net/manuf/manuf.asp), o en cualquier guía comercial o académica de protección de cultivos tal como la Crop Protection Guide de Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo facultado para utilizar en HTC's mediante *AAD-12 (v1)*, ya sea que se use solo, mezclado en tanques, o de modo secuencial, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 20 - *AAD-12 (v1)* Agrupada con un Rasgo de *AHAS* en Cualquier Cultivo

La tolerancia al herbicida de imidazolinona (*AHAS*, *et al.*) se encuentra actualmente presente en una cantidad de cultivos plantados en América del Norte

que incluyen, pero sin limitación, maíz, arroz, y trigo. Los cultivos tolerantes a la imidazolinona adicionales (*por ejemplo*, algodón y remolacha azucarera) se han estado desarrollando pero no han sido lanzados comercialmente hasta la fecha. Muchos herbicidas de imidazolinona (por ejemplo, imazamox, imazetapir, imazaquin, e imazapic) se utilizan actualmente de manera selectiva en diversos cultivos convencionales. El uso de imazetapir, imazamox, y el imazapir no selectivo se ha posibilitado a través de rasgos de tolerancia a la imidazolinona como *AHAS et al.* Esta clase química también presenta una actividad residual de suelo significativa, por lo cual puede proveer un control de malezas que se extiende más allá de la sincronización de la aplicación, a diferencia de los sistemas a base de glifosato o glufosinato. Sin embargo, el espectro de malezas controladas por los herbicidas de imidazolinona no es tan amplio como el del glifosato (Agrilience, 2005). Adicionalmente, los herbicidas de imidazolinona poseen un modo de acción (inhibición de acetolactato sintasa, ALS) hacia el cual muchas malezas han desarrollado resistencia (Heap, 2005). Al agrupar *AAD-12 (v1)* con un rasgo de tolerancia a la imidazolinona, ya sea a través de reproducción convencional o conjuntamente como un evento de transformación nuevo, se podría mejorar la eficacia del control de malezas, la flexibilidad, y la capacidad para manejar los desplazamientos de malezas y el desarrollo de resistencia a herbicidas. Tal como se mencionó en los ejemplos previos, mediante la transformación de los cultivos con *AAD-12 (v1)*, los cultivos de monocotiledóneas tendrán un margen superior de seguridad de fenoxi o piridiloxi auxina, y estas auxinas se pueden aplicar de modo selectivo en los cultivos de dicotiledóneas. Pueden preverse diversos argumentos para las opciones de control mejorado de malezas donde *AAD-12 (v1)* y un rasgo de tolerancia a la imidazolinona se agrupan en cualquier especie de cultivos de monocotiledóneas o dicotiledóneas:

a) El imazetapir se puede aplicar en una proporción de aplicación postemergente convencional de (35 a 280 g ae/ha, con preferencia 70-140 g ae/ha) para el control de muchas especies de gramíneas y malezas de hojas anchas.

i) Las malezas de hojas anchas resistentes al inhibidor de ALS como *Amaranthus rudis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album* (entre otras, Heap, 2005) podrían controlarse mediante una mezcla en tanque de 280-2240 g ae/ha, de mayor preferencia 560-1120 g ae/ha, de 2,4-D. Para el triclopir, las proporciones de aplicación oscilarían generalmente entre 70-1120 g ae/ha, más generalmente 140-420 g ae/ha. Para el fluroxipir, las proporciones de aplicación oscilarían generalmente entre 35-560 g ae/ha, más generalmente entre 70-280 g ae/ha.

ii) Las especies de hojas anchas inherentemente más tolerantes a los herbicidas de imidazolinona como *Ipomoea spp.* también se pueden controlar mediante una mezcla en tanque de 280-2240 g ae/ha, de mayor preferencia 560-1120 g ae/ha, de 2,4-D. Véase las proporciones precedentes para el triclopir o fluroxipir.

b) Una combinación múltiple de imazetapir (35 a 280 g ae/ha, con preferencia 70-140 g ae/ha) +/- 2,4-D (280-1120 g ae/ha) +/- triclopir o fluroxipir (en las proporciones eumeradas anteriormente), por ejemplo, podría proporcionar un espectro de control de malezas superpuesto, más fuerte. Adicionalmente, el espectro superpuesto provee un mecanismo adicional para el manejo o retraso de malezas resistentes a herbicidas.

Un experto en la técnica de control de malezas reconocerá que el uso de cualquiera de los diversos herbicidas de auxina fenoxiacética o piridiloxiacética, herbicidas de imidazolinona comerciales, solos o en múltiples combinaciones, es posibilitado por la transformación y el apilamiento de AAD-12 (v1) con cualquier

rasgo de tolerancia a la imidazolinona ya sea mediante reproducción convencional o ingeniería genética. Las proporciones específicas de otros herbicidas que representan estos productos químicos se pueden determinar por las marcas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, las marcas compiladas en internet (por ejemplo, cdms.net/manuf/manuf.asp), o en cualquier guía comercial o académica de protección de cultivos tal como la Crop Protection Guide de Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo facultado para utilizar en HTC's mediante AAD-12 (v1), ya sea que se use solo, mezclado en tanques, o de modo secuencial, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 21 – AAD-12 (v1) en el Arroz

21.1 – Descripción de medios.

El medio de cultivo empleado se reguló hasta un pH 5,8 con KOH 1 M y se solidificó con 2,5 g/L de Phytigel (Sigma). Los callos embriogénicos se cultivaron en placas de Petri de 100 x 20 mm que contenían 40 ml de medio semisólido. Las plántulas de arroz crecieron en 50 ml de medio en cajas Magenta. Las suspensiones celulares se mantuvieron en matraces cónicos de 125 ml que contenían 35 ml de medio líquido y se hicieron girar a 125 rpm. La inducción y el mantenimiento de los cultivos embriogénicos se realizaron en la oscuridad a 25–26°C, y la regeneración de la planta y el cultivo de toda la planta se realizó en un fotoperíodo de 16 horas (Zhang *et al.* 1996).

La inducción y el mantenimiento del callo embriogénico se realizó en un medio basal de NB de acuerdo con lo descrito anteriormente (Li *et al.* 1993), pero adaptado para contener 500 mg/L de glutamina. Los cultivos en suspensión se iniciaron y mantuvieron en un medio líquido SZ (Zhang *et al.* 1998) con la inclusión de 30 g/L de sacarosa en lugar de maltosa. El medio osmótico (NBO)

consistió en un medio NB con el agregado de 0,256 M cada uno de manitol y sorbitol. Se seleccionó el callo resistente a la higromicina B en el medio NB complementado con 50 mg/L de higromicina B durante 3–4 semanas. La prerregeneración se realizó en medio (PRH50) que comprendía medio NB sin ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), pero con el agregado de 2 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP), 1 mg/L de ácido α -naftalenacético (NAA), 5 mg/L de ácido abscísico (ABA) y 50 mg/L de higromicina B durante 1 semana. La regeneración de las plántulas siguió a través del cultivo en medio de regeneración (RNH50) que comprendía medio NB sin 2,4-D, y suplementado con 3 mg/L de BAP, 0,5 mg/L de NAA, y 50 mg/L de higromicina B hasta que se regeneraron los brotes. Los brotes se transfirieron a un medio de formación de raíz con vitaminas B5 de Gamborg y sales basales de Murashige y Skoog de fuerza media, suplementado con sacarosa 1% y 50 mg/L de higromicina B (1/2MSH50).

21.2 – Desarrollo de cultivo de tejido.

Se esterilizaron semillas desecadas maduras de *Oryza sativa* L. japonica cv. Taipei 309 de acuerdo con lo descrito en Zhang et al. 1996. Los tejidos embriogénicos se indujeron mediante el cultivo de semillas de arroz maduras estériles en medio NB en la oscuridad. El callo principal de aproximadamente 1 mm de diámetro, se retiró del escutelo y se utilizó para iniciar la suspensión celular en medio líquido SZ. Luego las suspensiones se mantuvieron de acuerdo con lo descrito en Zhang 1995. Los tejidos embriogénicos derivados de la suspensión se retiraron del cultivo líquido a los 3-5 días luego del subcultivo previo y se colocaron sobre un medio osmótico NBO para formar un círculo de aproximadamente 2,5 cm de ancho en una placa Petri y se cultivaron durante 4 h antes del bombardeo. A las dieciséis a 20 horas luego del bombardeo, los tejidos se transfirieron desde el medio NBO hacia el medio de selección de higromicina B NBH50, asegurándose de que la superficie bombardeada se encontraba hacia

arriba, y se incubó en la oscuridad durante 14-17 días. El callo formado recientemente se separó luego de los explantes bombardeados originales y se colocó cerca de allí en el mismo medio. Luego de 8-12 días adicionales, se identificó visualmente un callo opaco, relativamente compacto, y se transfirió a un medio de pre-regeneración PRH50 durante 7 días en la oscuridad. El callo en crecimiento, que se tornó más compacto y opaco se subcultivó luego sobre un medio de regeneración de RNH50 durante un período de 14–21 días bajo un fotoperíodo de 16 h. Los brotes en regeneración se transfirieron a cajas Magenta que contenían medio ½ MSH50. Las plantas múltiples regeneradas a partir de un explante único se consideran hermanas y se trataron como una línea vegetal independiente. Una planta se clasificó como positiva para el gen *hph* si produjo raíces gruesas, blancas y si creció intensamente en medio ½ MSH50. Una vez que las plántulas alcanzaron la parte superior de las cajas Magenta, se transfirieron al suelo en una maceta de 6 cm con un 100% de humedad durante una semana, luego se trasladaron a una cámara de crecimiento con un período de luz de 14 horas a 30°C y en la oscuridad a 21°C durante 2–3 semanas antes de transplantarlas en macetas de 13 cm en el invernadero. Las semillas se recogieron y se secaron a 37°C durante una semana, antes del almacenamiento.

21.3 Bombardeo de microproyectiles.

Todos los bombardeos se realizaron con el sistema Biolistic PDS-1000/He™ (Bio-Rad, Laboratories, Inc.). Se lavaron tres miligramos de partículas de oro con un diámetro de 1,0 micrón una vez con etanol al 100%, dos veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en 50 µl de agua en un tubo Eppendorf siliconado. Cinco microgramos de ADN plásmido que representa una relación molar 1:6 de pDOW3303 (vector que contiene *Hpt*) a pDAB4101 (*AAD-12 (v1)* + *AHAS*), 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 se distribuyeron 8–9 µl en cada macrotransportador. Las muestras de tejido se bombardearon en vacío de 0,90 atm (27 pulgadas de Hg) y 74,85 atm (1100 psi) de acuerdo con lo descrito por Zhang *et al.* (1996).

21.4 Tolerancia al herbicida postemergencia en Arroz T₀ transformado con AAD-12 (v1)

Las plántulas de arroz en la etapa de 3-5 hojas se rociaron con una dosis letal de 0,16% (v/v) de solución de Pursuit (para confirmar la presencia del gen *AHAS*) que contenía 1% (v/v) de Sunnit II y 1,25% (v/v) de UAN usando un rociador de hileras calibrado en 187 L/ha. La evaluación en cuanto a la sensibilidad o resistencia se realizó a los 36 días luego del tratamiento (DAT). Diez de los 33 eventos enviados al invernadero fueron fuertemente tolerantes a la Pursuit; otros sufrieron niveles variables de daño por el herbicida. Las plantas se muestrearon (de acuerdo con la sección 21.7 a continuación) y se realizó la caracterización molecular según se describe en el Ejemplo 8 que identificó siete de estos 10 eventos como conteniendo tanto al AAD-12 (v1) PTU como también a la región codificadora *AHAS* completa.

21.5 – Heredabilidad de AAD-12 (v1) en arroz T₁

Se realizó una evaluación de progenie de 100 plantas en cinco líneas T1 de líneas de AAD-12 (v1) que contenían tanto al AAD-12 (v1) PTU como también a la región codificadora *AHAS*. Las semillas se plantaron con respecto al procedimiento mencionado precedentemente y se rociaron con 140 g ae/ha de imazetapir usando un rociador de hileras de acuerdo con lo descrito previamente. Luego de 14 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Dos de las cinco líneas evaluadas segregaron como locus único, un rasgo mendeliano dominante (3R:1S) tal como se determinó por análisis de Chi

cuadrado. AAD-12 cosegregó con el marcador seleccionable *AHAS* según lo determina el ensayo de tolerancia a 2,4-D a continuación.

21.6 Verificación de la alta tolerancia a 2,4-D en Arroz T₁.

Las siguientes líneas de locus de segregación únicas T₁ AAD-12 (*v1*) se plantaron en macetas de 7,62 centímetros (3 pulgadas) que contenían medio Metro Mix: pDAB4101(20)003 y pDAB4101(27)002. En la etapa de 2-3 hojas se rociaron con 140 g ae/ha de imazetapir. Las nulas se eliminaron y las individuales se rociaron en la etapa V3-V4 con el rociador de carril fijo en 187 L/ha a 1120, 2240 o 4480 g ae/ha de 2,4-D DMA (2X, 4X, y 8X de las proporciones de uso comercial típicas, respectivamente). Las plantas se evaluaron a los 7 y 14 DAT y se compararon con las variedades cultivadas de arroz comercial no transformadas, ‘Lamont’, como plantas de control negativo.

Los datos de los daños (Tabla 27) muestran que las líneas transformadas con AAD-12 (*v1*) son más tolerantes a elevadas proporciones de 2,4-D DMA que los controles no transformados. La línea pDAB4101(20)003 fue más tolerante a elevados niveles de 2,4-D que la línea pDAB4101(27)002. Los datos también demuestran que la tolerancia de 2,4-D es estable durante al menos dos generaciones.

Tabla 27. Respuesta del control no transformado y T ₁ AAD-12 (<i>v1</i>) a diversos niveles de 2,4-D DMA.			
Herbicida	Control No Transformado Lemont	pDAB4101(20)003	pDAB4101(27)002
	% Promedio de Daño 14 DAT		

1120 g ae/ha de 2,4-D DMA	20	10	10
2240 g ae/ha de 2,4-D DMA	35	15	30
4480 g ae/ha de 2,4-D DMA	50	23	40

21.7 – Cosecha del tejido, Aislamiento y cuantificación de ADN.

El tejido nuevo se colocó en tubos y se liofilizó a 4°C durante 2 días. Luego de secado completamente el tejido, se colocó en el tubo una perla de tungsteno (Valenite) y las muestras se sometieron a un minuto de molienda en seco con un molino de perlas Kelco. Luego se siguió el procedimiento de aislamiento de ADN DNeasy estándar (Qiagen, Dneasy 69109). Luego una alícuota del ADN extraído se tiñó con Pico Green (Sondas moleculares P7589) y se escaneó en el fluorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/μl.

21.8 – Expresión de AAD-12 (v1).

La preparación de la muestra y las condiciones del análisis son como las descritas anteriormente. Todas las 33 líneas de arroz transgénico T₀ y 1 control no transgénico se analizaron para determinar la expresión de AAD-12 usando transferencia de ELISA. Se detectó AAD-12 en los clones de 20 líneas, pero no en la planta de control línea Taipai 309. Doce de las 20 líneas que tenían algunos de los clones tolerantes a imazetapir expresando la proteína AAD-12, fueron positivas respecto de AAD-12 PCR PTU, positivas en cuanto a la región codificadora AHAS. Los niveles de expresión oscilaban entre 2,3 a 1092,4 ppm de proteína soluble total.

21.9- Tolerancia de campo de plantas de arroz pDAB4101 a los herbicidas 2,4-D y triclopir.

Se llevó a cabo un ensayo de nivel de tolerancia de campo con evento AAD-12 (v1) pDAB4101[20] y arroz de tipo salvaje (Clearfield 131) en Wayside,

Mississippi (una variedad resistente a imidazolinona no transgénica). El diseño experimental fue un diseño de bloque completo aleatorizado con una única replicación. Los tratamientos con herbicidas fueron de proporciones 2X de 2,4-D (sal dimetilamina) a 2240 g ae/ha y triclopir a 560 g ae/ha más un control no tratado. En cada tratamiento con herbicida, se plantaron dos hileras de pDAB4101[20] de generación T₁ y dos hileras de arroz Clearfield usando un pequeño perforador de terreno con espaciamiento de hileras de 20,32 centímetros (8 pulgadas). El arroz pDAB4101[20] contenía el gen *AHAS* como marcador seleccionable para el gen *AAD-12(v1)*. Se aplicó imazetapir en la etapa de una hoja como agente de selección para eliminar cualquier *AAD-12 (v1)* de plantas nulas de los lotes. Los tratamientos con herbicidas se aplicaron cuando el arroz alcanzó la etapa de 2 hojas utilizando un rociador de mochila de aire comprimido que suministra un volumen de portador de 187 L/ha a una presión 130-200 kpa. Las evaluaciones del daño visual se tomaron a los 7, 14 y 21 días después de la aplicación.

La respuesta del evento *AAD-12 (v1)* a 2,4-D y triclopir se muestran en la Tabla 28. La línea de arroz no transformada (Clearfield) tenía daños graves (30% a los 7 DAT y 35% a los 15 DAT) con 2,4-D a 2240 g ae/ha lo cual se considera 4 X la proporción de uso comercial. Los eventos *AAD-12 (v1)* todos demostraron excelente tolerancia a 2,4-D sin daño observado a los 7 DAT o 15 DAT. El arroz no transformado tenía un daño significativo (15% a los 7 DAT y 25% a los 15 DAT) con la proporción 2X de triclopir (560 g ae/ha). El evento *AAD-12 (v1)* mostró excelente tolerancia a proporciones de 2X de triclopir sin daño observado a los 7 o 15 DAT.

Estos resultados indican que el arroz transformado con *AAD-12 (v1)* desplegó un alto nivel de resistencia a 2,4-D y triclopir con proporciones que causaron un daño visual grave al arroz Clearfield. También demuestran la

capacidad para agrupar múltiples genes de tolerancia a herbicidas con múltiples especies de AAD-12 I para proporcionar resistencia a un espectro más amplio de productos químicos efectivos.

Tabla 28. Respuesta de plantas de arroz de generación T₁ AAD-12 a 2,4-D y triclopir en condiciones de campo.

Tratamiento con herbicida		% de Daño Visual			
		7 DAT		15 DAT	
Ingrediente		Evento AAD-12	Clearfield	Evento AAD-12	Clearfield
activo	Proporción	pDAB4101[20]	tipo salvaje	pDAB4101[20]	tipo salvaje
2,4-D	2240 GM				
	AE/HA	0	15	0	35
Triclopir	840 GM				
	AE/HA	0	30	0	25
No tratado		0	0	0	0

Ejemplo 22 – AAD-12 (v1) en Canola

22.1 – Transformación de Canola.

El gen *AAD-12 (v1)* que confiere resistencia a 2,4-D se utilizó para transformar *Brassica napus* var. Nexera* 710 con una transformación mediada por *Agrobacterium* y plásmido pDAB3759. La construcción contenía el gen *AAD-12 (v1)* conducido por el promotor CsVMV y el gen Pat conducido por el promotor AtUbi10 y el rasgo de resistencia al glifosato EPSPS conducido por el promotor AtUbi10 (véase la sección 2.4).

Se esterilizaron las superficies de las semillas con blanqueador comercial 10% durante 10 minutos y se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron luego sobre una concentración media de medio basal MS

(Murashige y Skoog, 1962) y se mantuvieron bajo un régimen de crecimiento fijo en 25°C, y un fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad.

Los segmentos de hipocotilo (3-5 mm) se separaron de las plántulas de 5-7 días de edad y se colocaron en el medio de inducción del callo K1D1 (medio MS con 1 mg/L de cinetina y 1 mg/L de 2,4-D) durante 3 días como pretratamiento. Luego los segmentos se transfirieron a una placa de Petri, se trataron con *Agrobacterium* Z707S o con una cepa de LBA4404 que contenía al pDAB3759. El *Agrobacterium* creció durante la noche a 28°C en la oscuridad sobre un agitador a 150 rpm y luego se resuspendió en el medio de cultivo.

Luego de un tratamiento de 30 min de los segmentos de hipocotilo con *Agrobacterium*, éstos se colocaron nuevamente en el medio de inducción del callo durante 3 días. Luego del cocultivo, los segmentos se colocaron sobre K1D1TC (medio de inducción de callo que contenía 250 mg/L de Carbenicilina y 300 mg/L de Timentina) durante una semana o dos semanas de recuperación. Alternativamente, los segmentos se colocaron directamente sobre un medio de selección K1D1H1 (sobre medio con 1 mg/L de Herbiace). Los antibióticos utilizados para exterminar al *Agrobacterium* fueron Carbenicilina y Timentina. El agente de selección Herbiace permitió el crecimiento de las células transformadas.

Luego los segmentos de hipocotilo en callo se colocaron sobre un medio de regeneración de brotes B3Z1H1 (medio MS, 3 mg/L de bencilamino purina, 1 mg/L de Zeatina, 0,5 gm/L de MES [ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico], 5 mg/L de nitrato de plata, 1 mg/L de Herbiace, Carbenicilina y Timentina). Luego de 2-3 semanas los brotes comenzaron a regenerarse. Los segmentos de hipocotilo junto con los brotes se transfieren a medio B3Z1H3 (medio MS, 3 mg/L de bencilamino purina, 1 mg/L de Zeatina, 0,5 gm/L de MES [ácido 2-(N-

morfolin)etansulfónico], 5 mg/L de nitrato de plata, 3 mg/L de Herbiace, Carbenicilina y Timentina) durante otras 2-3 semanas.

Los brotes se separaron de los segmentos de hipocotilo y se transfirieron a un medio de elongación de brotes MESH5 o MES10 (MS, 0,5 gm/L de MES, 5 o 10 mg/L de Herbiace, Carbenicilina, Timentina) durante 2-4 semanas. Los brotes elongados se cultivan para la inducción de la raíz en MSI.1 (MS con 0,1 mg/L de Ácido indolbutírico). Una vez que las plantas tenían un sistema de raíz bien establecido, se transplantaron al suelo. Las plantas se aclimataron bajo condiciones medioambientales controladas en el Conviron durante 1-2 semanas antes de transferirlas al invernadero.

22.2 – Análisis molecular: materiales y métodos de canola.

22.2.1 – Cosecha de tejido aislamiento y cuantificación del ADN. Se colocaron tejidos nuevos en tubos y se liofilizaron a 4°C durante 2 días. Luego de secado completamente el tejido, se colocó una perla de tungsteno (Valenita) en el tubo y las muestras se sometieron a 1 minuto de molienda en seco con un molino de perlas Kelco. Luego se siguió entonces el procedimiento de aislamiento de ADN estándar DNeasy (Qiagen, DNeasy 69109). Una alícuota del ADN extraído se tiñó luego con Pico Green (Molecular Probes P7589) y se leyó en el fluorómetro (BioTek) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/ul.

22.2.2 - Reacción en cadena de polimerasa. Un total de 100 ng del ADN total se utilizó como plantilla. Se utilizaron 20 mM de cada cebador con el kit Takara Ex Taq PCR Polymerase (Mirus TAKRR001A). Los cebadores para la Región Codificadora PCR AAD-12 (v1) fueron (SEC ID NO:10) (directo) y (SEC ID NO:11) (inverso). La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador 9700 Geneamp (Applied Biosystems), sometiendo a las muestras a 94°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, y

72°C durante 2 minutos seguido por 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% teñido con EtBr. 35 muestras de 35 plantas con eventos de AAD-12 (v1) dieron positivo. Tres muestras de control negativo dieron negativo.

22.2.3 – ELISA.

Con el ELISA establecido descrito en la sección anterior, se detectó la proteína AAD-12 en cinco eventos vegetales de transformación de canola diferentes. Los niveles de expresión oscilaron entre 14 a más de 700 ppm de proteína soluble total (TSP). Tres muestras de plantas no transformadas diferentes se evaluaron en forma paralela sin detección de señales, lo cual indica que los anticuerpos utilizados en el ensayo poseen una mínima reactividad cruzada a la matriz de la célula de canola. Estas muestras también confirmaron el positivo mediante análisis Western. Un resumen de los resultados se presenta en la Tabla 29.

Tabla 29. Expresión de AAD-12 (v1) en plantas de Canola				
Muestra #	[TSP] (µg/ml)	[AAD-12] (ng/ml)	Expresión (ppm TSP) (ELISA)	Western
31	5614,96	1692,12	301,36	++++
33	4988,26	2121,52	425,30	++++
38	5372,25	3879,09	722,06	++++
39	2812,77	41,36	14,71	+
40	3691,48	468,74	126,98	+++
Control 1	2736,24	0,00	0,00	-
Control 2	2176,06	0,00	0,00	-
Control 3	3403,26	0,00	0,00	-

22.4 – Tolerancia al herbicida postemergencia en Canola T₀ transformada con AAD-12 (v1).

Cuarenta y cinco eventos de T₀ a partir de los transformados con la construcción pDAB3759, se enviaron al invernadero durante un período y se dejaron aclimatar en el invernadero. Las plantas crecieron hasta la aparición de 2-4 hojas nuevas, de apariencia normal (es decir, plantas que habían pasado desde el cultivo de tejido hasta las condiciones de crecimiento de invernadero). Luego las plantas se trataron con una dosis letal de las formulaciones comerciales de 2,4-D Amina 4 a una proporción de 560 g ae/ha. Las aplicaciones del herbicida se realizaron con un rociador de hileras a un volumen de rociado de 187 L/ha, una altura de rociado de 50 cm. Una dosis letal se define como la proporción que causa un >95% de daño a los controles no transformados.

Veinticuatro de los eventos fueron tolerantes a la aplicación del herbicida de 2,4-D DMA. Algunos eventos presentaron daños menores pero se recuperaron a los 14 DAT. Los eventos avanzaron hacia T₁ (y la generación T₂) por medio de autopolinización en condiciones controladas, capturadas.

22.5 – Heredabilidad de AAD-12 (v1) en Canola.

Una prueba de progenie de 100 plantas también se llevó a cabo en 11 líneas T₁ de AAD-12 (v1). Las semillas se sembraron y se transplantaron a macetas de 7,63 centímetros (3 pulgadas) cargadas con medio Metro Mix. Luego todas las plantas se rociaron con 560 g ae/ha de 2,4-D DMA de acuerdo con lo descrito anteriormente. Luego de 14 DAT, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Siete de las 11 líneas evaluadas segregaron como locus único, un rasgo mendeliano dominante (3R:1S) de acuerdo con lo determinado por el análisis de Chi-cuadrado. El AAD-12 se hereda como un gen fuerte de resistencia a ariloxialcanoato auxina en múltiples especies y se puede agrupar con uno o más genes de resistencia a herbicidas adicionales.

22.6 Verificación de una elevada tolerancia a 2,4-D en Canola T₁

Para T₁ AAD-12 (v1), se estratificaron 5-6 mg de semillas, se sembraron, y se agregó una capa fina de medio Sunshine Mix # 5 como capa superior del suelo. Las plantas que surgieron se seleccionaron con 560 g ae/ha de 2,4-D a los 7 y 13 días después de la siembra.

Las plantas sobrevivientes se trasplantaron en macetas de 7,62 centímetros (3 pulgadas) que contenían un medio Metro Mix. Las plantas sobrevivientes de las progenies T₁, que se seleccionaron con 560 g ae/ha de 2,4-D, se transplantaron también en macetas de 7,62 centímetros (3 pulgadas) cargadas con suelo Metro Mix. En la etapa de 2-4 hojas las plantas se rociaron con 280, 560, 1120, o 2240 g ae/ha de 2,4-D DMA. Las plantas se evaluaron a los 3 y 14 DAT y se compararon con las plantas de control no transformadas. En la **Tabla 30** se puede observar un muestreo de los datos sobre los daños del evento T₁ a los 14 DAT. Los datos sugieren que múltiples eventos son fuertemente resistentes a 2240 g ae/ha de 2,4-D, mientras que otros eventos demostraron una tolerancia menos fuerte hasta 1120 g ae/ha de 2,4-D. Las plantas sobrevivientes se transplantaron en macetas de 13,33 cm (5 1/4") que contenían un medio Metro Mix y se colocaron en las mismas condiciones de crecimiento que antes y se autopolinizaron para producir solamente semillas homocigotas.

Tabla 30. Respuesta de control no transformado y T ₁ AAD-12 (v1) a diversas proporciones de aplicaciones de 2,4-D DMA postemergencia.						
Herbicida	Control No Transformado	pDAB3759(33)013.001	pDAB3759(18)009.001	pDAB3759(18)022.001	pDAB3759(18)030.001	pDAB3759(18)023.001
	% Promedio de Lesión 14 DAT					
280 g ae/ha de 2,4-D DMA	85	0	0	0	0	0
560 g ae/ha de 2,4-D DMA	85	0	0	0	0	0
1120 g ae/ha de 2,4-D DMA	90	0	0	13	5	3
2240 g ae/ha de 2,4-D DMA	95	1	5	83	31	6

22.7– Tolerancia de campo de plantas de canola pDAB3759 a los herbicidas 2,4-D, dicloprop, triclopir y fluroxipir.

El ensayo de nivel de tolerancia de campo se realizó en dos eventos AAD-12 (v1) 3759(20)018.001 y 3759(18)030.001 y una canola de tipo salvaje (Nex710) en Fowler, Indiana. El diseño experimental fue un diseño de bloque completo aleatorizado con 3 replicaciones. Los tratamientos con herbicidas fueron 2,4-D (sal dimetilamina) a 280, 560, 1120, 2240 y 4480 g ae/ha, triclopir a 840 g ae/ha, fluroxipir a 280 g ae/ha y un control no tratado. En cada tratamiento con herbicida, se plantaron hileras únicas de 6 metros (20 pies)/evento para el evento 3759(18)030.0011, 3759(18)018.001 y la línea de tipo salvaje (Nex710) con un perforador de 4 hileras con un espaciamento de hileras de 20,32 centímetros (8 pulgadas). Los tratamientos con herbicidas se aplicaron cuando la canola alcanzó

la etapa de 4-6 hojas usando un rociador de mochila de aire comprimido que suministraba 187 L/ha de volumen portador a 130-200 kpa de presión. Las calificaciones del daño visual se tomaron a los 7, 14 y 21 días después de la aplicación.

La respuesta de la canola a 2,4-D, triclopir, y fluroxipir se muestra en la Tabla 31. La canola de tipo salvaje (Nex710) estaba gravemente dañada (72% a los 14 DAT) por 2,4-D a 2240 g ae/ha que se considera una proporción 4X. todos los eventos AAD-12 (v1) demostraron una excelente tolerancia a 2,4-D a los 14 DAT con un daño promedio de 2, 3 y 2% observado a proporciones de 1, 2 y 4X, respectivamente. La canola de tipo salvaje fue gravemente dañada (25% a los 14 DAT) por la proporción 2X de triclopir (840 g ae/ha). Los eventos AAD-12 (v1) demostraron tolerancia a proporciones 2X de triclopir con un promedio de 6% de daño a los 14 DAT a través de los dos eventos. El fluroxipir a 280 g ae/ha causó daño grave (37%) a la línea no transformada a los 14 DAA (sic). Los eventos AAD-12 (v1) mostraron aumento de la tolerancia con un promedio de 8% de daño a los 5 DAT.

Estos resultados indican que los eventos transformados con AAD-12 (v1) desplegaron un alto nivel de resistencia a 2,4-D, triclopir y fluroxipir en proporciones que eran letales o que causaron graves malformaciones epinásticas a canola no transformada. También se la demostrado que AAD-12 tiene una eficacia relativa de 2,4-D > triclopir > fluroxipir.

Tabla 31. Respuesta de plantas de canola AAD-12 (pDAB3759) a 2,4-D, triciclopir, y fluroxipir en condiciones de campo.	
<u>Tratamiento con Herbicida</u>	<u>% de Daño Visual a 14 DAT</u>

Ingrediente		Evento AAD-12	Evento AAD-12	Tipo Salvaje
Activo	Proporción	3759(20)018.001	3759(18)030.001	(Nex710)
2,4-D	280 GM AE/HA	0 a	0 b	0 e
2,4-D	560 GM AE/HA	0 a	0 b	15 d
2,4-D	1120 GM AE/HA	2 a	2 ab	33 bc
2,4-D	2240 GM AE/HA	3 a	3 ab	48 a
Triciclopir	840 GM AE/HA	6 a	6 ab	25 cd
Fluroxipir	280 GM AE/HA	7 a	8 a	37 ab

Las medias con una columna con diferentes letras son significativamente diferentes según se define por LSD (p=0,05).

Ejemplo 23 – AAAD-12 (v1) Agrupado con Resistencia a Insectos (IR) u Otros Rasgos de Ingreso en Cualquier Cultivo

La resistencia a insectos en cultivos suministrada por un rasgo transgénico es predominante en la producción de maíz y algodón en América del Norte y en todo el mundo. Numerosas empresas de semillas han desarrollado productos comerciales que poseen rasgos IR y HT combinados. Éstos incluyen rasgos Bt IR (por ejemplo las toxinas Bt enumeradas en el sitio web lifesci.sussex.ac.uk, 2006) y cualquiera o todos los rasgos HTC antes mencionados. El valor de esta oferta brinda la capacidad para controlar múltiples problemas de plagas a través de medios genéticos en un mismo ofrecimiento. La conveniencia de este ofrecimiento será restringida si se logran el control de malezas y el control de insectos independientemente entre sí. *AAAD-12 (v1)* solo o agrupado con uno o más rasgos HTC adicionales se puede agrupar con uno o más rasgos de ingreso adicionales (*por ejemplo*, resistencia a insectos, resistencia fúngica, o tolerancia a estrés, *entre otros*) (isb.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm, 2005) ya sea a través de reproducción convencional o juntos como nuevo evento de transformación. Los

beneficios incluyen la conveniencia y la flexibilidad descritos en los Ejemplos 15-20 anteriores, junto con la capacidad para manejar plagas de insectos y/u otros estreses agronómicos además del mayor control de malezas ofrecido por *AAD-12* y la asociada tolerancia a herbicida. En consecuencia, la presente invención se puede usar para proporcionar un paquete agronómico completo de calidad de cultivo mejorada con la capacidad de controlar en forma flexible y efectiva en cuanto al costo cualquier cantidad de cuestiones agronómicas.

Los rasgos combinados de IR y HT se aplican en la mayoría de los cultivos hortícolas/ornamentales y agronómicos y en ciencias forestales. La combinación de *AAD-12* y su correspondiente tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos proporcionadas por cualquiera de la cantidad de genes Bt o IR no Bt se pueden aplicar a las especies de cultivo enumeradas (pero sin limitaciones) en el Ejemplo 13. Un experto en la técnica de control de malezas reconocerá que el uso de cualquiera de los diversos herbicidas descritos en los Ejemplos 18-20, los herbicidas de auxinas fenoxiacéticas o piridiloxiacéticas, solso o en combinaciones múltiples, está habilitado por la transformación de *AAD-12 (v1)* y la agrupación con el correspondiente rasgo HT o rasgo IR ya sea a través de reproducción convencional o ingeniería genética. Las proporciones específicas de otros herbicidas que representan estos productos químicos se pueden determinar por las marcas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Crop Protection Reference) o compilación similar, las marcas compiladas en internet (*por ejemplo*, cdms.net/manuf/manuf.asp), o en cualquier guía comercial o académica de protección de cultivos tal como la Crop Protection Guide de Agrilience (2005). Cada herbicida alternativo facultado para utilizar en HTC's mediante *AAD-12 (v1)*, ya sea que se use solo, mezclado en tanques, o de modo secuencial, se considera dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 24 – AAD 12 (v1) como Marcador Seleccionable de Dicotiledóneas *in vitro*

La ingeniería genética de células, tejidos, órganos, y plantas u organelas vegetales tales como los plástidos comienza con el proceso de inserción de los genes de interés en células vegetales mediante un método de suministro adecuado. Sin embargo, cuando se suministra un gen a células vegetales, sólo un porcentaje extremadamente pequeño de células integran el gen heterogéneo dentro de su genoma. A fin de seleccionar estas pocas células que han incorporado el gen de interés, los investigadores ligan un “gen marcador” seleccionable o detectable al gen de interés (GOI) en el vector. Las células que contienen estos marcadores se identifican de la población completa de células/tejido a la cual se suministró el vector plásmido ADN. Al seleccionar aquellas células que expresan el gen marcador, los investigadores pueden identificar aquellas pocas células que pueden tener incorporado el GOI dentro de su genoma.

Hay una variedad de marcadores seleccionables disponibles para permitir este proceso de selección con el fin de obtener células, callos, embriones, brotes y plántulas transgénicos. Los marcadores seleccionables preferidos en la industria agronómica son los marcadores de herbicidas que permiten la facilidad de rociar compuestos en el campo para seleccionar las progenies transgénicas correctas durante el proceso de clasificación de eventos en la situación del campo. AAD-12 (v1) ha demostrado servir eficientemente como un marcador seleccionable para las plantas enteras transformadas con el gen en el invernadero y en la cámara de cultivo (Ejemplo 7) con 2,4-D como agente de selección. La selección de campo

también es posible usando 2,4-D en combinación con el gen *AAD-12 (v1)* (Ejemplo 11, 22), pero el uso *in vitro* para la selección del nivel celular se complica por el hecho de que 2,4-D se utiliza de modo ubicuo como regulador del crecimiento vegetal en los sistemas de cultivo de tejido vegetal. La degradación de esta importante hormona mediante *AAD-12 (v1)* puede impactar en la capacidad de usar este gen como marcador seleccionable *in vitro*. El éxito del desarrollo de 2,4-D como gen marcador depende de la identificación del adecuado regulador de crecimiento vegetal alternativo que puede simular el efecto de 2,4-D en el respectivo sistema de cultivo y al mismo tiempo posee la capacidad de ser estable y de no ser degradado por la enzima *AAD-12* cuando se expresa en las células transgénicas. R-diclorprop es un análogo cercano de 2,4-D que no es sustrato para *AAD-12 (v1)* y se usa como sustituto no metabolizable de auxina en cultivos de células de tabaco lo cual permite usar 2,4-D en proporciones elevadas como agente de selección. Este hecho se utilizó al ejemplificar que *AAD-12 (v1)* se podría usar como un marcador seleccionable *in vitro*.

24.1- Cultivo celular – Auxinas alternativas.

AAD-12 (v1) degrada 2,4-D, pero no el ácido R-2,4-diclorofenoxipropiónico (R-diclorprop), el cual tiene al mismo tiempo el requisito estructural de un regulador de crecimiento auxínico. Otros simuladores no metabolizables de auxinas vegetales que se pueden usar en cultivos celulares incluyen NAA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético), dicamba, picloram, y R-mecoprop. Se investigó si era posible sustituir R-diclorprop y mantener con éxito dos suspensiones PHL (Petite Habana) y BY2 de cultivos celulares de tabaco diferentes. Por otra parte, para los explantes de algodón se evaluaron R-diclorprop, dicamba, y picloram como auxinas alternativas y se evaluó la respuesta de inducción de callo embriogénico en comparación con el regulador de

crecimiento estándar, 2,4-D. Se usaron cotiledones de tabaco Habana (PHL) y de algodón Coker en sus experimentos.

24.1.1 – Suspensión de células de tabaco – 2,4-D como agente de selección

Se llevó a cabo un estudio de respuesta a la dosis con ambas células PHL habituadas a R-diclorprop y células BY2 habituadas a R-diclorprop donde se sustituyó R-diclorprop directamente por 2,4-D en el medio de cultivo. Si bien se centró la atención en PHL, también se efectuó la respuesta a la dosis con BY2 en el caso de posibles estudios futuros, además de contribuir a predecir la respuesta a la dosis para PHL. Para la respuesta a la dosis de PHL habituado a diclorprop, los niveles de 2,4-D usados (en medio LSHY2C con R-diclorprop) fueron 0 (el control), 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 40, 60, 80, 100, 110, 120, mg/L de 2,4-D. Hubo 4 replicaciones por concentración. Para la respuesta a la dosis de BY2 habituado a R-diclorprop, los niveles de 2,4-D usados (en medio LSHY2C) fueron 0 (control), 1, 2, 3, 5, 8, 10, 20, 30, 40 mg/L de 2,4-D.

La respuesta a la dosis que se llevó a cabo demostró que todas las concentraciones de 2,4-D evaluadas con fueron letales en las concentraciones por encima de 10 mg/L. Sin embargo, hubo crecimiento en todas las concentraciones de hasta 10 mg/L de 2,4-D en las que se observó un ligero crecimiento de la suspensión de PHL. El crecimiento de las colonias de la suspensión a partir de concentraciones de 2,4-D de 1-8 mg/L era comparable al crecimiento en tratamientos de control. La observación realizada en células de suspensión BY2 fue similar salvo que se halló que la concentración en 10 mg/L era letal y la concentración subletal era la concentración de 8 mg/L.

24.1.2 – Transformación de células de tabaco con selección de AAD-12 (v1) y 2,4-D.

Para el experimento de transformación de tabaco, se hicieron 11 tratamientos conjuntos: un conjunto de control colocado en placas en medio LS-BY2C + diclorprop, y 10 conjuntos de LS-BY2C + diclorprop + 2,4-D con niveles de concentración variables (1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20 mg/L). Se hicieron cuatro replicaciones por tratamiento. El vector plásmido ADN usado fue pDAB724, y el vector usado para la transformación fue la cepa EHA101S de *Agrobacterium tumefaciens*. Se mezclaron cuatro ml de suspensión de PHL a $0,6 \text{ DO}^{660}$ con 100 μl de suspensión de *Agrobacterium* (cepas EHA101 o LBA4404) a $1,0 \text{ DO}^{660}$ en una placa de Petri estéril y se mezclaron intensamente y se cocultivaron conjuntamente en condiciones sin agitación en cámara de crecimiento oscura durante 3 días a 25°C . Después del período de cocultivo, se colocaron en placas 1,5 ml de la mezcla de suspensión Agro-tabaco en los 11 conjuntos de placas anteriores. El experimento se repitió con 13 tratamientos: un control de LS-BY2C + medio diclorprop (sin 2,4-D), y LS-BY2C + diclorprop + 2,4-D (1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20 mg/L); LSBY2C + 1 mg/L de 2,4-D + B10 (Bialofos); LSBY2C + 10 mg/L de 2,4-D + B10 + R-diclorprop. Nuevamente, hubo cuatro replicados por tratamiento, además de un control positivo y negativo. Todos los medios contenían 500 mg/L de Carbenicilina (C) como control para contener el crecimiento de *Agrobacterium* en el medio de selección.

El plásmido usado en estos experimentos es pDAB724 y éste también tiene un marcador seleccionable *PAT*. En consecuencia, se iniciaron los experimentos de control de transformación usando PHL habituado a R-diclorprop en presencia de 10 mg/L de bialofos siguiendo el protocolo estándar antes descrito. Los tratamientos se realizaron juntos con 4 réplicas para ver si la selección por bialofos en estas suspensiones era normal.

Se observó escaso crecimiento en todas las concentraciones de selección de 2,4-D evaluadas por encima de 10 mg/L; sin embargo, se hallaron diversas

colonias de crecimiento rápido en las concentraciones 2, 5, y 8 mg/L de 2,4-D y una muestra representativa se transfirió a medio fresco de selección con 10 mg/L para obtener cantidad de callo. Además, se seleccionaron varias colonias posibles de 12, 15, 18 y 20 mg/L de 2,4-D, pero al comparar con 10 mg/L sólo hubo escasas colonias en estas placas de selección. El tratamiento con control realizado con selección de bialofos mostró desarrollo normal de colonias. En apariencia 10 mg/L de 2,4-D es la concentración subletal y por encima de esta concentración 2,4-D parece ser letal para las células no transformadas. Todas las colonias identificadas se transfirieron a medio fresco con selección de 10 mg/L y se sondaron para detectar la presencia de un transgen mediante PCR tal como se describió en el Ejemplo 10. Las colonias seleccionados y obtenidas a granel poseían los transgenes determinados por PCR y la expresión de los genes tal como se estableció por análisis Western (como se describió en el Ejemplo 10). Se identificaron diversas colonias con cultivo activo y se transfirieron a un medio de selección fresco con 10 mg/L de 2,4-D para obtener cantidad del callo.

Los callos en cantidad luego se transfirieron a un nivel mayor de 2,4-D para evaluar el nivel de tolerancia *in vitro*. Los niveles de 2,4-D usados fueron 20, 40, 60, 80, 100, y 120 mg/L de 2,4-D. Sin embargo el callo no creció en concentraciones de 2,4-D superiores a 20 mg/L lo cual indica que puede existir un umbral de concentración superior a 20 mg/L.

24.2.1 – Explantes de algodón-alternativas de auxina

Se inició un estudio de respuesta a la dosis para evaluar las múltiples alternativas de auxina como sustituto para el uso de 2,4-D como regulador del crecimiento en el algodón. Las auxinas alternativas evaluadas fueron 2,4-diclorprop, dicamba, y picloram. Estos compuestos se evaluaron con concentraciones de 0,2, 2,0, y 20,0 uM, respectivamente. Se usó 2,4-D como tratamiento de control a una concentración de 0,02 uM. El medio usado es el

medio base para la inducción de callos en algodón (Ejemplo 12). Más allá de la fase de cultivo inicial, se retira la auxina del medio para impulsar el tejido hacia el proceso de regeneración.

R-dicorprop no fue efectivo para la inducción de callos de segmentos cotiledonares y parece ser tóxico para las células de algodón con la menor concentración evaluada (0,02 uM). Dicamba induce efectivamente el crecimiento del callo con todas las concentraciones evaluadas (0,02-20 uM) y no tiene efectos tóxicos aparentes en este rango de concentraciones. La inducción de callo con picloram aumentó hasta un máximo cuando los explantes se trataron con 0,2 uM a 20 uM. La calidad del callo era consistente con el tratamiento con 2,4-D estándar en la concentración de picloram de 2 uM. Con la máxima concentración (20 uM) 2,4-D también era inhibidora de la generación y el crecimiento del callo de algodón.

El algodón ha demostrado capacidad inicial para responder de modo efectivo a auxinas alternativas (a 2,4-D) en cultivo. Con concentraciones lo suficientemente elevadas, 2,4-D es tóxico para explantes cotiledonares de algodón. Sorprendentemente R-diclorprop es significativamente más tóxico para el algodón que 2,4-D u otras auxinas. Se puede usar 2,4-D como agente de selección y en combinación con *AAD-12* (*v1*) como el gen marcador seleccionable. Otros sustitutos de auxina no metabolizables (por ejemplo, dicamba, picloram, R-mecoprop, NAA o IAA) permitirían el uso de *AAD-12* como un marcador seleccionable en dicotiledóneas con 2,4-D como agente de selección.

Referencias

- Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker, y D.V. Thompson.** 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36:289-300.
- Agrilience Crop Protection Guide.** 2005. Agrilience, LLC. San Pablo, MN. pág. 614.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, y D.J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Altschul, S. F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, y D.J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein databasesearch programs. *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- An, G., B.D. Watson, S. Stachel, M.P. Gordon, E. W. Nester.** 1985. New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4:277-284.
- Armstrong C.L., C.E. Green, R.L. Phillips.** 1991. Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genet Coop News Lett* 65:92-93.
- Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbas, y F.C. Kafatos.** 1983 *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman y K. Moldave [eds.] Academic Press, Nueva York 100:266-285.
- Birch R.G. y T. Franks.** 1991. Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:453-469.
- CDMS.** Crop Data Management Systems Labels and MSDS. Online. Internet. 13 de marzo de 2004. Disponible en net/manuf/manuf.asp.
- Chee P.P., K.A. Fober, J.L. Slightom.** 1989. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 91:1212-1218.

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

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

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

CPR: Crop Protection Reference. 2005 Chemical and Pharmaceutical Press, Nueva York, NY. pág. 2647.

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

Dietrich, Gabriele Elfriede (1998) Imidazolinone resistant AHAS mutants. Patente de los Estados Unidos No. 5.731.180.

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

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

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

El-Shemy A, M.Teraishi, M. Khalafalla, T. Katsube-Tanaka, S. Utsumi, M. Ishimoto. 2004. Isolation of soybean plants with stable transgene expression by visual selection based on green fluorescent protein *Molecular Breeding* 14:227-238.

El-Shemy A, M. Khalafalla, K. Fujita, M. Ishimoto. 2006. Molecular control of gene co-suppression of transgenic soybean. *J. Biochem. and Mole. Biol.* 39:61-67.

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

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

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

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

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

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

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

- Gianessi, L. R.** 2005 Economic and herbicide use impacts of glyphosate-resistant crops. *Pest. Manag. Sci.* 61:241-245.
- Heap, I.** The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. 18 de marzo de 2005 . Disponible en weedsience.com.
- Hiei Y., T. Komari, y T. Kubo.** 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Mol. Biol.* 35:205-218.
- Hiei, Y., T. Komari** (1997) Method for Transforming Monocotyledons. Patente de los Estados Unidos No. 5.591.616.
- Hinchee M.A.W., D.V. Conner-Ward, C.A. Newell, R.E. McDonnell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley, R.B. Horsch.** 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology* 6:915-922.
- Höfte, H. y H. R. Whiteley.** 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. 1989. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- Hoekema, A.** 1985. In: *The Binary Plant Vector System*, Offset-drukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Capítulo 5.
- Hogan, D.A.; S.R. Smith, E.A. Saari, J. McCracken, R.P. Hausinger.** 2000. Site-directed mutagenesis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/a-ketoglutarate dioxygenase. Identification of residues involved in metallocenter formation and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 275:12400-12409.
- Holsters, M., D. De Waele, A. Depicker, E. Messens, M. Van Montagu, y J. Schell.** 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen. Genet.* 163:181-187.
- Horsch, R., J. Fry, N. Hoffman, J. Neidermeyer, S. Rogers, y R. Fraley.** 1988. In *Plant Molecular Biology Manual*, S. Gelvin *et al.*, eds., Kluwer Academic Publishers, Boston

- Horvath, M., G. Ditzelmüller, M. Lodl, y F. Streichsbier.** 1990. Isolation and characterization of a 2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid-degrading soil bacterium. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 33:213-216.
- Jefferson, R. A. M. Bevan, y T. Kavanagh.** 1987. The use of *Escherichia coli* β -glucuronidase gene as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* 15:17-19.
- Karlin, S. y S.F. Altschul.** 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *PNAS* 87:2264-2268.
- Karlin, S. y S.F. Altschul.** 1993. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *PNAS* 90:5873-5877.
- Keller, G.H., y M.M. Manak.** 1987. *DNA Probes*. Stockton Press, Nueva York, NY, págs. 169-170.
- Khalafalla M, S. Rahman, H. El-Shemy, Y. Nakamoto, K. Wakasa, M. Ishimoto.** 2005. Optimization of particle bombardment conditions by monitoring of transient sGFP(S65T) expression in transformed soybean. *Breeding Sci.* 55:257-263.
- Khan M, L. Table, L. Heath , D. Spencer, T. Higgins.** 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Plant Physiol* 105:81-88.
- Kohler, H.P.E.** 1999. *Delftia acidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. *J. Ind Microbiol y Biotech.* 23:336-340.
- Li L, Qu R, Kochko A de, Fauquet CM, Beachy RN** (1993) An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep* 12:250–255
- Linsmaier, E.M. y F. Skoog** (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:100-127.

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

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

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

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

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

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

Martinell B.J., L.S. Julson, C.A. Emler, H. Yong, D.E. McCabe, E.J. Williams. 2002. Soybean *Agrobacterium* transformation method. Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 6384301

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

- Miller S.D., P.W. Stahlman, P. Westra, G.W. Wicks, R.G. Wilson, J.M. Tichota.** 2003. Risks of weed spectrum shifts and resistance to herbicide in glyphosate-resistant cropping systems. *Proc.West.Soc.Weed Sci.* 56:61-62.
- Muller R, S. Jorks, S. Kleinsteuber, W. Babel.** 1999. *Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. *Microbiol. Res.* 154:241-246.
- Muller T, S. Byrde, C. Werlen, J. Roelof van der Meer, H-P. Kohler.** 2004. Genetic Analysis of Phenoxyalkanoic Acid Degradation in *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10):6066-6075.
- Muller T, T. Fleischmann, J. Roelof van der Meer, H-P. Kohler.** 2006. Purification and Characterization of Two Enantioselective [α]-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases, RdpA and SpdA from *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(7):4853-4861.
- Muller T, M. Zavodszky, M. Feig, L. Kuhn, R. Hausinger.** 2006. Structural basis for the enantiospecificities of R- and S-specific phenoxypropionate/ [α]-ketoglutarate dioxygenases. *Protein Sci.* 15:1356-1368.
- Murashige T. y F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murphy G.P., T.E. Dutt, R.F. Montgomery, T.S. Willard, G.A. Elmore.** 2002. Control of horseweed with glyphosate. *Proc.North Cent.Weed Sci.Soc.* 57:194.
- Ng, C.H., R. Wickneswari, S. Salmigah, Y.T. Teng, y B.S. Ismail.** 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Res.* 43:108-115.
- Olhoft P.M. y D.A. Somers.** 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20: 706-711

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

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

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

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

Powles, S.B. y C. Preston. 2006. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Tech* 20:282-289.

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

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

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

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

- Schenk, R.U. y A.C. Hildebrandt** (1972) Methods and techniques for induction and growth of monocotyledeneous and dicotyledeneous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
- Sfiligoj, E.** 2004. Spreading resistance. *Crop Life*. Publicación de marzo.
- Simarmata, M., J.E. Kaufmann, y D. Penner.** 2003. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 51:678-682.
- Singh R.J., T.M. Klein, C.J. Mauvais, S. Knowlton, T. Hymowitz, C.M. Kostow.** Cytological characterization of transgenic soybean. *Theor. Appl. Genet.* 1998; 96:319-324.
- Smejkal, C.W., T. Vallaey, S.K. Burton, y H.M. Lappin-Scott.** 2001. Substrate specificity of chlorophenoxyalkanoic acid-degrading bacteria is not dependent upon phylogenetically related *tfdA* gene types. *Biol. Fertil. Sols* 33:507-513.
- Streber, W. y L. Willmitzer.** 1989. Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. *Bio/Technology* 7:811-816.
- Streber, W.R., K.N. Timmis, y M. H. Zenk.** 2000. Microorganisms and plasmids for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) monooxygenase formation and process for the production of these plasmids and strains. Patente de los Estados Unidos No. 6.153.401.
- Streber, W.R., K.N. Timmis, y M.H. Zenk.** 1987. Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetic monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J. Bacteriol.* 169:2950-2955.
- Suggs, S.V., T. Miyake, E.H. Kawashime, M.J. Johnson, K. Itakura, y R.B. Wallace.** 1981. *ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes*, D.D. Brown [ed.], Academic Press, Nueva York, 23:683-693.
- Terakawa T, H. Hisakazu, Y. Masanori.** 2005. Efficient whiskermediated gene transformation in a combination with supersonic treatment. *Breeding science* 55: 456- 358.

- Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, W. Mingbo, S. Thornton, y R. Bretell.** 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. Plant J. 11:1369-1376.
- Weigel, D. y J. Glazebrook.** 2002. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, N. Y. pág. 358.
- Weising, K., J. Schell, y G. Kahl.** 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. Ann. Rev. Genet. 22:421-477.
- Welter, M.E., D.S. Clayton, M.A. miler, y J.F. Petolino.** 1995. Morphotypes of friable embryogenic maize callus. Plant Cell Rep. 14:725-729.
- Westendorf A., D. Benndorf, R. Muller, W. Babel.** 2002. The two enantiospecific diclorprop/ α -ketoglutarate-dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1-protein and sequence data of *Rdpa* y *SdpA*. Microbiol. Res. 157:317-22.
- Westendorf, A., R.H. Muller, y W. Babel.** 2003. Purification and characterization of the enantiospecific dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1 initiating the degradation of phenoxypropionates and phenoxyacetate herbicides. Acta Biotechnol. 23:3-17.
- WSSA.** 2002. Herbicida Handbook (8^{va} ed). Weed Science Society of America. Lawrence, KS pág. 492.
- Zeng P, D. Vadnais, Z. Zhang, y J. Polacco.** 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Plant Cell Rep. 22: 478 – 482.
- Zhang S** (1995) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. Plant Cell Rep 15:68–71
- Zhang S, Chen L, Qu R, Marmey P, Beachy RN, Fauquet CM** (1996) Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. Plant Cell Rep 15:465–469.

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

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Wright, Terry R.
Lira, Justin M.
Walsh, Terence A.
Merlo, Donald J.
Jayakumar, Pon Samuel
Lin, Gaofeng
- <120> Nuevos Genes de Resistencia a Herbicidas
- <130> DAS-129XC1 PCT
- <150> US 60/731.044
<151> 28-10-2005
- <150> 60/945.183
<151> 20-06-2007
- <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 879
<212> ADN
<213> Delftia acidovorans

<400> 1

atgcagacga cgctgcagat tacccccaca ggcgccaccc tgggcgccac cgtcacccgc 60
gtgcacctgg ccacgctgga cgacgccggc ttgcgccccc tgcacgccgc ctggctgcag 120
catgcgctgc tgatcttccc cggccagcac ctcagcaacg accagcagat cacttttgcc 180
aaacgcttcg gcgcgatcga gcgcacggc ggcggcgaca tcgtggccat ctccaatgtc 240
aaggccgatg gcacggtgcg ccagcacagc cccgccgagt gggacgacat gatgaaggtc 300
atcgtcggca acatggcctg gcatgccgac agcacctaca tgcgggtgat ggcgcagggc 360
ggcgtgttct cggccgaagt ggtgcccgca gtgggcgggc gcaoctgctt cgcgcacatg 420
cgcgccgctt acgacgogct ggacgaggcc acccgcgccc tgggtgcacca gcgctcggcg 480
cggcattcgc tgggtgtattc gcagagcaag ctgggccatg tgcagcaggc cggctcggcc 540
tacatcggct acggcatgga caccaccgcc acgcccctgc gcccgctggt caaggtgcat 600
cccgagaccg gcgcgccctc gctgctgata ggccgccatg cccatgccat cccgggcatg 660
gacgcgcgcg aatccgagcg ctctctggaa ggccctggtcg actgggcctg ccaggcgcgcg 720
cgggtgcatg cccaccaatg ggccgccggc gacgtggtgg tgtgggacaa ccgctgcctg 780
ctgcaccgcg ccgagccctg ggatttcaag ctgcgcgggg tgatgtggca cagccgcctg 840
gccggccgcc ccgagaccga gggcgccgcc ctggtgtaa 879

<210> 2

<211> 292

<212> PRT

<213> Delftia acidovorans

<400> 2

Met Gln Thr Thr Leu Gln Ile Thr Pro Thr Gly Ala Thr Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Gly Val His Leu Ala Thr Leu Asp Asp Ala Gly Phe Ala
 20 25 30
 Ala Leu His Ala Ala Trp Leu Gln His Ala Leu Leu Ile Phe Pro Gly
 35 40 45
 Gln His Leu Ser Asn Asp Gln Gln Ile Thr Phe Ala Lys Arg Phe Gly
 50 55 60
 Ala Ile Glu Arg Ile Gly Gly Gly Asp Ile Val Ala Ile Ser Asn Val
 65 70 75 80
 Lys Ala Asp Gly Thr Val Arg Gln His Ser Pro Ala Glu Trp Asp Asp
 85 90 95
 Met Met Lys Val Ile Val Gly Asn Met Ala Trp His Ala Asp Ser Thr
 100 105 110
 Tyr Met Pro Val Met Ala Gln Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val Val
 115 120 125
 Pro Ala Val Gly Gly Arg Thr Cys Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala Tyr
 130 135 140
 Asp Ala Leu Asp Glu Ala Thr Arg Ala Leu Val His Gln Arg Ser Ala
 145 150 155 160
 Arg His Ser Leu Val Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Val Gln Gln
 165 170 175
 Ala Gly Ser Ala Tyr Ile Gly Tyr Gly Met Asp Thr Thr Ala Thr Pro
 180 185 190
 Leu Arg Pro Leu Val Lys Val His Pro Glu Thr Gly Arg Pro Ser Leu
 195 200 205
 Leu Ile Gly Arg His Ala His Ala Ile Pro Gly Met Asp Ala Ala Glu
 210 215 220
 Ser Glu Arg Phe Leu Glu Gly Leu Val Asp Trp Ala Cys Gln Ala Pro
 225 230 235 240
 Arg Val His Ala His Gln Trp Ala Ala Gly Asp Val Val Val Trp Asp
 245 250 255
 Asn Arg Cys Leu Leu His Arg Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys Leu Pro
 260 265 270
 Arg Val Met Trp His Ser Arg Leu Ala Gly Arg Pro Glu Thr Glu Gly
 275 280 285
 Ala Ala Leu Val
 290

<210> 3
<211> 882
<212> ADN
<213> Delftia acidovorans

<400> 3

atggctcaga ccactctcca aatcacaccc actggtgcca ccttgggtgc cacagtcaact	60
ggtgttcacc ttgccacact tgacgatgct ggtttgcgtg cctccatgc agcctggctt	120
caacatgcac tcttgatctt ccttgggcaa cacctcagca atgaccaaca gattaccttt	180
gctaaacgct ttggagcaat tgagaggatt ggcggagggtg acattgttgc catatccaat	240
gtcaaggcag atggcacagt gcgccagcac tctcctgctg agtgggatga catgatgaag	300
gtcattgttg gcaacatggc ctggcaogcc gactcaacct acatgccagt catggctcaa	360
ggagctgtgt tcagcgcaga agttgtccca gcagttgggg gcagaacctg ctttgcgtgac	420
atgagggcag cctacgatgc ccttgatgag gcaaccctgt ctcttgttca ccaaaggtct	480
gctcgtcaact cccttgtgta ttctcagagc aagttgggac atgtccaaca ggccgggtca	540
gcctacatag gttatggcat ggacaccact gcaactcttc tcagaccatt ggtcaagggtg	600
catcctgaga ctggaaggcc cagcctcttg atcggcogcc atgcccatgc catcctggc	660
atggatgcag ctgaatcaga gcgcttctt gaaggacttg ttgactgggc ctgccaggct	720
cccagagtcc atgctcacca atgggctgct ggagatgttg ttgtgtggga caaccgctgt	780
ttgtccacc gtgctgagcc ctgggatttc aagttgccac gtgtgatgtg gcactccaga	840
ctcgtggac gccagaaac tgagggtgct gccttggttt ga	882

<210> 4
<211> 293
<212> PRT

<213> Delftia acidovorans

<400> 4

Met Ala Gln Thr Thr Leu Gln Ile Thr Pro Thr Gly Ala Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Thr Val Thr Gly Val His Leu Ala Thr Leu Asp Asp Ala Gly Phe
 20 25 30
 Ala Ala Leu His Ala Ala Trp Leu Gln His Ala Leu Leu Ile Phe Pro
 35 40 45
 Gly Gln His Leu Ser Asn Asp Gln Gln Ile Thr Phe Ala Lys Arg Phe
 50 55 60
 Gly Ala Ile Glu Arg Ile Gly Gly Gly Asp Ile Val Ala Ile Ser Asn
 65 70 75 80
 Val Lys Ala Asp Gly Thr Val Arg Gln His Ser Pro Ala Glu Trp Asp
 85 90 95
 Asp Met Met Lys Val Ile Val Gly Asn Met Ala Trp His Ala Asp Ser
 100 105 110
 Thr Tyr Met Pro Val Met Ala Gln Gly Ala Val Phe Ser Ala Glu Val
 115 120 125
 Val Pro Ala Val Gly Gly Arg Thr Cys Phe Ala Asp Met Arg Ala Ala
 130 135 140
 Tyr Asp Ala Leu Asp Glu Ala Thr Arg Ala Leu Val His Gln Arg Ser
 145 150 155 160
 Ala Arg His Ser Leu Val Tyr Ser Gln Ser Lys Leu Gly His Val Gln
 165 170 175
 Gln Ala Gly Ser Ala Tyr Ile Gly Tyr Gly Met Asp Thr Thr Ala Thr
 180 185 190
 Pro Leu Arg Pro Leu Val Lys Val His Pro Glu Thr Gly Arg Pro Ser
 195 200 205
 Leu Leu Ile Gly Arg His Ala His Ala Ile Pro Gly Met Asp Ala Ala
 210 215 220
 Glu Ser Glu Arg Phe Leu Glu Gly Leu Val Asp Trp Ala Cys Gln Ala
 225 230 235 240
 Pro Arg Val His Ala His Gln Trp Ala Ala Gly Asp Val Val Val Trp
 245 250 255
 Asp Asn Arg Cys Leu Leu His Arg Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys Leu
 260 265 270
 Pro Arg Val Met Trp His Ser Arg Leu Ala Gly Arg Pro Glu Thr Glu
 275 280 285
 Gly Ala Ala Leu Val
 290

<210> 5
<211> 882
<212> ADN
<213> Delftia acidovorans

<400> 5
atggctcaga ctaccctgca gattaccccg actggtgcga ccctgggtgc aaccgttacc 60
ggcgttcacc tggcgactct ggatgacgca ggtttcgctg cgtgcacgc ggcttggtg 120
caacatgctc tcttgatitt cccaggtcag cacctgtcca acgaccagca aatcactttt 180
gcaaaacgct tcggtgcgat cgaacgtatc ggtggcgggtg atattgtggc gatctccaac 240
gtaaaagcgg atggtactgt acgtcagcac agcccggcgg agtgggacga tatgatgaag 300
gtgatcgtag gcaacatggc atggcatgct gacagcacct acatgccggt tatggcgtag 360
ggtgcgggtt tctctgctga agtggttccg gcagtgggcg gtcgcacctg ctctgcagac 420
atgcgtgcag cttacgacgc gttagacgaa gctaccgcgc cactggtaca ccagcgctct 480
gcgcgtcact ctctggtgta ttcccagagc aaactgggcc acgttcagca agcgggctcc 540
gcatatatcg gctacggtat ggataccact gcgacccgcg tcggtccgct ggtaaaagtg 600
catccgaaa ccggccgtcc gtctctctctg atcggccgtc acgctcatgc gattccgggt 660
atggacgcgg cagaatccga gcgtttctctg gaaggtctgg ttgattgggc ttgtcaggcg 720
ccgcgtgtgc atgtcacca gtgggcagct ggcgacgtgg ttgtatggga taaccgctgc 780
ctgcttcacc gtgcagaacc gtgggacttt aagctgccac gtgttatgtg gcacagccgt 840
ctggcaggcc gccagaaaac cgagggcgcg gctctggttt aa 882

<210> 6
<211> 16
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de secuenciación directo M13 sintetizado químicamente

<400> 6

gtaaaacgac ggccag

16

<210> 7

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de secuenciación inverso M13 sintetizado químicamente

<400> 7

caggaaacag ctatgac

17

<210> 8

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador PTU AAD-12 (v1) directo sintetizado químicamente

<400> 8

gaacagttag acatggtcta aagg

24

<210> 9

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador PTU AAD-12 (v1) inverso sintetizado químicamente

<400> 9

gctgcaacac tgataaatgc caactgg

27

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador PCR que codifica AAD-12 (v1) directo sintetizado químicamente

<400> 10

atggctcaga ccactctcca aa

22

<210> 11

<211> 20

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador PCR que codifica AAD-12 (v1) inverso sintetizado químicamente

<400> 11
agctgcatcc atgccaggga 20

<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de región directo que codifica SdpacodF: AAD-12 (v1) sintetizado químicamente

<400> 12
atggctcatg ctgccctcag cc 22

<210> 13
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de región inverso que codifica SdpacodR: AAD-12 (v1) sintetizado químicamente

<400> 13

cgggcaggcc taactccacc aa 22

<210> 14

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador “Ncol of Brady” sintetizado químicamente

<400> 14

tataccacat gtcgatcgcc atccggcagc tt 32

<210> 15

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador “Sacl of Brady” sintetizado químicamente

<400> 15

gagctcctat cactccgccg cctgctgctg cac 33

REIVINDICACIONES

1. Una célula vegetal transgénica que comprende un polinucleótido que codifica una proteína AAD-12 seleccionada del grupo formado por SEC ID NO:2, SEC ID NO:4, una variante de SEC ID NO:2, y una variante de SEC ID NO:4, teniendo dicha variante actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa y al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID NO:2 y SEC ID NO:4.
2. La célula de la reivindicación 1 en donde la expresión de dicho polinucleótido otorga a dicha célula una capacidad para convertir un herbicida de fenoxiacetato auxina a una molécula no herbicida.
3. La célula de la reivindicación 1 en donde la expresión de dicho polinucleótido otorga a dicha célula una capacidad para convertir un herbicida de piridiloxi auxina a una molécula no herbicida.
4. Una planta transgénica que comprende una pluralidad de células de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la expresión de dicho polinucleótido transforma a dicha planta en tolerante a dicho herbicida.
5. Un método para seleccionar al menos una célula vegetal transgénica de la reivindicación 1 en donde dicho método comprende aplicar un herbicida de ariloxialcanoato sobre y/o alrededor de dichas células vegetales transgénicas y a células vegetales carentes que carezcan de dicho polinucleótido, y permitir que dicha célula vegetal transgénica y dichas células vegetales carentes crezcan.

6. El método de la reivindicación 5 en donde dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal de una planta de cultivo transgénica que se cultiva en un campo, y dichas células carentes son células de una maleza que está creciendo en dicho campo.

7. El método de la reivindicación 5 en donde dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal transformada con dicho polinucleótido, y dichas células carentes son no transformantes, y todas dichas células se cultivan en medio de cultivo tisular.

8. Un método de control de las malezas, comprendiendo dicho método aplicar un herbicida 2,4-D a una planta de cultivo y a una maleza, comprendiendo dicha planta de cultivo una pluralidad de células vegetales de acuerdo con la reivindicación 1.

9. El método de la reivindicación 8, en donde dicha planta de cultivo es una planta de soja.

10. El método de la reivindicación 8, en donde dicha maleza es resistente al glifosato.

11. Un método para proteger una planta de cultivo del daño por parte de un herbicida de ariloxialcanoato dioxigenasa, comprendiendo dicho método cultivar una planta que comprende un gen AAD-12, y aplicar dicho herbicida a dicha planta.

12. El método de la reivindicación 11 en donde dicho herbicida es 2,4-D.

13. El método de la reivindicación 8 en donde dicha planta comprende además un gen de resistencia a glifosato, y dicho método comprende además aplicar glifosato a dicha planta y a dicha maleza.

14. El método de la reivindicación 13, comprendiendo además dicha planta un tercer gen de resistencia a herbicidas, y comprendiendo además dicho método aplicar un tercer herbicida a dicha planta y a dicha maleza.

15. Una planta transgénica que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una enzima que confiere resistencia a un herbicida de piridiloxi auxina.

16. La planta transgénica de la reivindicación 15, dicho polinucleótido también confiriendo resistencia a un herbicida de fenoxi auxina.

17. La planta de la reivindicación 16, dicho herbicida de fenoxi auxina seleccionado del grupo formado por 2,4-D y MCPA.

18. La planta de la reivindicación 15, dicha planta comprendiendo además al menos un gen de resistencia a herbicidas adicional.

19. Una planta que comprende un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, y SEC ID NO:5.

20. Un polinucleótido que codifica una proteína que tiene actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, y SEC ID NO:5, en donde dicho polinucleótido comprende una composición de codones que se optimiza para la expresión en una planta.

21. Una célula vegetal que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína que posee actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, y SEC ID NO:5.

22. Un método para seleccionar una célula vegetal transformada de la reivindicación 21 en donde dicho método comprende someter una pluralidad de células vegetales a transformación con dicho polinucleótido, luego cultivar dichas células en una concentración de un herbicida que permita a las células transformadas que expresan dicho polinucleótido crecer mientras destruye o inhibe el crecimiento de las células no transformadas, en donde dicho herbicida está seleccionado del grupo formado por un herbicida de fenoxi auxina y uno de piridiloxi auxina.

23. El método de la reivindicación 22 en donde dichas células son células de una planta y dicho método se usa para seleccionar una planta transformada.

24. Un método para controlar al menos una maleza en un campo, comprendiendo dicho método sembrar en dicho campo una semilla de al menos una planta transgénica, comprendiendo dicha planta

un polinucleótido heterólogo que codifica una enzima que confiere resistencia a un herbicida de piridiloxi auxina, y

un segundo polinucleótido heterólogo codifica (sic) una enzima que confiere resistencia a al menos un otro herbicida;

comprendiendo además dicho método aplicar a al menos una parte de dicho campo un primer herbicida seleccionado del grupo formado por un herbicida de piridiloxi auxina y un herbicida de fenoxi auxina; y aplicar dicho al menos un otro herbicida a dicha al menos una parte de dicho campo.

25. El método de la reivindicación 24 en donde dichos herbicidas se aplican en forma secuencial o concurrente.

26. El método de la reivindicación 24 en donde dicho primer herbicida es un herbicida de fenoxi auxina.

27. El método de la reivindicación 24 en donde dicho al menos un otro herbicida está seleccionado del grupo formado por acetoclor, acifluorfen, aloxidim, amidosulfuron, aminopirialid, atrazina, beflubutamid, bispiribac, butafenacil, cafenstrol, carfentrazona, clorimuron, clorotoluron, cinidon-etil, cletodim, clodinafop, clomazona, cloproxidim, clopiralid, cloransulam, cianazina, ciclosulfamuron, cicloxidim, cihalofop, daimuron, dicamba, diclofop, diclosulam, diflufenican, dimetenamid, diquat, ditiopir, diuron, etalfluralina, fenoxaprop, flazasulfuron, florasulam, fluazifop, flucarbazona, flufenacet, flufenican, flufenpir, flumetsulam, flumiclorac, flumioxazin, fluroxipir, flutiacet, fomesafen,

foramsulfuron, glufosinato, glifosato, halosafen, halosulfuron, haloxifop, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir, imazosulfuron, yodosulfuron, ioxinil, isoxaben, isoxaflutol, lactofen, linuron, mefenacet, mefluidida, mesosulfuron, mesotriona, metamifop, metazaclor, metosulam, metribuzina, MSMA, napropamida, nicosulfuron, norflurazon, orizalina, oxadiazon, oxifluorfen, paraquat, pebulato, pendimetalina, penoxsulam, picloram, picolinafen, pinoxaden, primisulfuron, profoxidim, propanil, piraflufen, pirazosulfuron, piribenzoxim, piriminobac, piritiobac, piroxasulfona, piroxsulam, quinclorac, quinmerac, quizalofop, rimsulfuron, setoxidim, simazina, sulcotriona, sulfentrazona, sulfometuron, tefuriltriona, tembotriona, tepraloxidim, terbacil, tiazopir, tidiazuron, tiencarbazona, tifensulfuron, tiobencarb, topramezone, tralcoxidim, triasulfuron, tribenuron, triclopir, trifloxisulfuron, trifluralina, triflusulfuron, y tritosulfuron.

28. Un método para ensayar en una proteína la capacidad para escindir un herbicida de piridiloxialcanoato, comprendiendo dicho método proveer una muestra que comprende dicha proteína y un herbicida de piridiloxi auxina, y ensayar en dicha muestra la presencia de un cloropiridinol.

29. Un método para ensayar en una proteína la actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa en donde dicho método comprende proveer una muestra que comprende dicha proteína y 2-(2-cloro,4-nitrofenoxi)propionato y/o acetato, y ensayar en dicha muestra la presencia de 2-cloro,4-nitrofenol.

30. Un casete de expresión heredable que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que degrada enzimáticamente al menos un herbicida seleccionado del grupo formado por una fenoxi auxina y una piridiloxi

auxina, en donde dicha molécula de ácido nucleico se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, y SEC ID NO:5.

31. El casete de expresión de la reivindicación 30 en donde dicho promotor es un promotor vegetal.

32. El casete de expresión de la reivindicación 30 que comprende un promotor seleccionado de un promotor de virus del mosaico de la vena de mandioca, un promotor de CaMV 35S, un promotor de Virus del Mosaico de Escrofularia, un promotor de actina de arroz, un promotor de faseolina, un promotor de Ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana*, un promotor de ubiquitina de maíz, un promotor de Act2 de *Arabidopsis thaliana*, un promotor de Ubiquitina 11 de *Arabidopsis thaliana*, y un promotor de Ubiquitina 3 de *Arabidopsis thaliana*.

33. El método de la reivindicación 24 en donde dicha planta es resistente a una formulación de herbicida que comprende glifosato.

34. Un método para controlar malezas en un campo, en donde dicho método comprende aplicar un primer herbicida a dicho campo y sembrar una semilla en dicho campo dentro de los 14 días de la aplicación de dicho primer herbicida, en donde dicha semilla comprende una célula de la reivindicación 1, y en donde dicho primer herbicida está seleccionado del grupo formado por una fenoxi auxina y una piridiloxi auxina.

35. El método de la reivindicación 34 en donde dicho primer herbicida es un ácido, una sal inorgánica, una sal orgánica, o un éster.

36. El método de la reivindicación 34 en donde dicha semilla comprende un segundo gen que transforma a dicha planta en resistente a un segundo herbicida, y dicho método comprende además aplicar dicho segundo herbicida a dicho campo antes de dicha siembra.

37. El método de la reivindicación 36 en donde dicho segundo herbicida está seleccionado del grupo formado por glifosato, gramoxona, y glufosinato.

38. Un método para detectar si una planta comprende un polinucleótido de la reivindicación 20 en donde dicho método comprende recolectar una muestra de dicha planta y ensayar en dicha muestra la presencia de dicho polinucleótido.

39. El método de la reivindicación 38 en donde dicho método comprende ensayar en dicha muestra la presencia de una proteína codificada por dicho polinucleótido.

40. El método de la reivindicación 38 en donde dicho método comprende usar una sonda o cebador de PCR para detectar la presencia de dicho polinucleótido.

41. El método de la reivindicación 39 en donde dicho método comprende usar un anticuerpo para detectar la presencia de dicha proteína.

42. La planta de la reivindicación 15 en donde dicha planta comprende además un gen de resistencia a insectos derivado de un organismo seleccionado del grupo formado por *Bacillus thuringiensis*, *Photorhabdus*, y *Xenorhabdus*.

43. La planta de la reivindicación 15 en donde dicha planta comprende además un gen para un rasgo agronómico seleccionado del grupo formado por resistencia fúngica, tolerancia al estrés, mayor rendimiento, perfil de aceite mejorado, calidad de la fibra mejorada, resistencia viral, retraso de la maduración, tolerancia al frío, y tolerancia a la sal.

44. Un método para controlar al menos una maleza en un campo, comprendiendo dicho método cultivar al menos una planta transgénica de la reivindicación 15 en dicho campo, y aplicar un herbicida de piridiloxi auxina a al menos una parte de dicho campo.

45. Un método para controlar al menos una maleza en un campo, comprendiendo dicho método cultivar al menos una planta de la reivindicación 16 en dicho campo, y aplicar un herbicida de fenoxi auxina a al menos una parte de dicho campo.

46. El método de la reivindicación 44, que comprende además aplicar un herbicida de fenoxi auxina a al menos una parte de dicho campo.

47. El método de la reivindicación 44, dicho herbicida de piridiloxi auxina seleccionado del grupo formado por fluroxipir y triclopir.

48. El método de la reivindicación 45, dicho herbicida de fenoxi auxina seleccionado del grupo formado por 2,4-D y MCPA.

49. El método de la reivindicación 45 en donde dicha planta es resistente a un herbicida seleccionado del grupo formado por glifosato,

glufosinato, imazetapir, clorsulfuron, dicamba, mesotriona, isoxaflutol, y butafenacil.

50. El método de la reivindicación 45 en donde dicho herbicida es una fenoxi auxina aquiral.

51. El método de la reivindicación 24 en donde dicha planta es una monocotiledónea.

52. El método de la reivindicación 51 en donde dicha monocotiledónea está seleccionada del grupo formado por maíz, arroz, trigo, cebada, centeno, césped de estación cálida y fría, avena, sorgo, y pastos forrajeros.

53. El método de la reivindicación 24 en donde dicho primer herbicida es una fenoxi auxina y dicha planta es una dicotiledónea.

54. El método de la reivindicación 53 en donde dicha dicotiledónea está seleccionada del grupo formado por algodón, tabaco, canola, y soja.

55. Un método para conferir resistencia a herbicidas a un cultivo en donde dicho método comprende introducir en al menos una célula vegetal de dicho cultivo un polinucleótido que codifica una enzima capaz de usar un herbicida de piridiloxi auxina y un herbicida de fenoxi auxina como sustrato.

56. Un método para controlar malezas resistentes a glifosato, naturalmente tolerantes a glifosato y/o naturalmente tolerantes a glufosinato en un campo de plantas de cultivo tolerantes a glifosato y/o glufosinato, en donde dichas

plantas comprenden un polinucleótido de la reivindicación 13, y dicho método comprende aplicar un herbicida de ariloxialcanoato a al menos a una parte de dicho campo.

57. El método de la reivindicación 56 en donde dicho herbicida es una fenoxi auxina.

58. El método de la reivindicación 57 en donde dicha fenoxi auxina es 2,4-D.

59. Un método para controlar malezas que son resistentes a un herbicida que inhibe ALS en un campo de plantas de cultivo que comprende un polinucleótido de la reivindicación 20, dicho método comprende aplicar un herbicida de ariloxialcanoato a al menos una parte de dicho campo.

60. La célula de la reivindicación 1 en donde dicha célula vegetal está seleccionada del grupo formado por células dicotiledóneas y células monocotiledóneas.

61. La célula de la reivindicación 60 en donde dicha célula vegetal es dicotiledónea y está seleccionada del grupo formado por una célula de algodón, una célula de tabaco, una célula de canola, una célula de soja, y una célula de *Arabidopsis*.

62. La célula de la reivindicación 60 en donde dicha célula vegetal es una célula monocotiledónea seleccionada del grupo formado por una célula de arroz y una célula de maíz.

63. La célula de la reivindicación 61 en donde dicho herbicida de piridiloxi auxina está seleccionado del grupo formado por fluroxipir y triclopir.

64. La planta de la reivindicación 4 en donde la expresión de dicho polinucleótido transforma a dicha planta en resistente tanto a un herbicida de fenoxiacetato auxina como a un herbicida de piridiloxi auxina.

65. El método de la reivindicación 8 en donde dicho método comprende aplicar un segundo herbicida.

66. El método de la reivindicación 22 en donde dicho herbicida 2,4-D y dicho segundo herbicida se aplican en forma secuencial.

67. El método de la reivindicación 22 en donde dicho primer herbicida y dicho segundo herbicida se aplican en forma concurrente.

68. El método de la reivindicación 8 en donde dicha planta es resistente a glifosato.

69. El método de la reivindicación 24 en donde dicho segundo polinucleótido es una EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) modificada.

70. El método de la reivindicación 24 en donde dicho primer herbicida es una fenoxi auxina y dicho segundo herbicida está seleccionado del grupo formado por glifosato y glufosinato.

71. El método de la reivindicación 70 en donde dicha fenoxi auxina es 2,4-D y dicho segundo herbicida es glifosato.

72. El método de la reivindicación 24 en donde dicho método comprende además aplicar un tercer herbicida.

73. Un polinucleótido optimizado para la expresión en una planta en donde dicho polinucleótido codifica una proteína que tiene actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, y SEC ID NO:5.

74. El polinucleótido de la reivindicación 44 en donde dicho polinucleótido está optimizado para la expresión en una planta dicotiledónea o en una planta monocotiledónea.

75. Un polinucleótido aislado que codifica una proteína que degrada enzimáticamente un herbicida seleccionado del grupo formado por una fenoxi auxina y una piridiloxi auxina, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento completo de una secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, y SEQ ID NO:5, en donde dicho polinucleótido está unido de modo operativo a un promotor que es funcional en una célula vegetal.

76. El polinucleótido de la reivindicación 75 en donde dicho promotor es un promotor vegetal.

77. El polinucleótido de la reivindicación 76 en donde dicho promotor es un promotor del virus del mosaico de la vena de la mandioca.

78. El método de la reivindicación 22 en donde dicho polinucleótido se usa como un marcador seleccionable.

79. Una semilla que comprende una célula vegetal de la reivindicación 1.

80. Una planta cultivada a partir de la semilla de la reivindicación 79.

81. Una parte regenerable, progenie, o propagación asexual de la planta de la reivindicación 4.

82. El método de la reivindicación 8 en donde dicho método se usa para tratar o prevenir malezas resistentes a herbicidas.

83. La planta de la reivindicación 4 en donde dicha planta comprende además un gen de resistencia a insectos derivado de un organismo seleccionado del grupo formado por *Bacillus thuringiensis*, *Photorhabdus*, y *Xenorhabdus*.

84. La planta de la reivindicación 4 en donde dicha planta comprende además un gen para un rasgo agronómico seleccionado del grupo formado por resistencia fúngica, tolerancia al estrés, mayor rendimiento, perfil de aceite mejorado, calidad de la fibra mejorada, resistencia viral, retraso de la maduración, tolerancia al frío, y tolerancia a la sal.

85. Un método para controlar malezas resistentes a glifosato en un campo de plantas de cultivo tolerantes a glifosato, en donde dichas plantas comprenden un polinucleótido de la reivindicación 20, y dicho método comprende aplicar un herbicida de ariloxialcanoato a al menos una parte de dicho campo.

86. El método de la reivindicación 85 en donde dicho herbicida es una fenoxi auxina.

87. El método de la reivindicación 25 en donde dichos herbicidas se aplican desde una mezcla en tanque.

88. El método de la reivindicación 10 en donde dicha al menos una de dichas malezas comprende al menos una planta voluntaria resistente a glifosato de una especie diferente a la de dicho cultivo transgénico.

Resumen

La presente invención provee nuevas plantas que no sólo son resistentes a 2,4-D, sino también a herbicidas de piridiloxiacetato. Hasta el momento, no había expectativas ni sugerencias de que se podía producir una planta con ambas de estas propiedades ventajosas mediante la introducción de un único gen. La presente invención también incluye plantas que producen una o más enzimas de la presente invención "apiladas" junto con uno o más de otros genes de resistencia a herbicidas. La presente invención permite usar nuevas combinaciones de herbicidas en nuevas formas. Además, la presente invención provee nuevos métodos para prevenir el desarrollo, y controlar, cepas de malezas que son resistentes a uno o más herbicidas tales como glifosato. En la presente se hace referencia a la enzima y al gen de preferencia para utilizar de acuerdo con la presente invención como AAD-12 (AriloxiAlcanoatoDioxigenasa). Este descubrimiento sumamente nuevo es la base de significativos rasgos de cultivos tolerantes a herbicidas y de oportunidades de marcadores seleccionables.

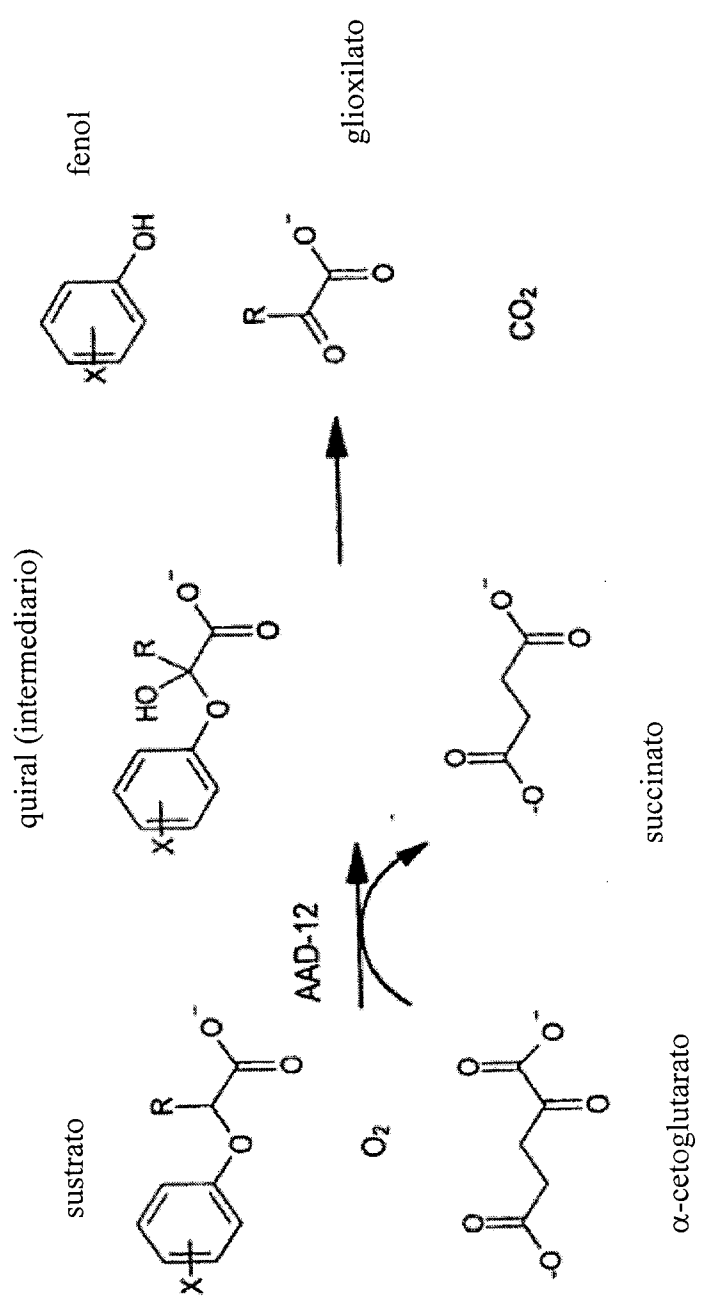


FIG. 1

AAD-12	1	10	20	30	40	50	60	70	80	
tfdA	1	-----MQTTLQITPTGATIGAVIGVHLAT-LDDAGFAALHAAWLQHALIFPGOHLNSNDQOITPFAKRRFG-----								
AAD-2	1	-----MSVVANEPHLEFAGVEDIDLREALGSTEVREIERLMDEKSNLVRGOPSQDQOIALAFARNFEGPLEG-----								
AAD-1	1	-----MTIALRQLOTHFVGQNSGLDRKPLTPGEAREVESAMDKYAVLVFHDQDITDECCQMAFALNFGQREDA-----								
taud	1	-----MHAALSPLSQRFERIAVQPLTGVIGAEITGVDRPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGCAITNECHLAESRRFG-----								
		-----MSERLSLITPLGPYICAOISCADLTRPLSDNQFEQLYHVLRHQVFLRDCAITPQQRALAQRRFG-----								
AAD-12	64	90	100	110	120	130	140	150	160	
tfdA	67	-----AIERIGGGDIVAISNVKADGTVRQHSAPAEWDDMMKVIVGNVWVHADSITYMPVMAQQGAVFSAEWPVAVGGRTCFADM-----								
AAD-2	69	-----GFIKVNQRFSRFKYAELADISNVSLDGKVAORDAREVVGNFANQLMHSDDSSSQQPAARYSMLSAAVVPPSPGGDTFECDM-----								
AAD-1	75	-----RGGTVTKEKDYRLQ-SGLNDVSNLKGDKPLAKDSRTHLFNLGNCLMHSDDSSSRFPIPAKFSLLSARVAVNPITGGNTEFADM-----								
taud	65	-----PVDVPVPLLLKSIIEGYPEVQMIRREANESGR-----VIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIDVPEHGGDTCEFLSM-----								
		-----ELHIHPVYPHAEQVDELIIVLDTHNDNPP-----DNDNWHITDVTELETPPAGAILAAKELPSTGGDTLWTS-----								
		*****	***	***	*****	*****	*****	*****	*****	
AAD-12	141	170	180	190	200	210	220	230	240	
tfdA	147	-----RAAYDALDEATRALVHQRSARHSLSVYSQS-----KLGHVQQAGSAYIGYGMDDTTATPPLPLVKVHPETGRPSLLIGR-RAH-----								
AAD-2	148	-----RAAYDALPRDLQSEIEGLRAEHYALNSRF-----LLGDDTDYSEAQRNAMPFVNWPLVTRTHAGSGRKFLFIGA-HAS-----								
AAD-1	144	-----RAAYDALDDETKNEIEDLVCEHSLMYSRG-----SLGFTEYIDEEEKQMFKEVQRLVTRTHPVHRKSLYLSS-HAG-----								
taud	132	-----YTAWETLSPTMQATIEGLNVVHSATRVFGSLYQAQNRFRFSNTSVKVMDDVDAGDRETVPPLVWTHPESGRKGLVNVQVYCQ-----								
		-----IAAYEALSVPPFRQLLSGLRAEHDFRKSFPP-----EYKVRKTEEHQWRREAVAKNPFLEHPPVTRTHPVSGKQALFVNEGFTT-----								
		*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
AAD-12	216	250	260	270	280	290	300	310		
tfdA	217	-----AIPGMDAAESERFLEGLVDWAQAPRVHAHQAAAGDVVMDNRCLLHRAEPWDFKLPFVVMWHSRLAGRPETEGAALV-----								
AAD-2	218	-----HVEGLPVAEGRMLLAELLEHAHQREFEVYVHRWNVGCLVMDNRCVILHGRGRRYDISARRELRRAATLDDAVV-----								
AAD-1	224	-----KIASMSVPEGRILLRLDLEHAHQPEFVYVHKWKLHDLVMDNRCQVHRVRRYDQSQPDRRAATVAGTEFTVQQQAAE-----								
taud	209	-----RTEGMTDAESKPLIQFLYEHAHQTRFDFTORVRWKKQVQLVMDNLCVTHRAVDFDYAGKFRYLTFTTVGGVRRPAR-----								
		-----RIVDVSEKESEALLSFLFAHITKPEFOVRWRWQPNDAIANDNEVITQHYANADYLPQRRINHRATILGDKPFYRAG-----								
		*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

FIG. 2

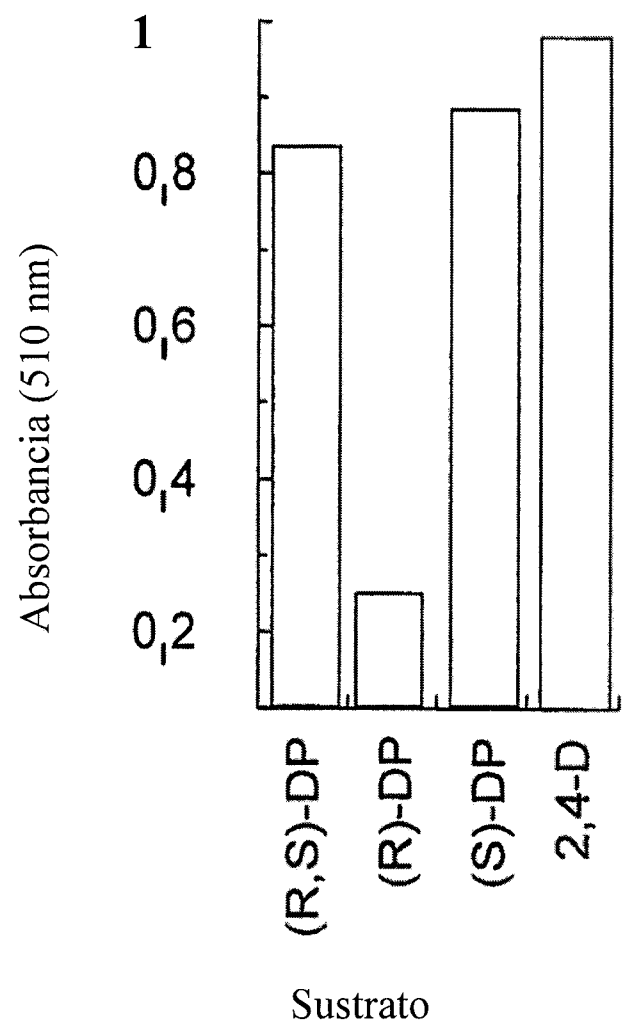


FIG. 3



(21) N° de solicitud:	(51) Int. Cl.:
22) Fecha de solicitud:	(71) Solicitante(s) DOW AGROSCIENCES LLC
(30) Prioridad (31) N° Prioridad 60/731.044 (32) Fecha 28/10/2005 (33) País US	(72) Inventor(es) TERRY R. WRIGHT JUSTIN M. LIRA TERENCE ANTHONY WALSH DONALD J. MERLO PON SAMUEL JAYAKUMAR GAOFENG LIN
	(74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 02/01/2008	(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 27/10/2006 No. de solicitud PCT/US2006/042133	Fecha: 10/05/2007 No. publicación: WO 2007/053482 A2
(54) Título: NUEVOS GENES DE RESISTENCIA A HERBICIDAS	

Reivindicación(es):

1. Una célula vegetal transgénica que comprende un polinucleótido que codifica una proteína AAD-12 seleccionada del grupo formado por SEC ID NO:2, SEC ID NO:4, una variante de SEC ID NO:2, y una variante de SEC ID NO:4, teniendo dicha variante actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa y al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID NO:2 y SEC ID NO:4.
2. La célula de la reivindicación 1 en donde la expresión de dicho polinucleótido otorga a dicha célula una capacidad para convertir un herbicida de fenoxiacetato auxina a una molécula no herbicida.
3. La célula de la reivindicación 1 en donde la expresión de dicho polinucleótido otorga a dicha célula una capacidad para convertir un herbicida de piridiloxi auxina a una molécula no herbicida.
4. Una planta transgénica que comprende una pluralidad de células de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la expresión de dicho polinucleótido transforma a dicha planta en tolerante a dicho herbicida.
5. Un método para seleccionar al menos una célula vegetal transgénica de la reivindicación 1 en donde dicho método comprende aplicar un herbicida de ariloxialcanoato sobre y/o alrededor de dichas células vegetales transgénicas y a células vegetales carentes que carezcan de dicho polinucleótido, y permitir que dicha célula vegetal transgénica y dichas células vegetales carentes crezcan.
6. El método de la reivindicación 5 en donde dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal de una planta de cultivo transgénica que se cultiva en un campo, y dichas células carentes son células de una maleza que está creciendo en dicho campo.
7. El método de la reivindicación 5 en donde dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal transformada con dicho polinucleótido, y dichas células carentes son no transformantes, y todas dichas células se cultivan en medio de cultivo tisular.
8. Un método de control de las malezas, comprendiendo dicho método aplicar un herbicida 2,4-D a una planta de cultivo y a una maleza, comprendiendo dicha planta de cultivo una pluralidad de células vegetales de acuerdo con la reivindicación 1.
9. El método de la reivindicación 8, en donde dicha planta de cultivo es una planta de soja.
10. El método de la reivindicación 8, en donde dicha maleza es resistente al glifosato.
11. Un método para proteger una planta de cultivo del daño por parte de un herbicida de ariloxialcanoato dioxigenasa, comprendiendo dicho método cultivar una planta que comprende un gen AAD-12, y aplicar dicho herbicida a dicha planta.
12. El método de la reivindicación 11 en donde dicho herbicida es 2,4-D.
13. El método de la reivindicación 8 en donde dicha planta comprende además un gen de resistencia a glifosato, y dicho método comprende además aplicar glifosato a dicha planta y a dicha maleza.
14. El método de la reivindicación 13, comprendiendo además dicha planta un tercer gen de resistencia a herbicidas, y comprendiendo además dicho método aplicar un tercer herbicida a dicha planta y a dicha maleza.
15. Una planta transgénica que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una enzima que confiere resistencia a un herbicida de piridiloxi auxina.
16. La planta transgénica de la reivindicación 15, dicho polinucleótido también confiriendo resistencia a un herbicida de fenoxi auxina.
17. La planta de la reivindicación 16, dicho herbicida de fenoxi auxina seleccionado del grupo formado por 2,4-D y MCPA.

CASTELLANOS & CO LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo, Industria y Turismo

E. S. D.

Ref.: **PODER** conferido por **DOW AGROSCIENCES LLC**

Yo, **XIMENA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente manifiesto a Uds. que sustituyo en la Dra. **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, el poder que me confirió **DOW AGROSCIENCES LLC**, con domicilio en **9330 Zionsville Road, Indianápolis, IN 46268-1054, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**, debidamente legalizado por Apostilla bajo el No. **A2007-01010**, el día **17 de Enero de 2007**, con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de patente PCT Entrada en Fase Nacional, para: **“NUEVOS GENES DE RESISTENCIA A HERBICIDAS.-**

Del Señor Jefe,

Acepto


Ximena Castellanos Abondano
C.C. No. **39.773.330** de Usaquén
T.P.A. No. **58.236** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá
PBX: 610 74 20

Bogotá, D.C.
XCA/MCA/gcb/P1602


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Usaquén
T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá
PBX: 610 74 20

**AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL**
(Art. 84 C.P.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)

Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo
de esta ciudad compareció personalmente:
Ximena Castellanos
Identificado con C.C. **39773335**
y tarjeta profesional
del Consejo
de la Jurisprudencia, con documento di-
fusa nuestra en este escrito es
suya.

Ximena Castellanos
Firma del declarante

En Bogotá D.C. a **27 MAYO 2008**
AUTORIZO ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO JOAQUIN



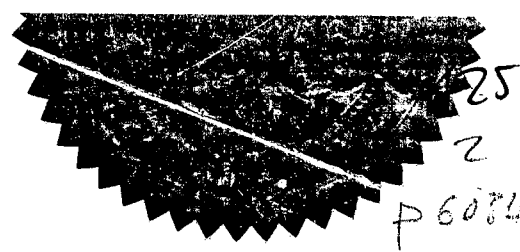
**AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL**
(Art. 84 C.P.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)

Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo
de esta ciudad compareció personalmente:
Margarita Castellanos
Identificado con C.C. **39779654**
y tarjeta profesional
del Consejo
de la Jurisprudencia, con documento di-
fusa nuestra en este escrito es
suya.

Margarita Castellanos
Firma del declarante

En Bogotá D.C. a **27 MAYO 2008**
AUTORIZO ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO JOAQUIN





PODER

El (los) DOW AGROSCIENCES LLC
Domiciliados en 9330 Zionsville Road
Indianapolis, IN 46268-1054, ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Carrera 9 No. 93-09, Bogotá-Colombia para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso -administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Para la obtención de registros sanitarios; c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan, pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado hoy 20 de Diciembre de 2006

en Indianapolis, Indiana, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

por DOW AGROSCIENCES LLC

Andrea T. Borucki, Esq.

Consultor General de Patentes

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned DOW AGROSCIENCES LLC
Of 9330 Zionsville Road
Indianapolis, IN 46268-1054 U.S.A.

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Carrera 9 No. 93-09, Bogota- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtention of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights; b) For the obtention of Sanitary registrations; c) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us; and that in all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Dec 20, 2006

Given and signed this

in Indianapolis, Indiana, U.S.A.

by

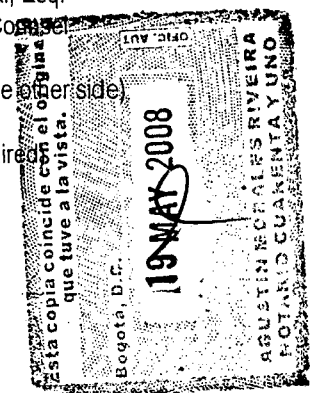
Andrea T. Borucki

Andrea T. Borucki, Esq.

General Patent Counsel

(Notary shall execute on the other side)

(Consular legalization required)



ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.

ABOGADOS COLOMBIA

Carrera 9 No. 93-09- P.O.Box 6349 - Bogotá, Colombia
Tels.: (571) 610 74 20 / 60 / 80 - Fax (571) 610 07 06 - e-mail acastell@impsat.net.co

COLOMBIA

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

Hoy 20 de Dic. del año 2006
compareció (eron) personalmente
a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en
representación de la Sociedad (Compañía denominada
DOW AGROSCIENCES LLC

Certifico:

- a) Que DOW AGROSCIENCES LLC
es una sociedad/Compañía legalmente
constituida y existente de acuerdo con las leyes de
Estado de Delaware
- b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
9330 Zionsville Road, Indianapolis,
IN 46268-1054, ESTADOS UNIDOS DE AMER..
- c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el
presente poder están comprendidos dentro del objeto
social de la mencionada Sociedad /Compañía.

d) Que el Sr. Andrea T. Borucki, Esq.
esta autorizado para otorgar el presente poder. Lo anterior
esta probado por medio de los siguientes documentos, que
certifico he visto*

(Ciudad)

(Estado)

Hoy 20 del Diciembre de 2006

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL (Corporation)

On this 20th day of December of 2006
personally appeared Andrea T. Borucki, Esq.,
whom I know to be the person(s) who signed this
document as representative(s) of the Corporation
/Company named DOW AGROSCIENCES LLC

I certify:

- a) That DOW AGROSCIENCES LLC is a corporation
(Company legally constituted and in existence in
accordance with the laws of the State of Delaware;
- b) That the domicile of said Corporation/Company is
9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054,
U.S.A.;
- c) That the purpose or purposes for which the present
Power of Attorney is granted are comprised within the
object set forth in the charter of the mentioned
Corporation/Company.
- d) That Ms. Andrea T. Borucki, Esq.
is (are) authorized to grant the present Power of Attorney.
The aforementioned was duly proven through the following
documents and I duly certify having seen them*:

(City) Indianapolis

(State) Indiana

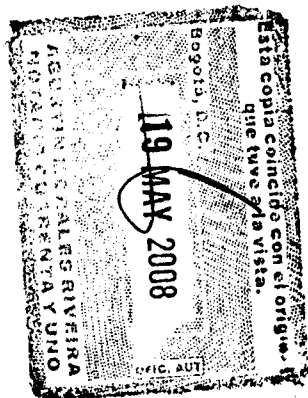
this 20th day of December of the year
2006.

Lydia S. Owens

(Notary Public)

LYDIA S. OWENS
NOTARY PUBLIC STATE OF INDIANA
HENDRICKS COUNTY
MY COMMISSION EXP. MAR 5 2008

*Documents must be identified with date and origin



ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.

ABOGADOS COLOMBIA

Carrera 9 No. 93-09- P.O.Box 6349 - Bogotá, Colombia
Tels.: (571) 610 74 20 / 60 / 80 - Fax (571) 610 07 06 - e-mail acastell@impsat.net.co

XC/cm

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA



Todd Rokita
Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

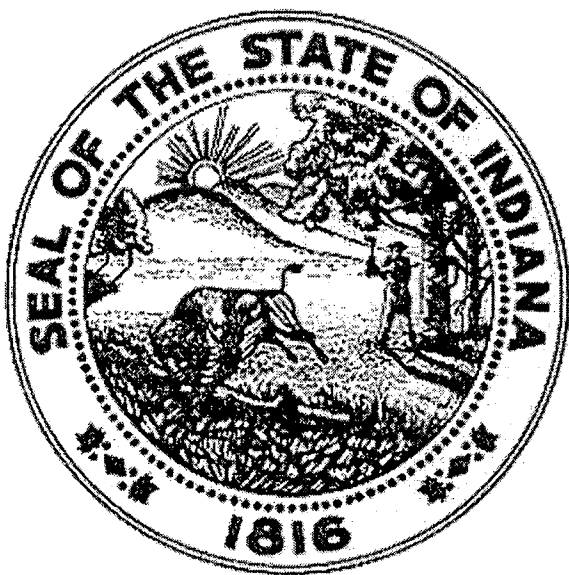
1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Lydia S. Owens*
3. acting in the capacity of notary public in & for *Hendricks County*
4. and bears the seal/stamp of notary public in & for the State of Indiana

Certified

5. at Indianapolis, Indiana
6. this *Twenty-sixth* day of *January, 2007*
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. A2007 - 01655

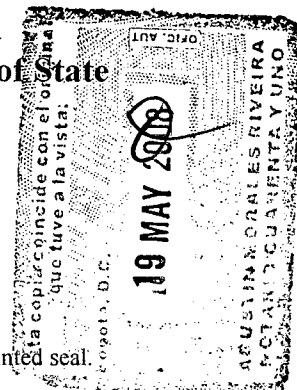
9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Todd Rokita

Todd Rokita
Indiana Secretary of State



*Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

-----TRADUCCION OFICIAL No. 07-0213-----

De un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello y firma de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia.-----

(Anexos a un documento de poder de Dow AgroSciences LLC)

(fdo) ilegible

(Sello): Lydia S. Owens

Notario Público – Estado de Indiana

Condado de Hendricks

Mi comisión vence Marzo 5, 2008

SECRETARIO DE ESTADO

ESTADO DE INDIANA

Todd Rokita

Secretario de Estado

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

APOSTILLA

(Convención de La Haya de Octubre 5, 1961)

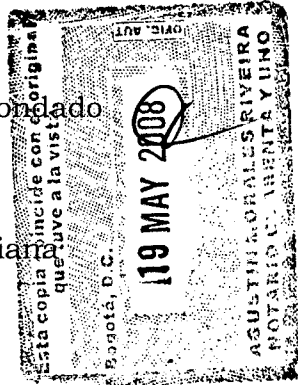
1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por: Lydia S. Owens

3. actuando en su carácter de: Notario Público en y para el Condado de Hamilton

3. lleva el sello del Notario Público en y para el Estado de Indiana



DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

CERTIFICADO:

- 5. en Indianápolis, Indiana
- 6. el día veintiseis de Enero de 2007
- 7. por el Secretario de Estado de Indiana
- 8. No. A-2007-01655

9. Sello

10. Firma:

(fdo) ilegible

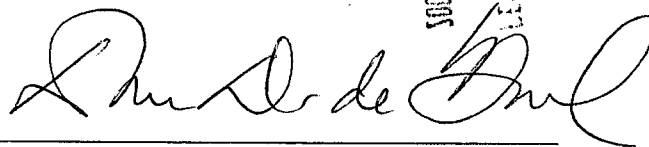
(sello)

Todd Rokita

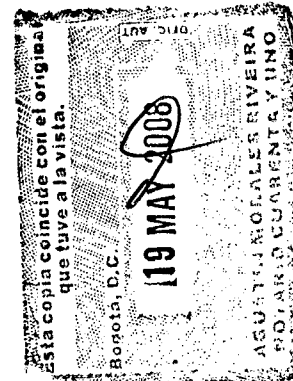
Secretario de Estado de Indiana

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Febrero 27, 2007.



DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA





Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

**REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION
DEL TRÁMITE**

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	(X)	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	()
- Descripción de la invención	(X)	()
- Dibujos de ser estos pertinentes	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	(X)	()

COMPLETA (X) INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

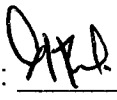
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

EZQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica del Esquema de Trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma responsable: 

Fecha: 14040 21-08