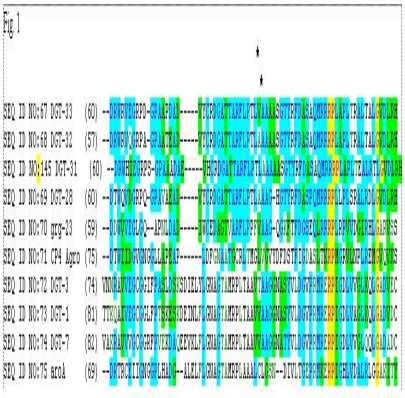
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación	14 187795 0000 0000	2014-08-27 10:51:33	
Trámite	11	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	
Evento	378	FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I	
Actuación	411	PRESENTACION	Folios: 323
Dependencia	2020	DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	
Pago #1	91459	$ 1343300	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT



1	**Titulo de la Invención**(200 caractares o espacios máximos)		
PLANTAS RESITENTES AL GLIFOSATO Y MÉTODOS ASOCIADOS			
2	**Datos del Solicitante / Titular**		
Nombre:	DOW AGROSCIENCES LLC.	**Dirección Electrónica:**	clientes@cavelier.com
Dirección:	9330 ZIONSVILLE ROAD, INDIANAPOLIS, INDIANA 46268, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	**Domicilio/País de constitución:**	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA - INDIANA - INDIANAPOLIS

Identificación:

- ☐ CEDULA DE CIUDADANIA
- ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
- ☒ EMPRESA EXTRANJERA
- ☐ NIT
- ☐ PASAPORTE

Número:	155945-		

3	**Solicitantes**		
	Apellidos - Nombres o Razón Social	**Tipo**	**Identificación**
1.	DOW AGROSCIENCES LLC.	EE	155945

4	**Datos del Inventor**			
	Nombre:	Justin M LIRA	**Dirección Electrónica:**	clientes@cavelier.com
	Dirección:	8974 Windpointe Pass, Zionsville, Indiana 46077, Estados Unidos de America	**Domicilio/País de constitución:**	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA - INDIANA - INDIANAPOLIS

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA
☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA
☐ NIT
☐ PASAPORTE
☒ No Aplica

Número: -

5	**Inventor(es)**	
	Apellidos - Nombres	**Domicilio**
1.	LIRA Justin M	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2.	CICCHILLO Robert M	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
3.	YERKES Carla	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
4.	ROBINSON Andrew E	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

6	**Datos Inventor(es)**			
	País de Residencia	**Departamento/Estado**	**Ciudad**	**Dirección**

1.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	INDIANA	INDIANAPOLIS	8974 Windpointe Pass, Zionsville, Indiana 46077, Estados Unidos de America
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	INDIANA	WESTFIELD	553 Stafford Drive, Westfield, Indiana 46074, Estados Unidos de America
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	INDIANA	CRAWFORDSVILLE	4571 South State Road 47, Crawfordsville, Indiana 47933, Estados Unidos de America
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	INDIANA	BROWNSBURG	7623 Hickory Road, Brownsburg, Indiana 46112, Estados Unidos de America

7	**Datos del Representante Legal / Apoderado**			
Nombre:	LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	**Dirección Electrónica:**	cavelier@cavelier.com	
Dirección:	Carrera 4 No. 72-35	**Domicilio/País de constitución:**	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.	
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE **Número:** 35456344-				

Presentación de Poder	
Año de Radicación	
Número de Radicación	

8	**Datos Solicitud: PCT / WO**		
Número Solicitud:	PCT/US2013/024410	**Fecha Solicitud:**	01/02/2013
Número Publicacion:	WO 2013/116700 A1	**Fecha Publicacion:**	08/08/2013

9	**Declaraciones de prioridad**	☒ SI ☐ NO

	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/593,555	01/02/2012
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/625,222	17/04/2012

10	**Reivindicaciones**		
Número reivindicaciones:	39	**Pago Reivindicaciones:**	Si

11 Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolucón vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

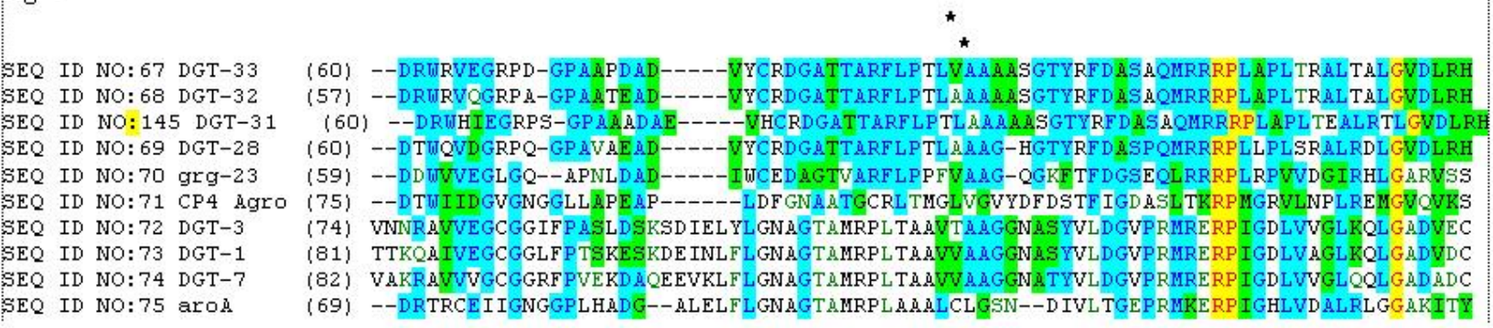
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas
☐ Universidades públicas o privadas
☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12 Documentos Anexos

☒ Reivindicaciones
☒ Descripción
☒ Dibujos y/o Figuras
☒ Resumen
☐ Certificado Depósito Material Biológico
☐ Uso de Conocimiento tradicional
☒ Listado de secuencias
☒ Artes finales 12 x 12 cm
☒ Poderes, si fuere el caso
☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
☒ Otros Anexos

Fig. 1


SEQ ID NO:67 DGT-33 (60) --DRWRVEGRPD-GPAAPDAD-----VYCRDGATTARFLPTLVAAAASGTYRFDASAQMRRRPLAPLTRALTALGVDLRH
SEQ ID NO:68 DGT-32 (57) --DRWRVQGRPA-GPAATEAD-----VYCRDGATTARFLPTLAAAAASGTYRFDASAQMRRRPLAPLTRALTALGVDLRH
SEQ ID NO:145 DGT-31 (60) --DRWHIEGRPS-GPAAADAE-----VHCRDGATTARFLPTLAAAAASGTYRFDASAQMRRRPLAPLTEALRTLGVDLRH
SEQ ID NO:69 DGT-28 (60) --DTWQVDGRPQ-GPAVAEAD-----VYCRDGATTARFLPTLAAAG-HGTYRFDASPQMRRRPLLPLSRALRDLGVDLRH
SEQ ID NO:70 grg-23 (59) --DDWVVEGLGQ--APNLDAD-----IWCEDAGTVARFLPPFVAAG-QGKFTFDGSEQLRRRPLRPVVDGIRHLGARVSS
SEQ ID NO:71 CP4 Agro (75) --DTWIIDGVGNGGLLAPEAP------LDFGNAATGCRLTMGLVGVYDFDSTFIGDASLTKRPMGRVLNPLREMGVQVKS
SEQ ID NO:72 DGT-3 (74) VNNRAVVEGCGGIFPASLDSKSDIELYLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADVEC
SEQ ID NO:73 DGT-1 (81) TTKQAIVEGCGGLFPTSKESKDEINLFLGNAGTAMRPLTAAVVAAGGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVAGLKQLGADVDC
SEQ ID NO:74 DGT-7 (82) VAKRAVVVGCGGRFPVEKDAQEEVKLFLGNAGTAMRPLTAAVVAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLQQLGADADC
SEQ ID NO:75 aroA (69) --DRTRCEIIGNGGPLHADG--ALELFLGNAGTAMRPLAAALCLGSN--DIVLTGEPRMKERPIGHLVDALRLGGAKITY

Expediente fiscal 2971-P10153.1US (68831)

VÍA ARCHIVO ELECTRÓNICO
XXXXX

APLICACIÓN PARA PATENTE

para

PLANTAS RESITENTES AL GLIFOSATO Y MÉTODOS ASOCIADOS

Inventores:

Justin Lira
Robert Cicchillo
Carla Yerkes
Andrew Robinson

PLANTAS RESITENTES AL GLIFOSATO Y MÉTODOS ASOCIADOS

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente divulgación trata de la biotecnología vegetal. Casos particulares relacionados con los polipéptidos nuevos involucrados en el metabolismo de N-(fosfonometil) glicina, un ácido nucleico que codifica dichos polipéptidos. Casos particulares relacionados con plantas, partes de la planta y células vegetales que comprenden polipéptidos y/o ácidos nucleicos anteriores.

GENERAL

[0002] Las diferentes especies de maleza siempre han sido un problema en los campos cultivados. Aunque el control de la maleza puede ser una operación intensa, ésta se ha visto facilitada gracias a la disponibilidad de herbicidas químicos que acaban con ésta. El uso de herbicidas, junto con variedades mejoradas de cultivo y fertilizantes, implica una importante contribución a la "revolución verde" en la agricultura. Son especialmente útiles los herbicidas que poseen un amplio espectro de actividad herbicida. Desafortunadamente, los herbicidas de amplio espectro tienen un efecto perjudicial en los cultivos expuestos al herbicida. Una manera de solucionar este problema sería produciendo plantas de cosecha tolerantes a un amplio abanico de herbicidas.

[0003] Un ejemplo de herbicida de amplio espectro es N-fosfonometilglicina, también conocido como glifosato. El glifosato ha sido muy utilizado por los agricultores de todo el mundo para controlar la maleza antes de la siembra, por ejemplo, en la agricultura sin labranza. Además, el glifosato es un medio eficaz para controlar la maleza entre los ciclos de producción y rotaciones de la cosecha. El glifosato no se transmite a los suelos después de su uso y es considerado como uno de los herbicidas químicos más seguros para el medio ambiente y más efectivos disponibles para su uso en la agricultura.

[0004] El glifosato mata las plantas inhibiendo la vía metabólica del ácido siquímico. Esta vía lleva a una biosíntesis de componentes aromáticos, incluyendo aminoácidos, vitaminas y hormonas vegetales. El glifosato bloquea la condensación de ácido fosfoenolpirúvico (PEP) y ácido 3-fosfosiquímico a ácido 5-enolpiruvil-3-fosfosiquímico uniéndose a una actividad inhibidora de

la síntesis de la enzima 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato, comúnmente conocida como "síntesis EPSP" y "EPSPS".

[0005] Desafortunadamente, no se conoce ningún cultivo vegetal naturalmente tolerante al glifosato y por lo tanto, el uso de dicho herbicida para el control de la maleza en campos cultivados, está limitado. Un método para producir un cultivo tolerante al glifosato es introduciendo un gen que codifica una forma de gen EPSPS tolerante al glifosato en la planta de cultivo usando la técnica de ingeniería genética. Usando mutagénesis química, se han producido EPSPS en bacterias tolerantes al glifosato y los genes heterólogos fueron introducidos en las plantas para producir plantas tolerantes al glifosato. *Véase, por ejemplo,* Comai *et al*. (1983) Science 221:370-71. Los genes EPSPS heterólogos pueden estar sobreexpresados en las plantas de cultivo para obtener el nivel de tolerancia deseado.

[0006] Los ejemplos anteriores de las técnicas y limitaciones relacionadas están pensados para ser ilustrativos y no exclusivos. Otras limitaciones de las técnicas relacionadas resultarán evidentes para los expertos tras leer las especificaciones.

BREVE RESUMEN

[0007] En la presente se describen los polipéptidos aislados con un mínimo de 90% de identidad a Nº ID DE SEC: 1 y ácidos nucleicos que codifican un polipéptido con un mínimo de 90% de identidad a Nº ID DE SEC: 1 (*por ejemplo*., Nº ID DE SEC: 2-4). También se describen plantas, partes de plantas, órganos vegetales, semillas y células vegetales que comprenden un polipéptido heterólogo con un mínimo de 90% de identidad a Nº ID DE SEC: 1.

[0008] Algunas realizaciones incluyen una planta, una parte de una planta, un órgano vegetal, una semilla y/o una célula vegetal que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido con un mínimo de 90% de identidad a Nº ID DE SEC:1. En particular, el ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia de nucleótidos con un mínimo de 80% de identidad de secuencia a Nº ID DE SEC: 2 o Nº ID DE SEC: 3. Algunas realizaciones incluyen una planta, una parte de una planta, un órgano vegetal, una semilla y/o una célula vegetal que comprende un ácido nucleico heterólogo que hibridiza a otro ácido nucleico teniendo Nº ID DE SEC: 2 o Nº ID DE SEC: 3 bajo condiciones exigentes. Ejemplos: la planta, la parte de una planta, el órgano vegetal, la semilla y/o la célula vegetal que comprende un ácido nucleico heterólogo que hibridiza a otro ácido nucleico con Nº ID DE SEC: 2: o Nº ID DE SEC: 3 bajo condiciones exigentes, comprende un

polipéptido codificado por el ácido nucleico heterólogo que confiere tolerancia al glifosato (o aumenta la tolerancia al glifosato) a la planta, parte de la planta, órgano vegetal, semilla y/o célula vegetal.

[0009] En más usos, la divulgación se relaciona con los métodos de generar una planta, parte de una planta, órgano vegetal, semilla y/o célula vegetal resistente al glifosato que comprende: transformar una planta, parte de una planta, órgano vegetal, semilla y/o célula vegetal con un ácido nucleico que codifica un polipéptido con un mínimo de 90% de identidad a Nº ID DE SEC:1; y que expresa el ácido nucleico para producir el polipéptido con un mínimo de 90% de identidad a Nº ID DE SEC:1.

[0010] Otros usos incluyen vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido con un mínimo de 90% de identidad a Nº ID DE SEC: 1. Ejemplos incluyen vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido con un mínimo de 95% de identidad a Nº ID DE SEC: 1. Por ejemplo, un vector puede comprender una secuencia de ácido nucleico con un mínimo de 90% de identidad a Nº ID DE SEC: 2 o Nº ID DE SEC: 3.

[0011] Usos particulares incluyen plantas y células vegetales tolerantes al glifosato que cuentan con un polipéptido heterólogo con un mínimo de 90% de identidad a Nº ID DE SEC: 1.

[0012] Usos adicionales incluyen métodos para controlar la maleza en un campo o área bajo cultivo que contiene plantas resistentes al glifosato. Dicho método comprende: plantar una planta o semilla que comprenda un ácido nucleico que codifique un polipéptido heterólogo con un mínimo de 90% de identidad Nº ID DE SEC: 1 en el campo o área de cultivo y aplicar en dicho campo o área, suficiente glifosato para controlar la maleza sin afectar demasiado a la planta.

[0013] En algunos casos, la descripción se refiere a las células regenerables para su uso en el cultivo de tejidos de plantas resistentes a glifosato. Dichos cultivo de tejidos podría regenerar plantas con características fisiológicas o morfológicas de las anteriores plantas resistentes al glifosato y también regenerar plantas con el mismo genotipo de las plantas resistentes al glifosato. Las células regenerables en dichos cultivos de tejidos podrían ser, por ejemplo, embriones, protoplastos, células meristemáticas, callos, polen, hojas, anteras, raíces, puntas de raíces, flores, semillas, vainas y tallos. Casos particulares relacionados con plantas regeneradas a través de un cultivo de tejido de acuerdo con lo anterior.

[0014] En algunos modos de realización,, la presente descripción hace referencia a las células que no son regenerables para producir plantas, por ejemplo, para su uso en la producción de

líneas celulares de plantas resistentes al glifosato. En otros modos de realización, la descripción hace referencia a las plantas que comprenden tales células de forma parcial.

[0015] En determinados modos de realización, la presente descripción hace referencia a la aplicación de múltiples herbicidas a cosechas plantadas en un área bajo cultivo. La aplicación excesiva de glifosato, además de múltiples herbicidas, aprovecha las distintas propiedades herbicidas, de forma que se obtiene control de las semillas con una combinación mejorada de flexibilidad y economía. Por ejemplo, los herbicidas individuales pueden poseer distintas longevidades en el area bajo cultivo, es decir, algunos herbicidas pueden persistir y ser efectivos durante un periodo de tiempo relativamente prolongado una vez aplicados en el área, mientras que otros pueden degradarse en otros y/o en compuestos no activos. Un sistema de aplicación de herbicida mejorado de acuerdo con determinados modos de realización permite el uso de glifosato y múltiples herbicidas, de forma que el productor puede adaptar la selección de herbicidas concretos para su uso en una situación determinada.

[0016] En algunos modos de realización, la presente divulgación relacionada con los métodos y composición para hacer y usar una planta tolerante a más de un herbicida o clase o subclases de herbicida, tal y como se describe a continuación. En casos particulares, la planta es tolerante al glifosfato y a otro herbicida (o clase o subclase de herbicida) o producto químico (o clase o subclase de producto químico) (*por ejemplo*, fungicidas, insecticidas, reguladores de crecimiento de plantas y similares). Dichas plantas pueden usarse, por ejemplo, en métodos que comprendan tratamiento de cultivo con varios herbicidas. Por lo tanto, la descripción proporciona plantas resistentes a herbicidas que toleran el tratamiento con un herbicida o combinación de herbicidas (incluyendo una combinación de herbicidas que actúan de un modo diferente) o que toleran el tratamiento con una combinación de al menos un herbicida y un producto químico. De esta manera, se describen métodos mejorados de cultivo de plantas en los que la maleza está selectivamente controlada.

[0017] Una planta resistente a herbicidas, de acuerdo con algunas formas de realización, puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo que confiere tolerancia al glifosato y una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere tolerancia al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). De acuerdo con los párrafos anteriores, se proporcionan plantas que comprenden al menos una tercera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que proporciona a la planta un rasgo seleccionado del grupo que consiste en

tolerancia al herbicida, resistencia a insectos; un rasgo agronómico; resistencia a enfermedades, un rasgo modificado de ácido graso y un rasgo de fitato reducido.

[0018] En algunos ejemplos, la planta resistente a herbicidas comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere tolerancia al glifosato y una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere tolerancia al glufosinato. Algunos ejemplos incluyen plantas resistentes a herbicidas que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que proporciona a la planta un rasgo seleccionado del grupo que consiste en tolerancia al herbicida, resistencia a insectos; un rasgo agronómico; resistencia a enfermedades, un rasgo modificado de ácido graso y un rasgo de fitato reducido.

[0019] En algunos ejemplos en particular, la planta resistente a herbicidas comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere tolerancia al glifosato y una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere tolerancia a un herbicida que inhibe la acetolactato sintasa (ALS) (Lee *et al*. (1988) EMBOJ. 7:1241), también conocida como acetohidroxiácido sintasa (AHAS) (Miki *et al*. (1990) Theor. Appl. Genet. 80:449). Algunos ejemplos incluyen plantas resistentes a herbicidas que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que proporciona a la planta un rasgo seleccionado del grupo que consiste en tolerancia al herbicida, resistencia a insectos; un rasgo agronómico; resistencia a enfermedades, un rasgo modificado de ácido graso y un rasgo de fitato reducido.

[0020] En algunos casos, el ácido nucleico puede combinarse (o "apilarse") en una planta con cualquier otra molécula de ácido nucleico y sin limitación para proporcionar una resistencia o tolerancia adicional al glifosato u otro herbicida, para proporcionar, entre otras cosas resistencia a ciertos insectos o enfermedades, mejoras nutricionales, características agronómicas mejoradas, una proteína u otro producto útil en usos alimenticios, industriales, farmacéuticos u otros. Los ejemplos incluyen el apilamiento de dos o más ácidos nucleicos dentro del genoma de una planta. Este "apilamiento de genes" puede conseguirse *a través* de un cultivo tradicional de plantas utilizando dos o más casos, la transformación de una planta con un constructo que contiene las secuencias de interés, la retransformación de una planta transgénica, o la adición de nuevos rasgos a través de la integración dirigida *a través de* una recombinación homóloga. Ejemplos de dicho apilamiento incluyen una combinación de lo siguiente: un *t*28 ácido nucleico *dg*; un ácido nucleico Cry34Ab1; un ácido nucleico Cry35Ab1; un ácido nucleico Cry1F; un ácido nucleico Cry1Ac; un 12 ácido nucleico *aad*; un 1 ácido nucleico *aad*; un ácido nucleico *pat*; y un *2* ácido nucleico *DSM*.

[0021] Además de los aspectos ejemplares y casos descritos anteriormente, otros aspectos y casos serán evidentes tras el estudio de las siguientes descripciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0022] **FIG. 1** Incluye una alineación de la secuencia parcial de ejemplares de enzimas sintasa EPSP (*es decir*., DGT-28, DGT-32, DGT-33, y otros). Estos tres ejemplares de enzimas DGT comparten una alanina conservada en la posición del aminoácido de la enzima sintasa 96 EPSP aroA. La ubicación de este aminoácido se indica mediante un asterisco y el residuo de aminoácido está subrayado.

[0023] **FIG. 2** Incluye un alineación del ejemplar de la enzima DGT (*es decir*, DGT-1, DGT-3, y DGT-7). La ubicación del residuo del aminoácido mutado que fue cambiado de una glicina a una alanina está indicada con el primer asterisco. La ubicación del residuo del segundo aminoácido mutado que fue cambiado de una treonina a una isoleucina está indicada con el segundo asterisco. La ubicación del residuo del tercer aminoácido mutado que fue cambiado de una prolina a una serina está indicada con el tercer asterisco.

[0024] **FIGURAS 3-30** Incluye mapas de varios plásmidos ejemplares: pDAB107527 (**FIG. 3**); pDAB105530 (**FIG. 4**); pDAB105531 (**FIG. 5**); pDAB105532 (**FIG. 6**); pDAB105533 (**FIG. 7**); pDAB105534 (**FIG. 8**); pDAB4104 (**FIG. 9**); pDAB102715 (**FIG. 10**); pDAB107532 (**FIG. 11**); pDAB107534 (**FIG. 12**); pDAB102785 (**FIG. 13**); pDAB100445 (**FIG. 14**); pDAB102946 (**FIG. 15**); pDAB100469 (**FIG. 16**); pDAB102028 (**FIG. 17**); pDAB102029 (**FIG. 18**); pDAB102032 (**FIG. 19**); pDAB102034 (**FIG. 20**); pDAB100429 (**FIG. 21**); pDAB100442 (**FIG. 22**); pDAB100430 (**FIG. 23**); pDAB102036 (**FIG. 24**); pDAB102038 (**FIG. 25**); pDAB102040 (**FIG. 26**); pDAB102042 (**FIG. 27**); pDAB107712 (**FIG. 28**); pDAB107713 (**FIG. 29**); and pDAB107714 (**FIG. 30**).

[0025] **FIG. 31** Incluye valores IC_{50} obtenidos tras la introducción de varias mutaciones en DGT-1 (A) y DGT-7 (B) usando 1 mM PEP. Para la **FIG. 31(A)** y **FIG. 31(B)** curvas IC_{50}, los triángulos cerrados representan el tipo salvaje, los círculos cerrados representan mutantes GA, los cuadrados abiertos representan mutantes GAPS y los cuadrados cerrados representan mutantes TIPS.

[0026] **FIGURAS 32-46** Incluye mapas de varios plásmidos ejemplares: pDAB102719 (**FIG. 32**); pDAB102718 (**FIG. 33**); pDAB107663 (**FIG. 34**); pDAB107664 (**FIG. 35**);

pDAB107665 (**FIG. 36**); pDAB107666 (**FIG. 37**); pDAB109812 (**FIG. 38**); pDAB101556 (**FIG. 39**); pDAB107698 (**FIG. 40**); pDAB108384 (**FIG. 41**); pDAB108385 (**FIG. 42**); pDAB108386 (**FIG. 43**); pDAB108387 (**FIG. 44**); pDAB102716 (**FIG. 45**); pDAB102717 (**FIG. 46**); pDAB110828 (**FIG. 47**); pDAB110827 (**FIG. 48**); pDAB107545 (**FIG. 49**); pDAB107548 (**FIG. 50**); pDAB107553 (**FIG. 51**); pDAB102792 (**FIG. 52**); pDAB107602 (**FIG. 53**); and pDAB107533 (**FIG. 54**).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Reseña

[0027] En el presente documento se dan a conocer polipéptidos nuevos que actúan en el metabolismo de la N-(fosfonometil) glicina, y los ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos. En algunos ejemplos, dichos polipéptidos confieren tolerancia (o aumentan la tolerancia) al glifosato en una célula de una planta, con una expresión heteoróloga del polipéptido, por ejemplo sin afectar adversamente la unión de EPSP sintasa con su sustrato natural, fosfoenolpiruvato (PEP).

II. Términos

[0028] A fin de aclarar más detalladamente el alcance de esta divulgación, se proporcionan las siguientes definiciones, términos y abreviaturas específicos.

[0029] A menos que se defina específicamente de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí empleados tienen el mismo significado que usualmente les asigna una persona con experiencia en la materia. A menos que resulte claro de algún otro modo en el contexto en que aparecen, los términos en singular incluyen el plural y se entiende que los términos en plural incluyen el singular. Por lo tanto, los artículos indefinidos “un” y “una” utilizados antes de un elemento o componente no son restrictivos respecto de la cantidad de instancias del elemento o componente. En aquellos casos en que se indican intervalos numéricos (*p. ej.*, “menos que alrededor de X”, “menos que X”, y “por ejemplo, X_1… y X_2”), se entiende que los intervalos incluyen todos los valores e intervalos de valores dentro del intervalo indicado, como si estos valores e intervalos incluidos hubiesen sido indicados expresamente.

[0030] Todas las publicaciones, patentes y otras referencias aquí mencionadas se incorporan por referencia en su totalidad a todos los efectos, como si se indicase que cada

publicación o solicitud de patente individual se ha incorporado de manera específica e individual por referencia, a menos que se indique que solamente se incorporan por referencia secciones de patentes o publicaciones de patentes.

[0031] Tal como se entiende en el presente documento, los términos “comprende”, “incluye”, “tiene” y “contiene”, y las variaciones de estos, no son restrictivos (*es decir*, no son exclusivos). Por ejemplo, una composición o un método que comprende una lista de elementos no se limita solamente a dichos elementos. Dicha composición o método puede incluir (o puede no incluir) otros elementos no enumerados de manera expresa o inherentes a la composición o método. Asimismo, a menos que se indique expresamente lo contrario, la conjunción “o” se utiliza en sentido inclusivo (y no es exclusiva). Por ejemplo, una condición “A o B” se satisface por medio de cualquiera de los siguientes: A es verdadero (o está presente) y B es falso (o no está presente), A es falso (o no está presente) y B es verdadero (o está presente), y tanto A como B son verdaderos (o están presentes).

[0032] Planta: en el presente documento, el término “planta” incluye una planta entera y todos sus descendientes, células, tejidos o partes de una planta. El término “partes de plantas” incluye todas las partes de una planta, incluidos, a modo de ejemplo y sin limitaciones: semillas (incluidas semillas maduras y semillas inmaduras), un corte de una planta, una célula de una planta, un cultivo de una célula de una planta, un órgano de una planta (*p. ej.*, polen, embriones, flores, frutos, brotes, hojas, raíces, tallos y explantes). Un tejido de una planta u órgano de una planta puede ser una semilla, protoplasto, callo o cualquier otro grupo de células de planta que esté organizado en una unidad estructural o funcional. Una célula o un cultivo de tejido de una planta tener capacidad para regenerar una planta que tenga las características fisiológicas y morfológicas de las planta de la que se obtuvo la célula o tejido, y de regenerar una planta que tenga sustancialmente el mismo genotipo que dicha planta. En contraposición, algunas células de planta no tienen la capacidad de ser regeneradas para producir plantas. Las células regenerables de una célula o un cultivo de tejido de una planta pueden ser embriones, protoplastos, células meristemáticas, callos, polen, hojas, anteras, raíces, puntas de raíces, estigmas, flores, núcleos, espigas, mazorcas, glumas o tallos.

[0033] Las partes de plantas incluyen partes cosechables y partes útiles para la propagación de progenie de plantas. Las partes de plantas que son útiles para la propagación incluyen, a modo de ejemplo y sin limitaciones: semillas, frutos, un recorte, una plántula y un rizoma. Una parte cosechable de una planta puede ser cualquier parte útil de una planta, incluidos, a

modo de ejemplo y sin limitaciones: flores, polen, plántulas, tubérculos, hojas, tallos, frutos, semillas y raíces.

[0034] Una célula de una planta es la unidad estructural y fisiológica de la planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. Una célula de una planta puede tener la forma de una célula única aislada o de un conjunto de células (*p. ej.*, un callo friable y una célula cultivada) y puede ser parte de una unidad organizada superior (*p. ej.*, un tejido de una planta, órgano de una planta y planta). Por lo tanto, una célula de una planta puede ser un protoplasto, una célula productora de gametos o una célula o un grupo de células que pueden regenerarse en una planta nueva. En este sentido, una semilla, que comprende múltiples células de planta y puede regenerarse en una planta entera, se considera una "célula de planta" en las realizaciones en el presente documento.

[0035] Resistencia/tolerancia a los herbicidas: cuando se indica que las plantas son resistentes o tolerantes al glifosato, significa que la aplicación de una cantidad determinada de glifosato en la planta no la afecta de manera significativa o la mata, mientras que una planta de tipo silvestre de la misma especie se vería afectada de manera significativa o moriría a causa de la aplicación de esa cantidad de glifosato. Una planta puede ser naturalmente tolerante a un herbicida en particular, o una planta puede considerarse tolerante a un herbicida como resultado de ingeniería genética, como por ejemplo, cría selectiva, transformación genética y/o la introducción de un transgén dentro del genoma de la planta. La frase "planta resistente al glifosato" se refiere a una planta que contiene un polipéptido o molécula de ácido nucleico que confiere tolerancia al herbicida cuando se administra a una planta heteróloga u otro organismo que la expresa (*es decir*, hace que la planta u otro organismo sea tolerante al herbicida).

[0036] Una planta que es resistente o tolerante al glifosato puede mostrar algunos efectos mínimos debido a la aplicación de glifosato a la planta. Por ejemplo, puede haber una alteración en el crecimiento o desarrollo normal de la planta, por el cual la planta puede demostrar señales o síntomas que se relacionan con el estrés o una enfermedad. Dichos impacto mínimo resultante de la aplicación de glifosato en las plantas que son resistentes o tolerantes al glifosato contrasta con el efecto adverso que causa la aplicación de glifosato en plantas que son susceptibles a este. Una persona experta en la materia puede distinguir entre las plantas que son resistentes al glifosato y las plantas que son susceptibles al glifosato. La aplicación de glifosato a las plantas que comprenden un ácido nucleico que confiere resultados de tolerancia al glifosato ocasiona un efecto mucho menor

que la aplicación de la misma cantidad de glifosato a un planta de la misma especie que no comprende un ácido nucleico que confiere tolerancia al glifosato.

[0037] Una planta que es tolerante a un herbicida u otro producto químico muestra una mejor tolerancia que una planta de control apropiada. Los daños resultantes del tratamiento con un herbicida u otro producto químico se pueden evaluar considerando cualquier parámetro de crecimiento o bienestar de las plantas. Dichos parámetros son conocidos para los expertos en la materia, y su selección queda a discreción de la persona experta. El daño ocasionado a la planta se puede evaluar por inspección visual y/o análisis estadístico de un parámetro adecuado o más de crecimiento o bienestar de la planta en plantas individuales o un grupo o grupos de plantas. Por lo tanto, el daño se puede evaluar considerando parámetros que incluyen, a modo de ejemplo y sin limitaciones: altura de la planta, peso de la planta, color de las hojas, largo de las hojas, floración, fertilidad, formación de estigmas, rendimiento y producción de semillas. Los daños también se pueden evaluar estudiando el plazo transcurrido hasta una etapa determinada del desarrollo (*p. ej.*, formación de estigmas, floración y liberación de polen) o el plazo transcurrido hasta que la planta se ha recuperado del tratamiento con un producto químico y/o herbicida específico.

[0038] Al hacer evaluaciones de daños, se pueden asignar valores a determinados grados de daños a fin de poder realizar un análisis estadístico o comparaciones cuantitativas. El uso de intervalos de valores para describir grados particulares de daño resulta conocido en la materia, y se puede usar cualquier intervalo o escala adecuados. Por ejemplo, se pueden asignar puntajes de daños por herbicidas (también denominados puntajes de tolerancia). Asimismo, la tolerancia a un herbicida se puede indicar por medio de otras clasificaciones de esta escala, en las que una planta de control apropiada (o grupo de plantas de control) exhibe un puntaje estadísticamente más bajo en la escala en respuesta a un tratamiento con herbicida que un grupo de plantas sujeto.

[0039] Los daños causados por un herbicida u otro producto químico se pueden evaluar en diferentes momentos después de que una planta ha sido tratada con un herbicida. A menudo, los daños se evalúan alrededor del mismo momento en que la planta de control exhibe el daño máximo. A veces, los daños se evalúan después de un plazo durante el cual una planta de control que no se trató con un herbicida u otro producto químico ha crecido y/o se ha desarrollado de manera mensurable en comparación con el tamaño que tenía o la etapa en que se encontraba

cuando se administró el tratamiento. Los daños se pueden evaluar a diferentes intervalos adecuados, tales como a las 12 horas, a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y/o 14 días, a las 3 y/o 4 semanas o a intervalos más prolongados, después de que una planta sujeto ha sido tratada con herbicida. Cualquier plazo de evaluación es adecuado, siempre que permita detectar una diferencia en la respuesta al tratamiento de las plantas de prueba y de control.

[0040] Un herbicida no "afecta de manera significativa" una planta cuando no tiene ningún efecto en la planta, cuando tiene un cierto efecto en la planta del cual esta luego se recupera o bien cuando tiene un efecto en la planta que es perjudicial pero que se ve compensado, por ejemplo, con el efecto del herbicida específico en las malezas. Por ende, por ejemplo, una planta de cultivo puede no verse "afectada de manera significativa" por un herbicida u otro tratamiento si la planta demuestra una disminución de menos de alrededor del 25 %, menos de alrededor del 20 %, menos de alrededor del 15 %, menos de alrededor del 10 %, menos de alrededor del 9 %, menos de alrededor del 8 %, menos de alrededor del 7 %, menos de alrededor del 6 %, menos de alrededor del 5 %, menos de alrededor del 4 %, menos de alrededor del 3 %, menos de alrededor del 2 % o menos de alrededor del 1 % en por lo menos un parámetro adecuado que sea indicativo de la salud y/o reproductividad de la planta, en comparación con una planta de control apropiada (*p. ej.*, una planta no tratada de la misma especie). En realizaciones específicas, una planta es tolerante a un herbicida u otro producto químico si muestra daños en comparación con una planta de control apropiada que sean menores que los daños que muestra la planta de control en por lo menos el 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 % o 1000 % o más. Una planta de cultivo que no se vea afectada de manera significativa por un herbicida u otro tratamiento puede mostrar una disminución en por lo menos un parámetro, pero la disminución es de índole temporal, y la planta se recupera por completo en el plazo de, por ejemplo, alrededor de una semana, alrededor de dos semanas, alrededor de tres semanas, alrededor de 4 semanas o alrededor de 6 semanas. En realizaciones específicas, una planta que es tolerante a un herbicida u otro producto químico se puede caracterizar por el hecho de que la planta no se vea afectada de manera significativa por la aplicación del herbicida u otro producto químico.

[0041] Los parámetros adecuados que son indicativos de la salud y/o productividad de la planta incluyen, a modo de ejemplo y sin limitaciones: altura de la planta, peso de la planta,

largo de las hojas, plazo transcurrido hasta una etapa específica del desarrollo, floración, rendimiento y producción de semillas. La evaluación de un parámetro se puede efectuar por medio de inspección visual y/o por medio del análisis estadístico del parámetro. Una vez que este se evalúa en una planta sujeto y una planta de control, se puede hacer una comparación para determinar si la planta sujeto se ve afectada de manera significativa por el herbicida y otro tratamiento.

[0042] Entre las plantas de control apropiadas que se pueden usar para determinar la resistencia a un herbicida (u otro producto químico) se incluyen plantas de la misma especie que no comprenden un ácido nucleico y/o polipéptido heterólogo putativo de tolerancia al herbicida y plantas que comprenden el ácido nucleico y/o polipéptido heterólogo putativo de tolerancia al herbicida pero que no han sido tratadas con el herbicida.

[0043] Herbicida: un “herbicida” es un producto químico que causa lesiones temporales o permanentes a una planta. En otras partes del presente documento se enumeran y tratan con más detalle algunos ejemplos no excluyentes de herbicidas. Un herbicida se puede incorporar en una planta o sus células, o bien puede actuar sobre la planta o las células sin que se lo incorpore. Un “ingrediente activo” es un producto químico de la fórmula de un herbicida que es responsable de la fitotoxicidad de la fórmula. Los ingredientes activos de las fórmulas de los herbicidas comerciales se identifican por lo general como un ingrediente activo en la etiqueta del producto. La información de las etiquetas de producto está disponible en la Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU., y se actualiza en Internet en oaspub.epa.gov/pestlabl/ppls.own. La información de las etiquetas de producto también está disponible en Internet en www.cdms.net.

[0044] Cuando se utiliza en relación con un herbicida, el término “equivalente ácido” se refiere a la tasa o cantidad como ácido original activo del herbicida.

[0045] Aislado: un componente biológico “aislado” (tal como un ácido nucleico o polipéptido) ha sido separado de manera materia, producido de manera separada o purificado lejos de otros componentes biológicos de la célula del organismo en que el componente se presenta en forma natural (*es decir*, otros DNA y RNA cromosómicos o extracromosómicos, y proteínas) que produce un cambio químico o funcional en el componente (*p. ej.*, un ácido nucleico se puede aislar de un cromosoma rompiendo los enlaces químicos entre el ácido nucleico y el DNA restante en el cromosoma). Las moléculas de ácido nucleico y las proteínas que se han “aislado” incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas por medio de métodos de purificación estándar.

El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por una expresión recombinante en una célula huésped, así como moléculas de ácido nucleico, proteínas y péptidos sintetizados por métodos químicos.

[0046] Ácido nucleico: los términos “polinucleótido”, “ácido nucleico” y “molécula de ácido nucleico” se usan en el presente como equivalentes, y comprenden un ácido nucleico único, ácidos nucleicos múltiples, un fragmento, variante o derivado de un ácido nucleico y constructo de ácido nucleico (*p. ej*, RNA mensajero [mRNA] o DNA plasmídico [pDNA]). Un polinucleótido o ácido nucleico puede contener la secuencia de nucleótido de una secuencia de cDNA de longitud completa, o un fragmento de esta, incluidas secuencias no traducidas de 5' y/o 3' y una secuencia o secuencias de codificación. Un polinucleótido o ácido nucleico puede estar compuesto por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótidos, que pueden incluir ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos no modificados o ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos modificados. Por ejemplo, un polinucleótido o ácido nucleico puede estar compuesto por DNA de trenzado único y doble, DNA que es una mezcla de regiones de trenzado único y de trenzado doble, RNA de trenzado único y doble y DNA que es una mezcla de regiones de trenzado único y de trenzado doble. Las moléculas híbridas que comprenden DNA y RNA pueden ser de trenzado único, de trenzado doble o una mezcla de regiones de trenzado único y de trenzado doble. Los términos precedentes también incluyen formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente de un polinucleótido o ácido nucleico.

[0047] Se entiende que un DNA específico se refiere también al complemento de este, cuya secuencia se determina conforme a las reglas de apareamiento de base de los desoxirribonucleótidos.

[0048] Tal como se usa en el presente documento, el término “gen” se refiere a un ácido nucleico que codifica un producto funcional (RNA o polipéptido/proteína). Un gen puede incluir secuencias reguladoras anteriores (secuencias no codificantes de 5') y/o posteriores (secuencias no codificantes de 3') a la secuencia que codifica el producto funcional.

[0049] Como se usa en el presente documento, el término “secuencia de codificación” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácido específica. Una “secuencia reguladora” se refiere a una secuencia de nucleótido situada después (*p. ej*., secuencias no codificantes de 5'), dentro de o antes de (*p. ej*., secuencias no codificantes de 3') una secuencia de codificación, que incluyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del RNA, o traducción

de la secuencia de codificación relacionada. Las secuencias reguladoras incluyen, a modo de ejemplo y sin limitaciones: promotores, secuencias líder de traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitios de procesamiento de RNA, sitios de unión de efectores y estructuras de bucle con tallo.

[0050] Como se usa en el presente documento, el término “degeneración de codón” se refiere a una redundancia en el código genético que permite la variación de una secuencia específica de nucleótido sin afectar la secuencia de aminoácido del polipéptido codificado. Dado que cada codón consta de tres nucleótidos, y que los nucleótidos que comprenden DNA están restringidos a cuatro bases específicas, hay 64 posibles combinaciones de nucleótidos; 61 de estas codifican aminoácidos (los tres codones restantes codifican señales que finalizan la traducción). Por lo tanto, muchos aminoácidos están designados por más de un codón. Por ejemplo, los aminoácidos alanina y prolina están codificados por cuatro tripletes, la serina y la arginina por seis, mientras que el triptófano y la metionina están codificados por solo un triplete. El “código genético” que muestra qué codones codifican cada aminoácido resulta conocido para los expertos en la materia. La degeneración de este permite que las bases de un DNA varíen dentro de un amplio intervalo sin alterar la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por el DNA.

[0051] En algunas realizaciones en el presente, cuando se diseña una secuencia de codificación para mejorar la expresión en una célula huésped, el gen se diseña de manera tal que la frecuencia de uso de codones en esta se aproxime a la frecuencia del uso de codón preferido de la célula huésped. Por consiguiente, el término “optimización por codones” se refiere a genes o secuencias de codificación de ácidos nucleicos para la transformación de diversos huéspedes, en la que los codones del gen o secuencia de codificación se han modificado para reflejar el uso de codón típico del organismo huésped sin alterar el polipéptido codificado por el ácido nucleico. En los ejemplos, dicha optimización incluye el reemplazo de por lo menos uno de los codones, más de un codón, una cantidad importante de codones y/o todos los codones del gen o secuencia de codificación con un codón o más que usan más frecuentemente en los genes de dicho organismo.

[0052] Muchos organismos presentan sesgo en el uso de codones específicos para codificar para la inserción de un aminoácido en particular en una cadena de péptidos en crecimiento. La preferencia de codones, o sesgo en el uso de codones (es decir, las diferencias en el uso de codones entre organismos) es posible gracias a la degeneración del código genético, y está bien documentada entre muchos organismos. El sesgo en el uso de codones a menudo se correlaciona

con la eficiencia de la traducción del RNA mensajero (mRNA), que a su vez se cree que depende, entre otras cosas, de las propiedades de los codones que se traducen y la disponibilidad de moléculas específicas de RNA de transferencia (tRNA). La predominancia de los tRNA seleccionados en una célula generalmente refleja los codones usados más frecuentemente en la síntesis de péptidos. Por consiguiente, los genes se pueden ajustar o diseñar para la expresión óptima del gen en un organismo dado sobre la base de la optimización de codones.

[0053] Considerando la gran cantidad de secuencias de genes disponibles para una amplia variedad de especies de animales, plantas y microbios, se pueden calcular las frecuencias relativas de uso de codones. Hay tablas de uso de codones disponibles, por ejemplo, en la base de datos de uso de codones ("Codon Usage Database") disponible en Internet en kazusa.or.jp/codon/; estas tablas se pueden adaptar de diversas maneras. *Véase* Nakamura *et al*. (2000) Nucl. Acids Res. 28:292. Utilizando una tabla de uso de codones, una persona experta en la materia puede aplicar las frecuencias correspondientes a una especie dada a cualquier secuencia de polipéptidos dada, para diseñar y producir un fragmento de ácido nucleico sintético de una región de codificación optimizada por codones que codifica el polipéptido, pero usando los codones óptimos para la especie.

[0054] El sesgo de uso de codones se refleja en la composición base media de las regiones de codificación de proteínas. Por ejemplos, los organismos que tienen genomas con contenidos de G+C bajos utilizan más codones que tienen A o T en la tercera posición de codones sinónimos, mientras que aquellos que tienen contenidos de G+C más altos utilizando más codones que tienen G o C en la tercera posición. Asimismo, se cree que la presencia de codones "menores" dentro de un mRNA puede recudir la tasa de traducción absoluta de dicho mRNA, especialmente cuando la abundancia relativa del tRNA cargado correspondiente al codón menor es baja. De este razonamiento puede inferirse que la disminución de la tasa de traducción por los codones menores individuales sería por lo menos aditiva para codones menores múltiples. Por lo tanto, los mRNA que tienen contenidos relativamente altos de codones menores tendrían las correspondientes tasas de traducción bajas. Esta tasa se podría reflejar en niveles correspondientemente bajos de la proteína codificada.

[0055] El sesgo de uso de codón se puede calcular como la frecuencia en que se usa un único codón en relación con los codones para todos los aminoácidos. Como alternativa, dicho sesgo se puede calcular como la frecuencia con que se usa un único codón para codificar un aminoácido

en particular en relación con todos los restantes codones para dicho aminoácido (codones sinónimos).

[0056] El término “porcentaje de identidad” se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos (o secuencias de polinucleótidos), según se determine por medio de la comparación de secuencias. El porcentaje de identidad puede expresar el grado de relación de secuencias entre secuencias de polipéptidos (o polinucleótidos), según se determine por la coincidencia entre las cadenas de dichas secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. El porcentaje de identidad de dos secuencias, ya sean secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas divididas por la longitud de las secuencias más cortas y multiplicadas por 100. *Véase* Russell y Barton (1994) J. Mol. Biol. 244:332-50.

[0057] Las técnicas para linear secuencias de ácido nucleido y aminoácidos y para determinar la identidad son bien conocidas entre los expertos en la materia, e incluyen, a modo de ejemplo y sin limitaciones, aquellas indicadas en: Computational Molecular Biology (1988) (Lesk, A. M., Ed.) Oxford University, NY; Biocomputing: Informatics and Genome Projects (1993) (Smith, D. W., Ed.) Academic, NY; Computer Analysis of Sequence Data, Part I (1994) (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., Eds.) Humania, NJ; Sequence Analysis in Molecular Biology (1987) (von Heinje, G., Ed.) Academic, NY; y Sequence Analysis Primer (1991) (Gribskov, M. y Devereux, J., Eds.) Stockton, NY. Una técnica para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias puede incluir proporcionar la secuencia de nucleótido de un mRNA o gen y/o proporcionar o inferir la secuencia de aminoácido codificada y comparar la(s) secuencia(s) con una segunda secuencia de nucleótido y/o aminoácido. Las secuencias genómicas también se pueden determinar y comparar de este modo.

[0058] Además, varios programas de software de computación públicamente disponibles incluyen métodos para alinear secuencias de ácido nucleico y aminoácidos y determinar la identidad. Se pueden realizar alineamientos de secuencias y cálculos de porcentaje de identidad usando, por ejemplo, el programa AlignX™ de la suite Vector NTI® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) o el programa MegAlign™ de la suite LASERGENE™ de computación para bioinformática (DNASTAR™ Inc., Madison, WI, EE. UU.). Se pueden realizar múltiples alineamientos de secuencias usando el método Clustal™, que abarca diversas variedades de un algoritmo de

alineamiento, incluidos Clustal™ V y Clustal™ W (Higgins y Sharp (1989) CABIOS 5:151-3; Higgins *et al.* (1992) Comput. Appl. Biosci. 8:189-91). Para los alineamientos múltiples en Clustal™ V, los valores por defecto que se pueden usar incluyen GAP PENALTY (Penalización de espacio)=10 y GAP LENGTH PENALTY (Penalización de longitud de espacio)=10. Los parámetros por defecto para los alineamientos múltiples en Clustal™ W incluyen (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=0.2, Delay Divergen Seqs(%) (Retardo secuencias divergentes)=30, DNA Transition Weight [Peso DNA transición]=0.5, Protein Weight Matrix [Matriz de pesos de proteínas]=Serie Gonnet, DNA Weight Matrix [Matriz de pesos de DNA]=IUB). Los parámetros de alineamientos para alineamiento por pares y cálculo de porcentaje de identidad entre secuencias de proteínas que se pueden usar en un método Clustal™ son KTUPLE=1, GAP PENALTY=3, WINDOW =5 y DIAGONALS SAVED =5. Para los ácidos nucleicos estos parámetros pueden ser KTUPLE=2, GAP PENALTY=5, WINDOW=4 y DIAGONALS SAVED=4. Después de alinear las secuencias usando un programa Clustal™, se puede obtener un "porcentaje de identidad" visualizando la tabla de "distancias entre secuencias" del mismo programa.

[0059] En algunos cuerpos, un ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia (cuando se compara con un polipéptido de referencia; por ejemplo, un polipéptido DGT) de, por ejemplo y sin limitarse: al menos un 55% aproximadamente, al menos un 60% aproximadamente, al menos un 65% aproximadamente, al menos un 70% aproximadamente, al menos un 75% aproximadamente, al menos un 80% aproximadamente, al menos un 85% aproximadamente, al menos un 90% aproximadamente, y al menos un 95% aproximadamente, tiene la misma función o similar que el polipéptido de referencia. Por consiguiente, cualquier porcentaje entero de identidad de entre, por ejemplo, del 55% al 100% puede ser útil en la descripción de ácidos nucleicos especiales en el presente escrito, por ejemplo y sin limitación: 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% y 99%. Algunos fragmentos de ácido nucleico no sólo tienen la identidad de la secuencia anterior, sino que pueden codificar un polipéptido que tiene, por ejemplo y sin limitación: al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, al menos 200 aminoácidos y al menos 250 aminoácidos. Los cuerpos especiales incluyen un ácido nucleico que tiene al menos una identidad de aproximadamente el 90% de SEQ

ID NO: 1 (por ejemplo, una identidad de aproximadamente el 89%; una identidad de aproximadamente el 90%; una identidad de aproximadamente el 91%; una identidad de aproximadamente el 92%;una identidad de aproximadamente el 93%; una identidad de aproximadamente el 94%; una identidad de aproximadamente el 95%; una identidad de aproximadamente el 96%; una identidad de aproximadamente el 97%; una identidad de aproximadamente el 98%; una identidad de aproximadamente el 99%; y una identidad de aproximadamente el 99,5%;).

[0060] El término "software de análisis de secuencia" se refiere a un algoritmo computacional o programa de software que es útil para el análisis de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. El "software de análisis de secuencias" puede adquirirse en el mercado o desarrollarse de forma independiente. Los ejemplos no limitantes de software de análisis de secuencia incluyen: la suite de programas GCG (Wisconsin Package Versión 9,0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); BLASTP™, BLASTN™ y BLASTX ™ (Altschul *et al* (1990) J. Mol. Biol. 215:403 10); DNASTAR ™ (DNASTAR ™, Inc. Madison, WI); Sequencher™ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI), y el programa FASTA™ que incorpora el algoritmo de Smith-Waterman (Pearson (1994) Comput. Methods Genome Res. [Proc. Int. Symp.], fecha de reunión, 1992 (Suhai y Sandor, Eds.), Plenum: New York, NY, páginas 111-20). Donde el software de análisis de secuencia se ha utilizado para analizar una secuencia de nucleótidos o aminoácidos del presente trabajo, los resultados del análisis que se muestran se han generado utilizando los valores por defecto del programa de referencia, a menos que se especifique lo contrario. Tal como se utiliza aquí, el término "valores por defecto" se refiere a un conjunto de valores o parámetros que originalmente se carga con el software de análisis de secuencia cuando se inicializa por primera vez.

[0061] Hibridación: un ácido nucleico que comprende toda o parte de una secuencia de nucleótidos puede ser utilizado como una sonda que “hibrida” selectivamente a secuencias de nucleótidos presentes en una población de fragmentos de ADN genómico clonado o fragmentos de ADNc (por ejemplo, genómico o bibliotecas de ADNc a partir de un organismo elegido) que tienen una cantidad significativa de identidad de secuencia a la de secuencia de la sonda. Una sonda de hibridación puede ser un fragmento de ADN genómico, un fragmento de ADN plasmídico, un fragmento de ADNc, un fragmento de ARN, un fragmento de ADN amplificado mediante PCR, un oligonucleótido, u otro polinucleótido; una sonda puede marcarse con un grupo detectable (por ejemplo, ^{32}P), o con cualquier otro marcador detectable. Así, por ejemplo y sin limitación, una

sonda de hibridación puede hacerse mediante el etiquetado de un oligonucleótido sintético que en el presente trabajo se hibrida específicamente a un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico que tiene al menos un 90% de identidad de la SEQ ID NO: 1). Los métodos para la preparación de sondas de hibridación, y para la construcción de de ADNc y bibliotecas genómicas, son conocidos en la materia. Sambrook *et al*. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Una guía extensa sobre la hibridación de ácidos nucleicos se puede encontrar en Sambrook *et al.* (1989), supra, y Ausubel *et al.* (1997) Short Protocols in Molecular Biology, Tercera Edición, Wiley, Nueva York, Nueva York, páginas 2-40.

[0062] En algunos cuerpos, la hibridación de ácido nucleico (por ejemplo, al ADN amplificado) se puede utilizar para identificar la presencia de un evento transgénico en una muestra. Las moléculas de ácido nucleico o fragmentos de las mismas son capaces de "hibridar específicamente" a otra molécula de ácido nucleico en algunas circunstancias. En algunos ejemplos, un ácido nucleico hibrida específicamente a un ácido nucleico meta en condiciones estrictas. Como se usa aquí, dos moléculas de ácido nucleico se dice que son capaces de hibridarse específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura anti-paralela de doble hélice de ácido nucleico en condiciones estrictas (por ejemplo, alta restrictividad).

[0063] Un ácido nucleico se dice que es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si las dos moléculas de ácido nucleico exhiben complementariedad de secuencia completa. Como se usa en este trabajo, los ácidos nucleicos se dice que presentan "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario a un nucleótido de la otra. Las moléculas que exhiben complementariedad completa generalmente se hibridan entre sí con una estabilidad suficiente que les permitirá permanecer unidas entre sí bajo condiciones de "alta restrictividad" convencionales. Estas condiciones son descritas por Sambrook *et al.* (1989), *supra*.

[0064] Dos moléculas se dice que presentan "complementariedad mínima" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad como para permitir que permanezcan unidas entre sí al menos bajos condiciones de "baja restrictividad" convencionales. Estas condiciones también son descritas por Sambrook *et al.* (1989), *supra*. Para que una molécula de ácido nucleico pueda servir de cebador o sonda, sólo es necesario exponer la complementariedad mínima de la secuencia para poder formar una estructura estable de doble hélice bajo concentraciones concretas de solvente y sal.

[0065] Los factores que afectan a la restrictividad de la hibridación son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo: temperatura, pH, fuerza iónica y concentración de disolventes orgánicos (por ejemplo, formamida y dimetilsulfóxido). Como es conocido por los expertos en la materia, la restrictividad de hibridación se incrementa por temperaturas más altas, menor fuerza iónica, y concentraciones más bajas de disolvente. Las condiciones restrictivas también se pueden alcanzar con la adición de agentes desestabilizantes tales como la formamida.

[0066] El concepto "condiciones rigurosas" o "condiciones de restrictividad" se define con respecto a la hibridación de un ácido nucleico a otro ácido nucleico meta (es decir, a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia particular de nucleótidos de interés) mediante el procedimiento específico de hibridación descrito en Sambrook *et al.* (1989), *supra* (at 9.52-9.55). *Véase también* Sambrook *et al.* (1989) en 9.47-9.52 y 9.56-9.58.

[0067] La especificidad en muchas aplicaciones se relaciona con las condiciones de lavados post-hibridación, en los que se incluyen factores como la fuerza iónica y temperatura de la solución de lavado. Para los híbridos ADN-ADN, el punto de fusión térmico (T_m) se puede aproximar a partir de la ecuación:

$$T_m = 81.5^oC+16.6\ (logM)+0.41(\%GC)-0.61(\%form)-500/L, \qquad (1)$$

donde M es la molaridad de cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-84.

[0068] La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH determinados) en el que el 50% de una secuencia complementaria meta hibrida a una sonda perfectamente emparejada. La T_m se reduce aproximadamente 1°C por cada 1% de emparejamiento equívoco. Por lo tanto, la T_m, la hibridación y/o las condiciones de lavado se pueden ajustar para las secuencias de la identidad deseada que se van a hibridar. Por ejemplo, si se busca la hibridación de las secuencias con 90% de identidad, la T_m se puede disminuir 10 ºC (bajo una fuerza iónica y un pH determinado). Las condiciones restrictivas pueden seleccionarse por ejemplo, para ser aproximadamente 5 ºC inferiores al punto de fusión térmico (T_m) para una secuencia específica y su complemento, bajo una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones severamente restrictivas pueden utilizar una hibridación y/ o lavado 1, 2, 3, o 4 °C por debajo de la T_m; las condiciones moderadamente

restrictivas pueden utilizar una hibridación y/ o lavado 6, 7, 8, 9, o 10°C por debajo de la T_m, las condiciones de baja restrictividad pueden utilizar una hibridación y/ o lavado de entre 11 a 20°C por debajo de la T_m.

[0069] En algunos ejemplos, las condiciones restrictivas son aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,5 MNa^+ (por ejemplo, entre un 0,01 y un 1,0 M Na^+) en un pH entre 7,0 y 8,3, y la temperatura es de al menos unos 30°C para los ácidos nucleicos cortos (por ejemplo, entre 10 y 50 nucleótidos de longitud) y de al menos unos 60°C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos de longitud). Las condiciones de baja restrictividad incluyen a modo de ejemplo la hibridación con una solución reguladora/buffer de entre 30% y 35% de formamida, 1,0 M NaCl, 0,1% de dodecilsulfato sódico (SDS) a 37°C, y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC = NaCl 3,0 M / 0,3 M citrato trisódico) entre 50 y 55°C. Las condiciones de restrictividad moderada incluyen a modo de ejemplo la hibridación en formamida entre 40% y 45%, 1,0 M NaCl, 0,1% de SDS a 37°C, y un lavado en 0,5 X a 1X SSC entre 55ºC y 60°C. Las condiciones de alta restrictividad incluyen a modo de ejemplo la hibridación en formamida al 50%, un 1,0 de sal MNa, un 0,1% de SDS a aproximadamente 37°C, y un lavado en un 0,1 X SSC entre 60ºC y 65ºC aproximadamente.

[0070] Tal como se utiliza aquí, el término "polipéptido" incluye un polipéptido en singular, polipéptidos en plural, y fragmentos de los mismos. Este término se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) linealmente unidos por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica o el tamaño del producto. Por consiguiente, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, proteína, cadena de aminoácidos, y cualquier otro término usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de "polipéptido", y en el presente trabajo los términos anteriores se emplean indistintamente como "polipéptido". Un polipéptido puede ser aislado de una fuente biológica natural o producido por tecnología recombinante, pero un polipéptido específico no se traduce necesariamente a partir de un ácido nucleico específico. Un polipéptido puede ser generado mediante cualquier manera apropiada, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, la síntesis química.

[0071] Endógeno y heterólogo: como se usa aquí, el término "nativo" se refiere a la forma de un polinucleótido, gen o polipéptido que se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias

reguladoras, si está presente. El término "endógeno" se refiere a la forma nativa del polinucleótido, gen o polipéptido en su ubicación natural en el organismo o en el genoma del organismo.

[0072] En contraste, el término "heterólogo" se refiere a un polinucleótido, gen o polipéptido que no se encuentra normalmente en su ubicación en el organismo de referencia (host). Por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo puede ser un ácido nucleico que se encuentra normalmente en el organismo de referencia en una ubicación genómica diferente. A modo de ejemplo adicional, un ácido nucleico heterólogo puede ser un ácido nucleico que no se encuentra normalmente en el organismo de referencia. Un organismo huésped que consta de un polinucleótido, gen o polipéptido heterólogo puede ser producido mediante la introducción del polinucleótido, gen o polipéptido heterólogo en el organismo huésped. En ejemplos particulares, un polinucleótido heterólogo consta de una secuencia codificante nativa, o parte de la misma, que es reintroducida en un organismo fuente en una forma que es diferente a la del polinucleótido nativo correspondiente. En ejemplos concretos, un gen heterólogo consta de una secuencia codificante nativa, o parte de la misma, que es reintroducida en un organismo fuente en una forma que es diferente a la del gen nativo correspondiente. Por ejemplo, un gen heterólogo puede incluir una secuencia codificante nativa que es una porción de un gen quimérico que incluye regiones reguladoras no nativas y que se vuelve a introducir en el huésped nativo. En ejemplos concretos, un polipéptido heterólogo es un polipéptido nativo que se vuelve a introducir en un organismo fuente en una forma que es diferente a la del polipéptido nativo correspondiente.

[0073] Un gen o polipéptido heterólogo puede ser un gen o polipéptido que consta de una secuencia de ácidos nucleicos o polipéptido funcional que codifica un polipéptido funcional que está fusionado con otros genes o polipéptidos para producir un polipéptido quimérico o de fusión, o un gen que codifica el mismo. Los genes y proteínas de cuerpos particulares incluyen secuencias y porciones de longitud completa, segmentos, fragmentos (incluidos los fragmentos contiguos y supresiones internas y/ o terminales en comparación con las moléculas de longitud completa), variantes, mutantes, quiméricos y fusiones específicamente ejemplificados de estas secuencias.

[0074] Modificación: Como se emplea en el presente trabajo, el término “modificación” puede referirse a un cambio en un polinucleótido de referencia particular que tiene como resultado una actividad reducida, eliminada sustancialmente, o eliminada de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Una modificación también puede referirse a un cambio en un polipéptido de referencia que tiene como resultado una actividad reducida, eliminada

sustancialmente, o eliminada del polipéptido de referencia. Alternativamente, el término "modificación" puede referirse a un cambio en un polinucleótido de referencia que tiene como resultado un aumento de la actividad de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia, así como un cambio en un polipéptido de referencia que resulta en un aumento de la actividad de la polipéptido de referencia. Cambios como los anteriores pueden ser realizados mediante uno de los varios métodos bien conocidos en este campo, entre los que se incluyen, por ejemplo y sin limitación: borrar una parte de la molécula de referencia, mutar la molécula de referencia (por ejemplo, a través de la mutagénesis espontánea, a través de la mutagénesis aleatoria, a través de la mutagénesis causada por genes mutadores, o a través de la mutagénesis con transposones), sustituir una parte de la molécula de referencia, insertar un elemento en la molécula de referencia, disminuir la expresión de la molécula de referencia; alterar la ubicación celular de la molécula de referencia; alterar el estado de la molécula de referencia (por ejemplo, a través de la metilación de un polinucleótido de referencia, y a través de la fosforilación o ubiquitinación de un polipéptido de referencia), eliminar un cofactor de la molécula de referencia, introducir un ARN/ADN antisentido dirigido a la molécula de referencia, introducir un ARN/ADN de interferencia dirigido a la molécula de referencia; modificar químicamente la molécula de referencia; modificar covalentemente la molécula de referencia; irradiar la molécula de referencia con radiación UV o rayos X; recombinación homóloga que altera la molécula de referencia; recombinación mitótica que altera la molécula de referencia; sustituir el promotor de la molécula de referencia, y/ o combinaciones de cualquiera de los métodos anteriores.

[0075] La orientación para determinar qué nucleótidos o residuos de aminoácidos pueden ser modificados en un ejemplo concreto se puede encontrar mediante la comparación de la secuencia del polinucleótido o polipéptido de referencia con la secuencia de los polinucleótidos o polipéptidos (por ejemplo, levadura homóloga o bacteriana) homólogos, y maximizando el número de las modificaciones realizadas en regiones de alta homología (regiones conservadas) o secuencias de consenso.

[0076] Derivativo y variante: el término "derivado", como se usa aquí, se refiere a una modificación de una secuencia de ejemplo del presente trabajo. Tales modificaciones incluyen la sustitución, inserción y/ o supresión de una o más bases de una secuencia de codificación del presente trabajo que preserva, altera ligeramente o aumenta la función de la secuencia de codificación en una especie de cultivo. Tales derivados puede determinarlos fácilmente cualquier

experto en la materia, por ejemplo y sin limitación, mediante el uso de técnicas de modelado por ordenador para predecir y optimizar la estructura de secuencia. Así, el término “derivado” incluye también ácidos nucleicos heterólogos que constan de una secuencia que tiene una identidad de secuencia sustancial con una secuencia ejemplar en el presente trabajo, de tal manera que puede que tengan la misma, o ligeramente alterada o aumentada funcionalidad de uso en expresar el DGT-28 en una planta de cultivo.

[0077] Tal y como se viene empleando en el presente documento, el término "variante" se refiere a un polipéptido que se diferencia de un polipéptido de muestra, tal como se presenta aquí, por inserciones, deleciones, mutaciones y/o sustituciones de aminoácidos, como podría presentarse empleando, por ejemplo, y sin ningún tipo de limitación, técnicas del ADN recombinante. La orientación a la hora de determinar qué residuos de aminoácidos pueden ser reemplazados, añadidos o eliminados dentro de una secuencia de aminoácidos de referencia, puede encontrarse al comparar la secuencia del polipéptido de referencia con la de otros polipéptidos homólogos y minimizando el número de cambios realizados en la secuencia de aminoácidos en regiones con alta homología (regiones conservadas), o bien, reemplazando aminoácidos con una secuencia consenso. Un polipéptido variante puede haber sustituido aminoácidos y, aún así, conservar la misma actividad funcional que el polipéptido de referencia. Los genes "variantes" se componen de una secuencia de nucleótidos que codifica el mismo polipéptido como un gen de referencia o un polipéptido equivalente que tiene una actividad equivalente o similar a la del polipéptido de referencia.

[0078] En algunas versiones, los genes variantes pueden emplearse para producir proteínas variantes y los huéspedes recombinantes pueden emplearse para producir las proteínas variantes. Por ejemplo, los genes y las proteínas variantes pueden unirse de manera que contengan residuos contiguos (de aminoácidos o nucleótidos) de cualquiera de las secuencias ejemplificadas en este documento. Un gen o proteína variante puede tener, por ejemplo, y sin limitación: 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 y 293 residuos contiguos (de aminoácidos o nucleótidos) que se correspondan con un segmento (del mismo tamaño) de la secuencia ejemplificada. Los segmentos con un tamaño similar, especialmente aquellos de las regiones conservadas, pueden emplearse también como sondas y/o cebadores.

[0079] Aquellos versados en esta ciencia, deducirán que altos niveles de identidad de secuencia son útiles a la hora de identificar polipéptidos (p. ej. de otras especies) que tienen igual o similar función o actividad que un polipéptido de referencia. En algunas versiones, un polipéptido variante que tenga una identidad de secuencia (en comparación con un polipéptido de referencia; p. ej. un polipéptido DGT-28) de, por ejemplo, y sin limitación: al menos un 55% aproximadamente, al menos un 60% aproximadamente, al menos un 65% aproximadamente, al menos un 70% aproximadamente, al menos un 75% aproximadamente, al menos un 80% aproximadamente, al menos un 85% aproximadamente, al menos un 90% aproximadamente, y al menos un 95% aproximadamente, tiene la misma función o similar que el polipéptido de referencia.

[0080] Las estrategias para diseñar y construir genes y proteínas variantes que se compongan de residuos contiguos de una molécula concreta pueden determinarse obteniendo y examinando la estructura de una proteína de interés (p. ej. coordenadas de una estructura atómica 3-D [tridimensional] de una estructura cristalina y/o un modelo molecular). En algunos ejemplos, una estrategia puede ir dirigida a determinados segmentos de una proteína que sean idóneos para su modificación, tal como los segmentos expuestos en la superficie, y no segmentos internos, ya que conllevan, estos últimos, plegamiento de proteínas e integridad estructural esencial 3-D. La patente de los EE.UU. No. 5.605.793, por ejemplo, está relacionada con los métodos para generar diversidad molecular adicional empleando el reensamblaje del ADN tras fragmentaciones aleatorias o dirigidas. Este procedimiento es conocido como "transposición genética" que, generalmente, implica el mezclar fragmentos (del tamaño que se desee) de dos o más moléculas de ADN, seguidas de varias secuencias de renaturalización. Este proceso puede mejorar la actividad de una proteína

codificada por un gen sujeto. El resultado una proteína quimérica que haya mejorado su actividad, alterado el sustrato específico, aumentado su estabilidad enzimática, alterado su estereoespecificidad y otra serie de características.

[0081] Una "sustitución" de aminoácidos, puede ser el resultado de haber reemplazado un aminoácido en una secuencia de referencia por otro aminoácido que tenga una estructura y/o propiedades químicas similares (p. ej. sustitución conservadora de aminoácidos), o puede ser el resultado de haber reemplazado un aminoácido en una secuencia de referencia por un aminoácido que tenga una estructura y/o propiedades químicas diferentes (p. ej. sustitución no conservadora de aminoácidos). Los aminoácidos pueden dividirse en las siguientes categorías y/o estructuras químicas: no polares, polares sin carga, básicos y ácidos. En consecuencia, las sustituciones "conservadoras" de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de coincidencias en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad o sobre la naturaleza anfipática de los residuos involucrados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen la glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos neutros polares sin carga incluyen la serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen la arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen el ácidos aspártico y el ácido glutámico. De manera alternativa, las sustituciones "no conservadoras" de aminoácidos pueden realizarse eligiendo las diferencias en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad y en la naturaleza anfipática de cualquiera de estos aminoácidos. Las "inserciones" o "deleciones" pueden estar dentro del rango de variación si son estructural o funcionalmente toleradas por las proteínas recombinantes.

[0082] En algunas versiones, una proteína variante es "truncada" respecto de una proteína de longitud completa de referencia. En algunos ejemplos, la proteína truncada conserva la actividad funcional de la proteína de referencia. Por proteína "truncada" se entiende que una parte de la proteína puede haberse dividido, por ejemplo, conservando y mostrando la proteína fragmentada sobrante la actividad deseada tras la fragmentación. La fragmentación puede conseguirse por medio de varias proteasas. Es más, pueden producirse con éxito proteínas fragmentadas empleando técnicas de biología molecular, en las que las bases del ADN que codifican una porción de la proteína son eliminadas del código de secuencia, bien sea por medio de la digestión con endonucleosis restrictiva o por medio de otras técnicas que conozca el experto en el terreno. Una proteína truncada puede expresarse en un sistema heterólogo, como E. coli, baculovirus, sistemas

virales basados en plantas y levadura. Las proteínas truncadas que presentan tolerancia a los herbicidas pueden confirmarse empleando el sistema heterólogo que expresa la proteína en un ensayo biológico de tolerancia al herbicida, como se describe en este estudio. Dentro de esta disciplina, es sabido que se pueden producir satisfactoriamente proteínas truncadas de manera que conserven la misma actividad funcional que la proteína de longitud completa de referencia. Por ejemplo, las proteínas Bt pueden emplearse en forma truncada (nucleoproteína); *Véase*, *ej.*, Hofte y Whiteley (1989) Microbiol. Rev. 53(2):242-55; y Adang *et al*. (1985) Gene 36:289-300.

[0083] En algunos casos, especialmente en la expresión genética en plantas, puede ser ventajoso emplear genes truncados que expresen proteínas truncadas. Los genes truncados pueden codificar un polipéptido compuesto, por ejemplo, del 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.

[0084] Los genes y proteínas variantes que conservan la función de la secuencia de referencia a partir de la cual fueron diseñados, pueden ser determinados por una persona con conocimientos en esta ciencia; por ejemplo, evaluando las variantes recombinantes para la actividad. Si esta evaluación de la actividad se conoce y está descrita, entonces para la determinación de las variantes funcionales se precisan únicamente experimentos rutinarios.

[0085] Pueden realizarse cambios específicos en el centro activo de una enzima para afectar a su funcionalidad inherente respecto a su actividad o estereoespecificidad. *Véase* Muller *et. al*. (2006) Protein Sci. 15(6):1356-68. Por ejemplo, la estructura de la proteína Tau D se ha empleado como dioxigenasa de muestra para determinar residuos de centros activos mientras permanece unida a su sustrato inherente, la taurina. *Véase* Elkins *et al*. (2002) Biochemistry 41(16):5185-92. Para más información en relación a la secuencia de optimización y designabilidad de la enzima, los centros activos se pueden encontrar en Chakrabarti *et al*. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(34):12035-40.

[0086] Pueden modificarse varias propiedades estructurales y rasgos tridimensionales de una proteína sin afectar de manera negativa a la actividad/funcionalidad de dicha proteína. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden hacerse de manera que no afecten negativamente a la actividad y/o a la configuración tridimensional de la molécula (sustituciones "toleradas"). Las proteínas variantes pueden diseñarse también de manera que difieran en el nivel de

secuencia de la proteína de referencia, pero que conserven la misma o parecida estructura tridimensional esencial en su conjunto, distribución de carga superficial y aspecto *Véase, ej*., Patente de EE.UU. 7,058,515; Larson *et al*. (2002) Protein Sci. 11:2804-13; Crameri *et al*. (1997) Nat. Biotechnol. 15:436-8; Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-51; Stemmer (1994) Nature 370:389-91; Stemmer (1995) Bio/Technology 13:549-53; Crameri *et al*. (1996) Nat. Med. 2:100-3; and Crameri *et al*. (1996) Nat. Biotechnol. 14: 315-9.

[0087] El diseño computacional de 5'-UTR y 3'-UTR (p. ej. horquillas para el pelo sintéticas) es apto para su uso en un constructo de expresión (p. ej. constructo de expresión DGT-28), y puede también llevarse a cabo y emplearse para diseñar elementos dentro de los ácidos nucleicos de ciertas muestras. Los modelos computacionales, UTRs y las técnicas de diseño computacional que se emplean en la predicción/evaluación de derivadas de 5'-UTR y 3'-UTR incluyen, por ejemplo, y sin limitaciones: MFoLd™ versión 3.1 (disponible en Genetics Corporation Group, Madison, Wisconsin; *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.* (1999) J. Mol. Biol. 288:911-40; Zucker *et al*. "RNA Secondary Structure Prediction," en Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, S. Beaucage, D.E. Bergstrom, G.D. Glick, and R.A. Jones. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. Nueva York: John Wiley & Sons, 11.2.1-11.2.10, 2000; y COVE™ (RNA structure analysis using covariance models (stochastic context free grammar methods)) v.2.4.2, (Eddy and Durbin (1994) Nucl. Acids Res. 22:2079-88), que se distribuye gratuitamente como código fuente y puede descargarse accediendo a la página web genetics.wustl.edu/eddy/software/; y FOLDALIGN™ (*véase* Gorodkin *et al*. (1997) Nucleic Acids Res. 25(18):3724-32 y Gorodkin *et al*. (1997) Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ISMB International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology 5:120-123), distribuido también gratuitamente y disponible para su descarga en la página web, foldalign.ku.dk/software/index.html.

[0088] Promotor: el término "promotor" hace referencia a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de un código de secuencia de ácido nucleico o ARN funcional. En los ejemplos, el código de secuencia controlado está situado a 3' de una secuencia promotora. Un promotor puede derivar en su totalidad de un gen nativo y puede estar compuesto por diversos

elementos que procedan de promotores distintos que se encuentran en la naturaleza, o bien, un promotor puede incluso comprimir segmentos sintéticos de ADN. Aquellos versados en la materia, sabrán que distintos promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, en distintas etapas de su desarrollo o como respuesta a diversas condiciones medioambientales o psicológicas. Ejemplos de todos los promotores descritos hasta ahora son bien conocidos, y se emplean en la ciencia de controlar la expresión de los ácidos nucleicos heterólogos. A los promotores que dirigen la expresión de un gen en muchos tipos de células y en la mayoría de los casos, se los conoce como "promotores constitutivos". Asimismo, mientras ha habido personas que han tratado de delimitar (en muchos casos sin éxito) los límites exactos de las secuencias reguladoras, ha llegado finalmente a entenderse que fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener la misma actividad promotora. La actividad promotora de un ácido nucleico concreto puede analizarse empleando técnicas que le sean conocidas a la persona encargada del análisis.

[0089] Operacionalmente ligado: el concepto "operacionalmente ligado" hace referencia a una asociación de secuencias de ácidos nucleicos en la que una de dichas secuencias puede afectar la función de otra. Por ejemplo, un promotor está operacionalmente ligado a un código de secuencia cuando el promotor es capaz de afectar a la expresión de ese código de secuencia (p. ej. si el código de secuencia se encuentra bajo el control transcripcional del promotor). Un código de secuencia puede ser operacionalmente ligado a una secuencia reguladora con orientación sentido o antisentido.

[0090] Expresión: el término "expresión", como se usa aquí, puede referirse a la transcripción y acumulación estable del ARN sentido (ARNm) o antisentido derivado de un ADN. Expresión también puede referirse a la traducción del ARNm en un polipéptido. Tal como se utiliza aquí, el término "sobreexpresión" se refiere a la expresión que es más alta que la expresión endógena del mismo gen o un gen relacionado. Así, un gen heterólogo se "sobreexpresa" si su expresión es mayor que la de un gen endógeno comparable.

[0091] Transformación: tal como se utiliza aquí, el término "transformación" se refiere a la transferencia y la integración de un ácido nucleico o un fragmento del mismo en un organismo huésped, resultando en una herencia genéticamente estable. Los organismos huéspedes que contienen un ácido nucleico transformante se conocen como organismos "transgénicos", "recombinantes" o "transformados". Los métodos conocidos de transformación incluyen, por ejemplo: Transformación mediada de *agrobacterium tumefaciens* - o *A. rhizogenes*; transformación de fosfato de calcio; transformación de polibreno; fusión de protoplastos; electroporación; métodos

ultrasónicos (por ejemplo, sonoporación); transformación de liposoma; microinyección; transformación con ADN desnudo; transformación con vectores plasmídicos; transformación con vectores virales; transformación biolística (bombardeo con micropartículas); transformación mediada por WHISKERS de carburo de silicio; aerosol radiante; y transformación mediada por PEG.

[0092] Introducido: tal como se utiliza aquí, el término "introducido" (en el contexto de la introducción de un ácido nucleico en una célula) incluye la transformación de una célula, así como el cruce de una planta que comprende el ácido nucleico con una segunda planta, de tal manera que la segunda planta contiene el ácido nucleico, tal como se puede realizar utilizando técnicas convencionales de fitomejoramiento. Dichas técnicas son conocidas en el ámbito. Para una discusión de técnicas de mejora vegetal, véase Poehlman (1995) Breeding Field Crops, 4ª edition, AVI Publication Co., Westport CT.

[0093] Los métodos de retrocruzamiento se pueden usar para introducir un ácido nucleico en una planta. Esta técnica ha sido utilizada durante décadas para introducir rasgos en plantas. Un ejemplo de una descripción de retrocruzamiento (y otras metodologías de fitomejoramiento) se puede encontrar en, por ejemplo, Poelman (1995), *supra*; and Jensen (1988) Plant Breeding Methodology, Wiley, New York, NY. En un ejemplo de protocolo de retrocruzamiento, una planta originaria de interés ("padre recurrente") se cruza con una segunda planta ("padre no recurrente") que lleva el un ácido nucleico a ser introducido. La progenie resultante de este cruce se cruzó de nuevo con el progenitor recurrente, y el proceso se repitió hasta que se obtuvo una planta convertida, en que esencialmente todas las características deseadas morfológicas y fisiológicas del progenitor recurrente se recuperan en la planta convertida, además del ácido nucleico del padre no recurrente.

[0094] Plásmido / vector: los términos "plásmido" y "vector", como se usa en la presente memoria, se refieren a un elemento cromosómico extra que puede llevar uno o más genes que no son parte del metabolismo central de la célula. Los plásmidos y vectores son típicamente moléculas de ADN de doble cadena circulares. Sin embargo, los plásmidos y vectores pueden ser ácidos nucleicos lineales o circulares, de una sola o de doble cadena de ADN o ARN, y pueden ser derivados de cualquier fuente, en la que un número de secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una construcción única, que es capaz de introducir un fragmento promotor y una secuencia de ADN que se codifica junto con la secuencia no traducida 3' apropiada en una célula.

En los ejemplos, plásmidos y vectores pueden incluir secuencias de replicación autónoma, secuencias de genoma de integración, y / o secuencias de nucleótidos o fagos.

III. DGT-28 y secuencias de codificación de DGT-28

[0095] Algunas realizaciones aquí proporcionan un polipéptido aislado que tiene al menos aproximadamente 90% de identidad (por ejemplo, 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y al menos 99% de identidad) a la Nº ID DE SEC: 1. Tal polipéptido se conoce aquí como polipéptido DGT-28. Algunas formas de realización aquí proporcionan un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90% de identidad con la Nº ID DE SEC:1. Ejemplos particulares de tal ácido nucleico se denominan aquí ácido nucleico "*dgt-28*". Los ácidos nucleicos *dgt-28* pueden ser útiles en cualquiera de una amplia variedad de aplicaciones (por ejemplo, la introducción de resistencia a glifosato) en la que se desea un metabolismo del glifosato modificado en una célula vegetal.

[0096] [0002] Los ejemplos particulares de ácidos nucleicos *dgt-28* proporcionados para fines ilustrativos en este documento son las Nº ID DE SEC:2 y 3. Por consiguiente, algunas realizaciones proporcionan un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia (por ejemplo, 79%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84% , al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94% , al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, y la identidad de al menos 99%) a la Nº ID DE SEC:2 o Nº ID DE SEC:3, en los cuales el ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad con la Nº ID DE SEC:1. Ejemplos particulares de ácidos nucleicos *dgt-28* incluyen ácidos nucleicos que se hibridan específicamente a un ácido nucleico con la Nº ID DE SEC:2 o Nº ID DE SEC:3 bajo condiciones severas (por ejemplo muy severas).

[0097] En algunas realizaciones, se proporcionan ácidos nucleicos *dgt-28* de codón optimizado. Por ejemplo, para obtener una elevada expresión de un gen heterólogo en una planta, puede ser deseable diseñar y someter a re-ingeniería al gen, para que se exprese más eficientemente en una célula vegetal. Esta estrategia puede ser particularmente deseable en la circunstancia en la que se desea que un gen bacteriano se exprese en una célula vegetal.

[0098] Así pues, algunos ejemplos del presente documento proporcionan un gen vegetal-optimizado que codifica una proteína DGT-28, y los métodos para el diseño de los mismos, para generar una secuencia de ADN que se puede expresar de manera óptima en las plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas, y en el que las modificaciones de la secuencia no obstaculicen la traducción o la transcripción. El diseño de un gen *dgt-28* para la expresión de la misma proteína DGT-28 tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas se ejemplifica en este documento por medio de la re-ingeniería de la región de este gen que codifica proteínas para una óptima expresión. Aquí los ácidos nucleicos *dgt-28* ejemplares optimizados para plantas incluyen Nº ID DE SEC: 2 y Nº ID DE SEC:3.

[0099] Al usar métodos de ingeniería para obtener un gen que codifica la expresión de una proteína DGT-28 para su expresión en plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas (por ejemplo, algodón, canola, tabaco, maíz, soja, trigo y arroz), el sesgo del codón de la futura planta(s) huésped puede determinarse, por ejemplo, a través del uso de bases de datos de secuencias de ADN disponibles al público para encontrar información sobre la distribución de los codones de los genomas vegetales o las regiones codificadoras de proteínas de varios genes vegetales.

[00100] En el diseño de las regiones de codificación en un ácido nucleico para la expresión de una planta, deben determinarse los codones principales ("primera opción") preferidos por la planta, como puede ser la segunda, tercera, cuarta, etc. elección de codones preferidos cuando existen múltiples opciones.. Una nueva secuencia de ADN puede ser diseñada que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido mismo (por ejemplo, una proteína DGT-28), pero la nueva secuencia de ADN se diferencia de la secuencia de ADN original mediante la sustitución de codones de la planta (primera preferida, segundo preferida , tercera preferidas, o cuarta preferidas, etc.) para especificar el aminoácido en cada posición dentro de la secuencia de aminoácidos.

[00101] La nueva secuencia puede ser analizada para determinar si hay sitios de restricción enzimática que pueden haberse creado al realizar las modificaciones. Los sitios identificados pueden modificarse más aún al reemplazar los codones con codones preferidos de primera, segunda, tercera o cuarta elección. Otros sitios en la secuencia que pueden afectar la transcripción o traducción del gen de interés son las estructuras del tallo-bucle, uniones exón:intrón (5' o 3'), señales adicionales poli A, y señales de terminación de ARN polimerasa; estos sitios pueden quitarse por medio de la sustitución de codones vegetales. La secuencia puede ser analizada y modificada más aún para reducir la frecuencia de dobletes TA o CG. Además de dobletes, bloques de secuencia G o C que

tienen más de unos seis residuos iguales pueden afectar la transcripción o traducción de la secuencia. Por tanto, estos bloques se pueden modificar reemplazando los codones de primera o segunda elección, etc. por el próximo codón preferido de elección.

[00102] Nº ID DE SEC: 2 (*dgt-28* (v5)) se optimizó para su expresión en plantas dicotiledóneas. Nº ID DE SEC: 3 (*dgt-28* (v6)) se optimizó para su expresión en plantas monocotiledóneas. El uso de codones en estas secuencias sintéticas se seleccionan en base al uso de codones preferido, es decir, los productos de expresión de cada uno están codificadas por codones que tienen un sesgo hacia su uso en las monocotiledóneas o las dicotiledóneas, y las secuencias perjudiciales y sitios de restricción superfluos se eliminaron para aumentar la eficiencia de la transcripción / traducción del polipéptido DGT-28 y para facilitar los pasos de la manipulación del ADN.

[00103] Del mismo modo, la molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4 (*dgt*-28 (v1)) se ha optimizado para mejorar la expresión en *Escherichia coli*. El uso de codones en la SEQ ID NO:4 se seleccionó basándose en el uso de codones preferido *E. coli*, la proteína expresada es codificada por los codones que tienen un sesgo hacia el uso de *E. coli*. Durante el rediseño, secuencias perjudiciales y sitios de restricción superfluos fueron eliminados para aumentar la eficacia de la transcripción / traducción de la secuencia de codificación DGT-28 y para facilitar los pasos de manipulación del ADN. Así, la expresión de DGT-28 a partir de un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:4 en *E. coli* puede resultar en la robusta expresión de proteínas, por ejemplo, para la caracterización enzimática de DGT-28.

[00104] Una vez que una secuencia optimizada de ADN optimizado (por ejemplo, optimizada en una planta) se ha sido diseñado en el papel, o *in silico*, las moléculas reales de ADN se pueden sintetizar en el laboratorio como para corresponder precisamente a la secuencia de la secuencia diseñada. Tales moléculas sintéticas de moléculas de ácido nucleico pueden ser clonadas y manipuladas como si se derivaran de fuentes naturales o nativas.

[00105] Un ácido nucleico aquí puede ser clonado dentro de un vector para la transformación en células procariotas o eucariotas para replicación y / o expresión. Los vectores pueden ser vectores procariotas; por ejemplo, plásmidos, o vectores transportadores, vectores de insectos, o vectores eucarióticos. Un ácido nucleico en el presente documento también puede ser clonado en un vector de expresión, por ejemplo, para la administración a una célula vegetal. En ciertas aplicaciones, puede ser preferible tener vectores que son funcionales en E. coli (por

ejemplo, producción de proteínas para la producción de anticuerpos, análisis de secuencia de ADN, construcción de insertos, obtener cantidades de ácidos nucleicos).

[00106] Para expresar una proteína DGT-28 en una célula, un ácido nucleico que codifica la proteína normalmente se subclonó en un vector de expresión que contiene un promotor para la transcripción directa. Adecuados promotores bacterianos y eucariotas son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook *y otros, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2 ª ed 1989; 3 ª ed, 2001..); Kriegler, Gene Transfer and Expression*: *A Laboratory Manual* (1990), y *Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y otros, supra.).* Los sistemas de expresión bacterianos para expresar un ácido nucleico aquí están disponibles en, por ejemplo, *E. coli, Bacillus sp*., and *Salmonella* (Palva *y otros.*, *Gene* 22:229-235 (1983)). Kits para tales sistemas de expresión están disponibles comercialmente. Sistemas de expresión eucarióticos para células de mamíferos, levaduras, y células de insecto son bien conocidos por los expertos en la técnica y están también disponibles comercialmente.

[00107] El vector de expresión particular usado para transportar la información genética en la célula se selecciona con respecto a la utilización prevista de la proteína DGT-28 (por ejemplo, la expresión en plantas, animales, bacterias, hongos y protozoos). Los vectores estándar de expresión bacterianos y animales son conocidos en la técnica y se describen en detalle, por ejemplo, U.S. Patent Publication 20050064474A1 and International Patent Publications WO 05/084190, WO05/014791 and WO03/080809. Los métodos estándar de transfección se pueden utilizar para producir líneas de células bacterianas que expresan grandes cantidades de proteína, que puede luego purificarse utilizando técnicas estándar.

[00108] La selección de un promotor usado para dirigir la expresión de un ácido nucleico en este documento depende de la aplicación particular. Se pueden emplear en realizaciones en este documento un número de promotores que dirigen la expresión de un gen en una planta. Tales promotores se pueden seleccionar de entre promotores constitutivos, químicamente regulados, inducibles, tejido específicos, y preferidos de las semillas. Por ejemplo, un promotor constitutivo fuerte adecuado para la célula huésped puede usarse para la expresión y purificación de proteínas DGT-28. Los ejemplos no limitantes de promotores de plantas incluyen secuencias promotoras derivadas de *A. thaliana* ubiquitina-10 (ubi-10) (Callis y otros, 1990, *J. Biol. Chem*., 265:12486-12493); *A. tumefaciens* manopina sintasa (Δmas) (Petolino y otros, Patente de EE.UU. N º

6.730.824.), y / o del **virus del mosaico** de las nervaduras de la yuca (CsVMV) (Verdaguer y otros, 1996, Plant Molecular Biology 31:1129-1139.).

[00109] Los promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el virus núcleo del mosaico de la coliflor promotora 35S (Odell y otros. (1985) Nature 313:810-812); Promotor de la actina del arroz (McElroy y otros. (1990) Plant Cell 2:163-171); el promotor de ubiquitina del maíz (Patente de EE.UU. Número 5.510.474; Christensen y otros (1989) Plant Mol Biol.12:619-632 y Christensen y otros. (1992) Plant Mol Biol. 18:675-689); promotor pEMU (Last y otros. (1991) Theor. Appl. Genet. 81:581-588); promotor ALS (U.S. Patent Number 5,659,026); promotor de la histona del maíz (Chabouté y otros. Plant Molecular Biology, 8:179-191 (1987)); y otros similares.

[00110] El rango de promotores de plantas compatibles disponibles incluye tejido específico y promotores inducibles. Un elemento regulador inducible es uno que es capaz de activar directa o indirectamente la transcripción de una o más secuencias de ADN o genes en respuesta a un inductor. En la ausencia de un inductor las secuencias de ADN o genes no serán transcritos. Típicamente, el factor proteína que se une específicamente a un elemento regulador inducible para activar la transcripción está presente en una forma inactiva, que luego es convertida directa o indirectamente en la forma activa por el inductor. El inductor puede ser un agente químico tal como una proteína, metabolito, regulador de crecimiento, herbicida o compuesto fenólico o un estrés fisiológico impuesto directamente por calor, frío, sal o elementos tóxicos o indirectamente mediante la acción de un agente patógeno o enfermedad tal como un virus. Típicamente, el factor proteína que se une específicamente a un elemento regulador inducible para activar la transcripción está presente en una forma inactiva que luego es convertida directa o indirectamente en la forma activa por el inductor. Una célula de planta que contiene un elemento regulador inducible puede estar expuesta a un inductor aplicando externamente el inductor a la célula o planta tal como por pulverización, riego, calentamiento o métodos similares.

[00111] Cualquier promotor inducible puede usarse en realizaciones en este documento. Ver Ward y otros. Plant Mol. Biol. 22: 361-366 (1993). Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo y sin limitación: los promotores de los receptores de la ecdisona (patente de EE.UU. número 6.504.082); promotores del sistema ACE1 que responden al cobre (Mett y otros PNAS 90: 4.567-4.571 (1993)); In2-1 y In2 -2 gen del maíz que responde a protectores herbicidas de

bencenosulfonamida (Patente de EE.UU. Número 5.364.780; Hershey y otros, Mol Gen.Genetics 227: 229-237 (1991) y Gatz y otros, Mol Gen.Genetics 243: 32-38 (1994)); represor Tet de Tn10 (Gatz y otros, Mol. Gen.Genet. 227: 229-237 (1991); promotores de un gen de la hormona esteroide, la actividad transcripcional de la cual es inducida por una hormona glucocorticosteroide, Schena y otros, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 88: 10421 (1991) y McNellis y otros, (1998) Plant J. 14 (2) :247-257; el promotor GST del maíz, que es activado por compuestos electrofílicos hidrófobos que se utilizan como herbicidas de pre-emergencia (véase la patente de EE.UU. N º 5.965.387 y la solicitud de patente internacional, publicación No.WO 93/001294); y el promotor del tabaco PR-1a, que es activado por ácido salicílico (*ver* Ono S, Kusama M, Ogura R, Hiratsuka K., "Evaluation of the Use of the Tobacco PR-1a Promoter to Monitor Defense Gene Expression by the Luciferase Bioluminescence Reporter System," Biosci Biotechnol Biochem. 2011 Sep 23;75(9):1796-800). Otros promotores de interés regulados químicamente incluyen promotores inducibles por tetraciclina y reprimibles por tetraciclina- (véase, por ejemplo, Gatz y otros., (1991) Mol. Gen. Genet. 227:229-237, y patentes de EE.UU. 5.814.618 y 5.789.156).

[00112] Otros promotores regulables de interés incluyen un elemento regulador sensible al frío o un elemento regulador de choque térmico, cuya transcripción puede efectuarse en respuesta a la exposición al frío o calor, respectivamente (Takahashi y otros., Plant Physiol. 99:383 -390, 1992), el promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa (Gerlach y otros, PNAS EE.UU. 79:2981-2985 (1982).;.Walker y otros, PNAS 84 (19) :6624-6628 (1987)), inducible por condiciones anaerobias, el promotor inducible por la luz derivado del gen rbcS del guisante o gen psaDb del guisante (Yamamoto y otros. (1997) Plant J. 12 (2) :255-265.); un elemento regulador inducible por la luz (Feinbaum y otros., Mol. Gen. Genet. 226:449, 1991;Lam y Chua, Ciencia 248:471, 1990; Matsuoka y otros. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(20):9586-9590; Orozco y otros. (1993) Plant Mol. Bio. 23 (6) :1129-1138); un elemento regulador inducible por una hormona vegetal (Yamaguchi-Shinozaki y otros, Plant Mol. Biol. 15:905, 1990;Kares y otros ., Plant Mol. Biol. 15:225, 1990), y similares. Un elemento regulador inducible también pueden ser los genes promotores del maíz In2-1 o In2-2, que responden a herbicidas fitoprotectores de bencenosulfonamida (Hershey y otros., Mol. Gen. Gene. 227:229-237, 1991; Gatz y otros., Mol. Gen. Genet. 243:32-38, 1994), y el Tet represor del transposon Tn10 (Gatz y otros., Mol. Gen. Genet. 227:229-237, 1991).

[00113] Los promotores inducible por estrés incluyen promotores inducibles por el estrés sal / agua tales como P5CS (Zang y otros. (1997) Plant Sciences 129:81-89); promotores inducibles por el frío, tales como cor15a (Hajela y otros. (1990) Plant Physiol. 93:1246-1252), cor15b (Wilhelm y otros. (1993) Plant Mol Biol 23:1073-1077), wsc120 (Ouellet y otros. (1998) FEBS Lett. 423-324-328), ci7 (Kirch y otros. (1997) Plant Mol Biol. 33:897-909), y ci21A (Schneider y otros. (1997) Plant Physiol. 113:335-45); promoters inducibles por la sequía, tales como Trg-31 (Chaudhary y otros (1996) Plant Mol. Biol. 30:1247-57) y rd29 (Kasuga y otros. (1999) Nature Biotechnology 18:287-291); promoters inducibles osmóticamente, tales como Rab17 (Vilardell y otros. (1991) Plant Mol Biol 17:985-93) y osmotina (Raghothama y otros. (1993) Plant Mol Biol 23:1117-28);. promotores inducibles por el calor, tales como proteínas de choque térmico (Barros y otros. (1992) Plant Mol. 19:665-75; Marrs y otros. (1993) Dev. Genet. 14:27-41), smHSP (Waters y otros. (1996) J. Experimental Botany 47:325-338), y el elemento inducible por el choque térmico a partir del promotor de ubiquitina del perejil (WO 03/102198). Otros promotores inducibles por el estrés incluyen rip2 (Patente de EE.UU. N º 5.332.808 y EE.UU. publicación N º 2003/0217393) y RD29A (Yamaguchi-Shinozaki y otros. (1993) Mol. Gen. Genetics 236:331-340). Algunos promotores son inducibles por heridas, incluso el promotor de *Agrobacterium* PMAS (Guevara-Garcia y otros. (1993) Plant J. 4 (3) :495-505) y el promotor ORF13 de *Agrobacterium* (Hansen y otros., (1997) Mol. Gen. Genet. 254 (3) :337-343).

[00114] Promotores preferidos por los tejidos pueden ser utilizados para apuntar a una mayor transcripción y / o expresión en un tejido de planta particular. Ejemplos de estos tipos de promotores incluyen la expresión preferida de la semilla, tal como la proporcionada por el promotor de faseolina (Bustos y otros.1989. *The Plant Cell* Vol. 1, 839-853), y el gen de la globulina-1 del maíz, Belanger, y otros. 1991 *Genetics* 129:863-972. Para dicotiledóneas, los promotores de semilla preferidos incluyen, pero no se limitan a, la β-faseolina del poroto, napina, β-conglicinina, lectina de la soja, cruciferina, y similares. Para monocotiledóneas, los promotores preferidos de semilla incluyen, pero no se limitan a los del maíz 15 kDa, 22 kDa zeína, 27 kDa zeína, γ-zeína, ceroso, encogido 1, encogido 2, globulina 1, etc. Los promotores preferidos de semilla también incluyen aquellos promotores que dirigen la expresión génica predominantemente a tejidos específicos dentro de la semilla tal como, por ejemplo, el promotor del endospermo preferido de la γ-zeína, el promotor críptico del tabaco (Fobert y otros. 1994. Marcado con T-ADN de un promotor críptico específico de la cubierta de la semilla en el tabaco.

Plant J. 4: 567-577), el promotor del gen P del maíz (Chopra y otros. 1996. Alelos del gen P del maíz con especificidades tisulares distintas codifican las proteínas homologas Myb con reemplazos de terminales C. Plant Cell 7:1149-1158, Erratum in Plant Cell.1997, 1:109), el promotor globulina-1 del maíz (Belenger y Kriz.1991. Bases moleculares para el polimorfismo alélico del gen de la globulina-1 del maíz. Genetics 129: 863-972), y los promotores que dirigen la expresión de la cubierta de la semilla o el casco de granos de maíz, por ejemplo, el promotor específico del pericarpio de la glutamina sintetasa (Muhitch y otros, 2002 Isolation of a Promoter Sequence From the Glutamine Synthetase$_{1-2}$ Gene Capable of Conferring Tissue-Specific Gene Expression in Transgenic Maize. Plant Science 163:865-872).

[00115] Además del promotor, un vector de expresión contiene típicamente una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión del ácido nucleico en células huésped, ya sean procariotas o eucariotas. Un casete de expresión típico contiene por lo tanto un promotor ligado operativamente, por ejemplo, a una secuencia de ácidos nucleicos que codifican la proteína, y señales requeridas, por ejemplo, para la poliadenilación eficiente del transcrito, terminación de la transcripción, sitios de unión de ribosomas, o terminación de la traducción. Elementos adicionales de la casete pueden incluir, por ejemplo, potenciadores y señales heterólogas de empalme.

[00116] Otros componentes del vector pueden estar incluidos, también según el uso previsto del gen. Los ejemplos incluyen marcadores seleccionables, de focalización o de secuencias reguladoras, secuencias tales como la secuencia del péptido de tránsito optimizado (véase la patente de EE.UU. número 5.510.471), secuencias estabilizantes tales como RB7 MAR (véase Thompson and Myatt, (1997) *Plant Mol. Biol.*, 34: 687-692 y WO9727207) o secuencias líderes, intrones, etc. descripciones generales y ejemplos de vectores de expresión de plantas y genes reporteros pueden ser encontrados en Gruber, y otros., “Vectors for Plant Transformation” in Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick y otros eds; CRC Press pp. 89-119 (1993).

[00117] La selección de un vector de expresión apropiado dependerá del huésped y del método de introducción del vector de expresión en el huésped. El casete de expresión puede incluir, en el extremo 3 'de una secuencia de nucleótidos heterólogos de interés, una región de terminación transcripcional y traduccional funcional en plantas. La región de terminación puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés o puede ser derivada de otra fuente. Regiones de

terminación convenientes están disponibles a partir del plásmido Ti de A. tumefaciens, tales como las regiones de terminación de la octopina sintasa y de la nopalina sintasa (nos) (Depicker y otros., Mol. and Appl. Genet. 1:561-573 (1982) and Shaw y otros. (1984) Nucleic Acids Research vol 12, N ° 20 pp7831-7846 (NOS));.. véase también Guerineau y otros. Mol. Gen. Genet. 262:141-144 (1991); Proudfoot, Cell 64:671-674 (1991); Sanfacon y otros. Genes Dev. 5:141-149 (1991); Mogen y otros. Plant Cell 2:1261-1272 (1990); Munroe y otros. Gene 91:151-158 (1990); Ballas y otros. Nucleic Acids Res. 17:7891-7903 (1989); Joshi y otros. Nucleic Acid Res.. 15:9627-9639 (1987).

[00118] Un casete de expresión puede contener una secuencia líder 5 '. Tales secuencias líderes pueden actuar para mejorar la traducción. Los líderes de traducción son conocidos en la técnica e incluyen a modo de ejemplo, los líderes de picornavirus, líder de EMCV (encefalomiocarditis región 5 'no codificante), Elroy-Stein y otros. Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 86:6126-6130 (1989); líderes potivirus, por ejemplo, líder de TEV (Virus del Grabado del Tabaco) Carrington y Freed Journal of Virology, 64:1590-1597 (1990), MDMV líder (virus del mosaico enano del maíz), Allison y otros, Virology 154:9-20 (1986);. inmunoglobulina humana de cadena pesada de la proteína de unión (BiP), Macejak y otros. Nature 353:90-94 (1991); líder no traducido del ARNm de la proteína de la cubierta del virus del mosaico de la alfalfa (AMV RNA 4), Jobling y otros. Nature 325:622-625 (1987); líder del virus del mosaico del tabaco (TMV), Gallie y otros. (1989) Molecular Biology of RNA, páginas 237-256, y líder del virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) Lommel y otros. Virology 81:382-385 (1991). Véase también Della-Cioppa y otros. Plant Physiology 84:965-968 (1987).

[00119] El constructo también puede contener secuencias que potencian la estabilidad de la traducción y / o ARNm tales como intrones. Un ejemplo de uno de tales intrones es del primer intrón del gen de la histona II variante H3.III de *Arabidopsis thaliana*. Chaubet y otros. Journal of Molecular Biology, 225:569-574 (1992).

[00120] En aquellos casos en los que es deseable tener el producto expresado de la secuencia del nucleótido heterólogo dirigida a un orgánulo particular, particularmente el plástido, amiloplasto, o al retículo endoplásmico, o secretado en la superficie de la célula o extracelularmente, el casete de expresión puede comprender además una secuencia codificante para un péptido de tránsito. Tales péptidos de tránsito son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, el péptido de tránsito para la proteína transportadora de acilo,

la subunidad pequeña de RUBISCO, la sintasa vegetal EPSP y *Helianthus annuus* (ver Lebrun y otros. Patente de EE.UU. 5.510.417), *Zea mays* Brittle-1 chloroplast transit peptide (Nelson y otros. Plant Physiol 117(4):1235-1252 (1998); Sullivan y otros. Plant Cell 3(12):1337-48; Sullivan y otros., Planta (1995) 196(3):477-84; Sullivan y otros., J. Biol. Chem. (1992) 267(26):18999-9004) y similares. Además, los péptidos quiméricos de tránsito al cloroplasto son conocidos en la técnica, tales como el péptido de tránsito optimizado (véase, patente de EE.UU. número 5.510.471). Se han descrito péptidos de tránsito al cloroplasto adicionales en la Patente de EE.UU. número 5,717,084; 5,728,925. Una persona familiar con la técnica fácilmente comprenderá las muchas opciones disponibles para expresar un producto en un organoide en especial. Por ejemplo, la secuencia de la alfa amilasa de la cebada se utiliza a menudo para dirigir la expresión al retículo endoplasmático. Rogers, J. Biol. Chem. 260:3731-3738 (1985).

[00121] Los expertos en la técnica comprenderán que el uso de tecnologías de ADN recombinante pueden mejorar el control de la expresión de moléculas de ácido nucleico transfectadas mediante la manipulación de, por ejemplo, el número de copias de las moléculas de ácido nucleico dentro de la célula huésped, la eficiencia con la que estas moléculas de ácidos nucleicos se transcriben, la eficiencia con la que los transcritos resultantes se traducen, y la eficiencia de las modificaciones postraduccionales. Además, la secuencia promotora puede manipularse genéticamente para mejorar el nivel de expresión en comparación con el promotor nativo. Las técnicas recombinantes útiles para controlar la expresión de moléculas de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, la integración estable de las moléculas de ácidos nucleicos en uno o más cromosomas de la célula huésped, adición de secuencias de estabilidad de vectores a plásmidos, sustituciones o modificaciones de señales de control de transcripción (por ejemplo, promotores, operadores, potenciadores), sustituciones o modificaciones de señales de control de traducción (por ejemplo, sitios de unión a ribosomas , o secuencias de de Shine-Dalgarno o de Kozak), modificación de moléculas de ácido nucleico que corresponden al uso del codón de la célula huésped, y la supresión de secuencias que desestabilizan transcripciones.

[00122] Los genes indicadores o marcadores para la selección de células transformadas o tejidos o partes de plantas o plantas pueden ser incluidos en los vectores de transformación. Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a los anti-metabolitos tales como herbicidas o antibióticos, por ejemplo, la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato (Reiss, Plant Physiol. Meijer y otros, Plant Mol Biol 16:807-

820, 1991);.neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a los aminoglucósidos neomicina, kanamicina y paromicina (Herrera-Estrella, EMBO J. 2:987-995, 1983 y Fraley y otros Proc Natl Acad Sci EE.UU. 80:4803 (1983)); la higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a la higromicina (Marsh, Gene 32 :481-485, 1984, véase también Waldron y otros, Plant Mol. Biol. 5:103-108, 1985; Zhijian y otros, Plant Science 108:219-227, 1995);. trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman, Proc Natl Acad Sci, EE.UU. 85:8047, 1988); manosa-6-fosfato isomerasa que permite a las células utilizar manosa (WO 94/20627); ornitina descarboxilasa, que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2 (difluorometil)-DL ornitina (DFMO; McConlogue, 1987, En: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed); y la deaminasa del *Aspergillus terreus*, que confiere resistencia a la blasticidina S (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59:2336-2338, 1995).

[00123] Los marcadores seleccionables adicionales incluyen, por ejemplo, una acetolactato sintasa mutante, que confiere resistencia a la imidazolinona o sulfonilurea (Lee y otros., EMBO J. 7:1241-1248, 1988), un mutante psbA, que confiere resistencia a la atrazina (Smedá y otros., Plant Physiol. 103:911-917, 1993), o un mutante de la oxidasa del protoporfirinógeno (véase la patente de EE.UU. n. No. 5, 767, 373), o de otros marcadores que confieren resistencia a un herbicida tal como el glufosinato. Ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no están limitados a, genes que codifican resistencia al cloranfenicol (Herrera Estrella y otros, EMBO J. 2:987-992, 1983.); estreptomicina (Jones y otros, Mol. Gen. Genet. 210:86-91, 1987); espectinomicina (Bretagne-Sagnard y otros., Transgenic Res. 5:131-137, 1996); bleomicina (Hille y otros, Plant Mol. Biol. 7:171-176); sulfonamida (Guerineau y otros, Plant Mol. Biol. 15:127-136, 1990); bromoxinil (Stalker y otros, Science 242:419-423, 1988); glifosato (Shaw y otros, Science 233:478-481, 1986); fosfinotricina (DeBlock y otros., EMBO J. 6:2513-2518, 1987), y similares.

[00124] Una de las opciones para el uso de un gen selectivo es un ADN que codifica la resistencia al glufosinato y en una realización puede ser la fosfinotricina acetil transferasa (*pat*), gen *pat* o gen *bar* optimizados del maíz bajo el control del promotor del virus de las nervaduras de la yuca. Estos genes confieren resistencia a bialafos. Ver, (*ver*, Wohlleben y otros, (1988) *Gene* 70: 25-37); Gordon-Kamm y otros, Plant Cell 2:603; 1990; Uchimiya y otros,

Biotechnology 11:835, 1993; White y otros., Nucl. Acids Res. 18:1062, 1990; Spencer y otros., Theor. Appl. Genet. 79:625-631, 1990; y Anzai y otros., Mol. Gen. Gen. 219:492, 1989). Una versión del gen *pat* es el gen *pat* optimizado del maíz, que se describe en la patente de EE.UU. N º 6.096.947.

[00125] Además, pueden emplearse marcadores que faciliten la identificación de una célula vegetal que contiene el polinucleótido que codifica el marcador. Son útiles los marcadores puntuables o rastreables, en los cuales la presencia de la secuencia produce un producto medible y puede producir el producto sin destrucción de la célula vegetal. Los ejemplos incluyen una β-glucuronidasa, o gen uidA (GUS), que codifica una enzima para la que diversos sustratos cromogénicos son conocidos (por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 5.268.463 y 5.599.670); la cloranfenicol acetil transferasa (Jefferson y otros. The EMBO Journal vol. 6 No. 13 pp. 3901-3907); y fosfatasa alcalina. En una realización preferida, el marcador utilizado es el beta-caroteno o provitamina A (Ye y otros, Science 287:303-305-(2000)). El gen ha sido utilizado para mejorar la nutrición de arroz, pero en este caso se emplea como un marcador detectable, y la presencia del gen ligado a un gen de interés se detecta por el color dorado que proporciona. A diferencia de la situación en la que se utiliza el gen para su aporte nutricional a la planta, una cantidad más pequeña de las proteínas es suficiente para los propósitos de marcación. Otros marcadores detectables por escreening incluyen los genes antocianina / flavonoides en general (véase la discusión en Taylor y Briggs, The Plant Cell (1990) 2:115-127) incluso, por ejemplo, un gen R-locus, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta y otros., in Chromosome Structure and Function, Kluwer Academic Publishers, Appels and Gustafson eds., pp. 263-282 (1988)); los genes que controlan la biosíntesis de pigmentos flavonoides, tales como el gen C1 del maíz (Kao y otros., Plant Cell (1996) 8: 1171-1179; Scheffler y otros. Mol. Gen. Genet. (1994) 242:40-48) y C2 del maíz (Wienand y otros., Mol. Gen. Genet. (1986) 203:202-207); el gen B (Chandler y otros., Plant Cell (1989) 1:1175-1183), el gen p1 (Grotewold y otros, Proc. Natl. Acad. Sci USA (1991) 88:4587-4591; Grotewold y otros., Cell (1994) 76:543-553; Sidorenko y otros., Plant Mol. Biol. (1999) 39:11-19); los genes del locus bronce (Ralston y otros, Genetics (1988) 119:185-197; Nash y otros, Plant Cell (1990) 2 (11): 1039-1049), entre otros.

[00126] Otros ejemplos de marcadores apropiados incluyen la proteína fluorescente cian del gen (CYP) (Bolte y otros (2004) J. Cell Science 117: 943-54 y Kato y otros. (2002) Plant

Physiol 129: 913-42), el gen de la proteína fluorescente amarilla (PHIYFP™ de Evrogen; ver Bolte y otros. (2004) J. Cell Science 117: un gen lux, que codifica una luciferasa, la presencia de la cual puede ser detectada mediante, por ejemplo, películas de rayos X, contadores de centelleo, espectrofotometría fluorescente, cámaras de vídeo de poca luz , cámaras de conteo de fotones o luminometría de múltiples pocillos (Teeri y otros (1989) EMBO J. 8:343); un gen (GFP) de una proteína verde fluorescente (Sheen y otros., Plant J. (1995) 8(5):777-84); y DsRed2 con el cual las células vegetales transformadas con el gen marcador son de color rojo, y por tanto detectables a simple vista (Dietrich y otros. (2002) Biotechniques 2(2):286-293). Otros ejemplos adicionales incluyen un gen para la ß-lactamasa (Sutcliffe, Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. (1978) 75:3737), que codifica una enzima con varios sustratos cromógenos conocidos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromógena); un gen xylE (Zukowsky y otros., Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. (1983) 80:1101), que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir a los catecoles cromógenos: un gen α-amylasa (Ikuta y otros., Biotech. (1990) 8:241); y un gen de la tirosinasa (Katz y otros, J. Gen. Microbiol (1983.).129:2703), que codifica una enzima capaz de oxidar la tirosina a DOPA y dopaquinona, que a su vez se condensa para formar el compuesto melanina fácilmente detectable. Evidentemente, muchos de tales marcadores están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica.

IV. Las células y los organismos que comprenden DGT-28

[00127] En algunas modalidades, se proporciona una célula u organismo (por ejemplo, una célula vegetal o planta) que comprende un polipéptido heterólogo con al menos 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En modalidades particulares, una célula u organismo está previsto que comprenda un ácido nucleico heterólogo que codifique un polipéptido con al menos 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1; por ejemplo, un ácido nucleico *dgt-28.* Algunas modalidades incluyen una célula u organismo que comprenda un ácido nucleico heterólogo que se hibrida con otro ácido nucleico que contenga SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 bajo condiciones de alta astringencia

[00128] Una célula de planta, parte de planta o la planta pueden modificarse genéticamente para comprender un polipéptido heterólogo (por ejemplo, una proteína DGT-28) o un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un ácido nucleico *dgt-28*) por cualquiera de los diferentes métodos para introducir una molécula heteróloga que se conozca en el oficio. En modalidades particulares en este

documento, una molécula heteróloga se introduce en una célula de planta, parte de planta o la planta por un método seleccionado, por ejemplo, pero sin limitarse a: transformación y cría selectiva (por ejemplo, cría en cruzamiento retrógrado).

[00129] Cualquier especie de planta o célula de planta puede modificarse genéticamente para comprender un polipéptido heterólogo o un ácido nucleico en este documento. En algunos modos de realización, la célula de la planta modificada genéticamente no tiene la capacidad de regeneración para producir una planta. En algunas modalidades, las plantas que se modifican genéticamente de acuerdo con la presente descripción (por ejemplo, las células de la planta huésped) incluye, pero no se limita a, una planta superior, una planta dicotiledónea, plantas monocotiledóneas, una planta consumible, una planta de cultivo y una planta que se utilice por sus aceites (por ejemplo, una planta oleaginosa). Tales plantas incluyen, por ejemplo y sin limitación: alfalfa, soja, algodón, semilla de colza (canola), semilla de lino, maíz, arroz; ***brachiaria***; trigo, cártamo, sorgo, remolacha azucarera, girasol, tabaco y pastos (por ejemplo, el césped). En ejemplos particulares, una célula vegetal o planta genéticamente modificada en este documento incluye, por ejemplo, pero sin limitarse a: *Brassica napus*, mostaza india (*Brassica juncea*), mostaza etíope (*Brassica carinata*), nabo (*Brassica rapa*), repollo (*Brassica oleracea*), *Glycine max*, *Linum usitatissimum, Zea mays, Carthamus tinctorius, Helianthus annuus, Nicotiana tabacum; Arabidopsis thaliana*, la nuez de Brasil (Betholettia excelsa), ricino (*Ricinus communis*), coco (*Cocus nucifera*), cilantro (*Coriandrum sativum*); Gossypium spp, maní (*Arachis hypog*aea), jojoba (S*immondsia chinensis*), aceite de palma (*Elaeis guineeis*), olivo (*Olea eurpaea*), *Oryza sativa*, calabaza (*Cucurbita maxima*), cebada (*Hordeum vulgare*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), *Triticum spp* (incluyendo *Triticum durum* y *Triticum aestivum*) y lenteja de agua (*Lemnaceae sp.*). En algunas modalidades, la planta podría tener antecedentes genéticos particulares en cuanto a cultivares de élite, cultivares de tipo salvaje y las variedades comercialmente diferenciables.

[00130] Los ácidos nucleicos que se introducen en una célula vegetal podrían utilizarse para conferir rasgos deseados en esencialmente cualquier planta. Una amplia variedad de plantas y sistemas de células vegetales podrían manipularse para obtener las características fisiológicas y agronómicas deseadas descritas en este documento utilizando un ácido nucleico que codifique un polipéptido DGT y diversos métodos de transformación. Las modalidades en este documento podrían utilizar cualquiera de los muchos métodos para la transformación de plantas (y la producción de plantas modificadas genéticamente) que se conocen en el oficio. Se han desarrollado

numerosos métodos para la transformación de plantas, incluyendo protocolos de transformación biológica y física para las plantas dicotiledóneas, así como para las plantas monocotiledóneas (*Vea, por ejemplo*, Goto-Fumiyuki *et al*. (1999) Nat. Biotechnol. 17:282-6; Miki *et al*. (1993) Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology (Métodos en biología molecular y biotecnología de las plantas) (Glick, B. R. y Thompson, J. E., Eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp. 67-88). Además, se describen los vectores y los métodos de cultivo *in vitro* para las células vegetales y transformación y regeneración de tejidos de plantas, por ejemplo, en Gruber *et al*. (1993), *supra*, en págs. 89-119.

[00131] Las técnicas de transformación de plantas disponibles para introducir un ácido nucleico en una célula vegetal huésped incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a: la transformación con ADN-T desarmado usando *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes* como agente de transformación, transfección con fosfato de calcio, transformación con polibreno; fusión de protoplastos, electroporación (D'Halluin *et al.* (1992) Célula vegetal 4:1495 505); métodos ultrasónicos (por ejemplo, sonoporación), transformación de liposoma; microinyección, contacto con el ADN desnudo, contacto con vectores plasmídicos, contacto con vectores virales; biolística (por ejemplo, bombardeo de partículas de ADN (vea, por ejemplo, Klein *et al.* (1987) Naturaleza 327:70-3) y bombardeo de micropartículas (Sanford *et al*. (1987) Part. Sci. Technol. 5:27; Sanford (1988) Trends Biotech. 6:299, Sanford (1990) Physiol. Plant 79:206; and Klein *et al*. 1992) Biotechnology 10:268); transformación con WHISKERS de carburo de silicio (Kaeppler *et al.* (1990) Rep. de células vegetales 9:415-8); transformación de nanopartículas (vea, por ejemplo, Publicación de Patente de EE.UU. N º US2009/0104700A1); aerosol radiante y captación con polietilenglicol (PEG). En ejemplos específicos, un ácido nucleico heterólogo puede introducirse directamente en el ADN genómico de una célula vegetal.

[00132] Un método ampliamente utilizado para introducir un vector de expresión en una planta se basa en el sistema natural de transformación de *Agrobacterium.* Horsch *et al*. 1985) Science 227:1229. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias terrestres patógenas vegetales conocidas por ser útiles para transformar genéticamente las células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta. Kado (1991) Crit. Rev. Plant. Sci. 10:1. Detalles relativos a los sistemas de vector *Agrobacterium* y métodos para transferencia de genes con *Agrobacterium* también están

disponibles en, por ejemplo, Gruber *et al*, *supra*, Miki *et al*, *supra*, Moloney *et al.* (1989) Plant Cell Reports (Informes de células vegetales) 8:238, y la patente de EE.UU. N°. 4,940,838 y 5,464,763.

[00133] Si se utiliza *Agrobacterium* para la transformación, el ADN que se insertará típicamente se clona en plásmidos especiales, ya sea en un vector intermedio o en un vector binario. Los vectores intermedios no pueden replicarse en *Agrobacterium.* El vector intermedio podría transferirse a *A. tumefaciens* mediante un plásmido auxiliar (conjugación). El sistema superbinario de The Japan Tobacco es un ejemplo de dicho sistema (revisado por Komari *et al.* (2006) Methods in Molecular Biology (Métodos en biología molecular) (K. Wang, ed.) No. 343; *Agrobacterium* Protocols (Protocolos de *Agrobacterium)*, 2da Edición, Vol. 1, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp.15-41; y Komori *et al.* (2007) Plant Physiol. 145:1155-60). Los vectores binarios pueden replicarse tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium.* Los vectores binarios comprenden un gen marcador de selección y un enlazador o polienlazador, que están enmarcados por las regiones de los bordes derecho e izquierdo del ADN-T. Se pueden transformar directamente en *Agrobacterium* (Holsters, 1978). El *Agrobacterium* comprende un plásmido que lleva una región *vir.* El plásmido Ti o Ri también comprende la región *vir* necesaria para la transferencia del ADN-T. La región *vir* es necesaria para la transferencia del ADN-T en la célula vegetal. Puede contener ADN-T adicional.

[00134] Las funciones de virulencia del huésped de *Agrobacterium tumefaciens* dirigirán la inserción de una hebra T que contiene el marcador de constructo y adyacente en el ADN de la célula vegetal cuando la célula está infectada por las bacterias usando un vector binario de ADN-T (Bevan (1984) Nuc Acid Res. 12:8711 21) o el procedimiento de cocultivo (Horsch *et al*. (1985) Ciencia 227:1229-31). Por lo general, el sistema de transformación de *Agrobacterium* se utiliza para diseñar plantas dicotiledóneas. Bevan *et al.* (1982) Ann. Rev. Genet 16:357-84; Rogers *et al.* (1986) Methods Enzymol. 118:627-41. El sistema de transformación de *Agrobacterium* también podría utilizarse para transformar, así como transferir, los ácidos nucleicos a las plantas monocotiledóneas y las células vegetales. Vea la Patente de EE.UU. N º 5.591.616; Hernalsteen *et al*. (1984) EMBO J 3:3039-41; Hooykass-Van Slogteren *et al.* (1984) Nature 311:763-4; Grimsley *et al*. (1987) Nature 325:1677-9; Boulton *et al.* (1989) Plant Mol. Biol. 12:31-40; and Gould *et al.* (1991) Plant Physiol. 95:426-34.

[00135] Las manipulaciones genéticas de un huésped recombinante en el presente se puede realizar utilizando técnicas y pruebas estándar de genética, y se pueden llevar a cabo en cualquier célula huésped que sea adecuada para la manipulación genética. En algunas modalidades, una célula

huésped recombinante podría ser cualquier organismo o microorganismo huésped adecuado para la modificación genética o expresión de genes recombitantes. En algunas modalidades, un huésped recombinante podría ser una planta. El ADN recombinante estándar y las técnicas de clonación molecular utilizadas aquí son bien conocidas en el oficio y se describen en, por ejemplo, pero no limitado a: Sambrook *et al.* (1989), *supra*; Silhavy *et al.* (1984) Experiments with Gene Fusions (Experimentos con fusiones de genes), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel *et al.* (1987) *Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos actuales en la biología molecular)*, Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience, New York, NY.

[00136] Después de la introducción de un ácido nucleico en una célula vegetal, se puede cultivar la célula vegetal, y al aparecer el tejido diferenciador, como brotes y raíces, es posible generar las plantas maduras. En algunas modalidades, es posible generar una pluralidad de plantas. Las metodologías para regenerar plantas son conocidas en el hacer habitual del oficio y se pueden encontrar, por ejemplo, en Plant Cell and Tissue Culture (La célula vegetal y el cultivo de tejidos), 1994, Vasil and Thorpe Eds. Kluwer Academic Publishers y en: Plant Cell Culture Protocols (Protocolos de cultivo de la célula vegetal) (Methods in Molecular Biology (Métodos en la Biología Molecular) 111, 1999 Hall Eds Humana Press). Las plantas modificadas genéticamente que se describen en este documento se pueden cultivar en un medio de fermentación o hacer crecer en un medio adecuado como el suelo. En algunas modalidades, un medio de crecimiento adecuado para las plantas superiores puede ser cualquier medio de crecimiento para plantas, incluyendo, pero no limitado a, tierra, arena, cualquier otro medio particulado que soporte el crecimiento de la raíz (por ejemplo, vermiculita, perlita, etc.) o cultivo hidropónico, así como una luz adecuada, agua y suplementos nutricionales que facilitan el crecimiento de la planta superior.

[00137] Las células vegetales transformadas que se producen por cualquiera de las técnicas de transformación anteriores se pueden cultivar para regenerar una planta entera que posea el genotipo transformado y, por tanto, el fenotipo deseado. Dichas técnicas de regeneración se basan en la manipulación de ciertas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo de tejido, típicamente dependen de un marcador biocida o herbicida que se ha introducido junto con las secuencias de nucleótidos deseadas. La regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados se describe en Evans, *et al.*, "Protoplasts Isolation and Culture" (Aislamiento y cultivo de protoplastos) en *Handbook of Plant Cell Culture (Manual de cultivo de células vegetales)*, pp 124-176, Macmillian Publishing Company, New York, 1983; y Binding, *Regeneration of Plants, Plant*

Protoplasts (Regeneración de plantas, Protoplastos vegetales), pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. La regeneración también puede obtenerse a partir de callos de plantas, explantes, órganos, polen, embriones o partes de los mismos. Dichas técnicas de regeneración se describen generalmente en Klee *et al*. (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486.

[00138] En otros modos de realización, las células transformadas de la planta no tienen la capacidad de regeneración para producir una planta. Tales células pueden emplearse, por ejemplo, para desarrollar una célula de planta que disponga del fenotipo pertinente como, por ejemplo, resistencia al herbicida.

[00139] Una célula vegetal, callo, tejido o planta transformada puede identificarse y aislarse mediante la selección o cribado del material de la planta transgénica para los rasgos codificados por los genes marcadores presentes en el ADN transformante. Por ejemplo, la selección se puede realizar mediante el cultivo del material de planta transgénica, en medios que contienen una cantidad inhibidora del antibiótico o herbicida al cual la construcción del gen transformador confiere resistencia. Además, las plantas transformadas y las células vegetales también pueden identificarse mediante la detección de las actividades de cualesquiera genes marcadores visibles (por ejemplo, la ß-glucuronidasa, genes de luciferasa, o de gfp) que pudieran estar presentes en los constructos de ácidos nucleicos recombinantes. Dicha selección y las metodologías de detección son bien conocidas para los expertos en la técnica.

[00140] Una planta transgénica que contiene una molécula heteróloga en el presente puede producirse a través de reproducción selectiva, por ejemplo, cruzando sexualmente una primera planta parental que contenga la molécula con una segunda planta parental, produciendo de ese modo una pluralidad de plantas de primera progenie. Una planta de primera progenie se seleccionará posteriormente, esta debe ser resistente a un marcador seleccionable (por ejemplo, glifosato, resistencia que se le pueda conferir a la planta progenie mediante la molécula heteróloga aquí descrita). La planta de primera progenie puede entonces autofecundarse, produciendo de ese modo una pluralidad de plantas de segunda progenie. Luego, una planta de segunda progenie puede seleccionarse, esta debe ser resistente al marcador seleccionable. Estos pasos pueden incluir además el retrocruzamiento de la planta de primera progenie o la planta de segunda progenie a la segunda planta parental o una tercera planta parental.

[00141] También debe entenderse que dos plantas transgénicas diferentes también pueden acoplarse para producir descendencia que contenga dos genes exógenos, agregados,

independientemente segregantes. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigóticas para los genes tanto exógenos como añadidos. El retrocruzamiento a una planta parental y el cruzamiento de especies distintas con una planta no transgénica también se contemplan, ya que es una propagación vegetativa. Otros métodos de reproducción usados comúnmente para diferentes rasgos y cosechas se conocen en el oficio. El retrocruzamiento se ha utilizado para transferir genes para un rasgo heredado de manera sencilla y altamente heredable en un cultivar homocigótico deseable o línea pura, que es el padre recurrente. La planta resultante se espera que tenga los atributos del padre recurrente (por ejemplo, cultivar) y el rasgo deseable transferido desde el padre donante. Después del cruce inicial, los individuos que posean el fenotipo del padre donante se seleccionan y cruzan repetidas veces (cruzamiento retrógrado) con el padre recurrente. El padre resultante se espera que tenga los atributos del padre recurrente (por ejemplo, cultivar) y el rasgo deseable transferido desde el padre donante.

[00142] Un ácido nucleico también se puede introducir en un área predeterminada del genoma de la planta a través de la recombinación homóloga. Dentro de la técnica se han descrito los métodos para integrar de manera estable una secuencia de polinucleótidos dentro de un sitio cromosómico específico de una célula vegetal *mediante* la recombinación homóloga. Por ejemplo, la integración específica del sitio, como se describe en la Publicación de la Solicitud de la Patente de EE.UU. Nº 2009/0111188 A1, implica el uso de recombinasas o integrasas para mediar la introducción de una secuencia de polinucleótido donante en un objetivo cromosómico. Además, La Solicitud de Patente Internacional Nº WO 2008/021207, describe la recombinación homóloga con dedo de zinc para integrar de manera estable una o más secuencias de polinucleótidos donantes dentro de las ubicaciones específicas del genoma. El uso de recombinasas, como FLP/FRT que se describe en la Patente de EE.UU. Nº 6.720.475, o CRE/LOX que se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.658.772, se puede utilizar para integrar de manera estable una secuencia de polinucleótido en un sitio cromosómico específico. Finalmente, el uso de meganucleasas para dirigirse a los polinucleótidos donantes en una ubicación cromosómica específica se describe en Puchta *et al.,* PNAS EE.UU. 93 (1996) pp 5055-5060).

[00143] Otros métodos diferentes para la integración específica del sitio dentro de las células vegetales se conocen y aplican de manera general. (Kumar *et al., Trends in Plant Sci*. 6(4) (2001) pp. 155-159). Además, los sistemas de recombinación específicas al sitio que se han

identificado en varias organismos procariotas y eucariotas inferiores se pueden aplicar para su uso en plantas. Ejemplos de dichos sistemas incluyen, pero no se limitan a el sistema recombinasa R/RS del plásmido pSR1 de la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki et al. (1985) J. Mol. Biol. 182: 191-203), y Gin/gix system of phage Mu (Maeser y Kahlmann (1991) Mol. Gen. Genet. 230: 170-176).

[00144] En algunas modalidades, un ácido nucleico heterólogo que codifique un polipéptido con al menos 90% de identidad con la SEQ ID NO:1 se puede combinar opcionalmente con otro ácido nucleico en la célula u organismo huésped. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido con al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:1 se puede combinar o "apilar" con otro que proporcione una resistencia o tolerancia adicional al glifosato u otro herbicida, u otro que proporcione resistencia a insectos o enfermedades seleccionadas, o mejoras nutricionales, o mejora de las características agronómicas, u otro que proporcione las proteínas u otros productos útiles en la alimentación, alimentos, usos industriales, farmacéuticas o de otra índole. El "apilamiento" de dos o más secuencias de ácido nucleico de interés dentro de un genoma vegetal se puede conseguir, por ejemplo, *mediante* el cultivo tradicional de plantas utilizando dos o más eventos, la transformación de una planta con un constructo(s) que contiene(n) los ácidos nucleicos, retransformación de una planta transgénica o la adición de nuevos rasgos a través de la integración dirigida *mediante* recombinación homóloga.

[00145] Los ácidos nucleicos que pueden “apilarse” con una codificación de ácido nucleico heteróloga, un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad de SEQ ID NO:1 incluyen, por ejemplo pero sin limitarse a:

[00146] Genes o Secuencia de codificación (por ej. iRNA) que confieren resistencia a pestes o enfermedades

(A) Genes resistentes a enfermedades de plantas. Las defensas de las plantas suelen activarse mediante interacción específica entre el producto del gen de resistencia a la enfermedad (R) en la planta y el producto del gen de la antivirulencia correspondiente (Avr) en el patógeno. Una variedad de planta puede transformarse con un gen de resistencia clonado para crear plantas que sean resistentes a cepas patógenas específicas. Ejemplos de dichos genes incluyen, el gen Cf-9 del tomate para la resistencia a *Cladosporium fulvum* (Jones et al., 1994 Science 266:789), el gen *Pto* del tomate, que incluye una proteína cinasa para resistencia a *Pseudomonas syringae* pv.

tomate (Martin et al., 1993 Science 262:1432), y el gen *Arabidopsis* RSSP2 para la resistencia a *Pseudomonas syringae* (Mindrinos et al., 1994 Cell 78:1089).

(B) Una proteína del *Bacillus thuringiensis*, un derivado de ello o un polipéptido sintético modelado del mismo, como una secuencia nucleótida de un gen *Bt* d-endotoxina (Geiser et al., 1986 Gene 48:109), y un gen de insecticida vegetativo (VIP) (*ver, por ej.,* Estruch et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:5389-94). Además, la codificación de los genes de las moléculas de ADN d-endotoxin puede comprarse de la American Type Culture Collection [ATCC] (Rockville, Md.), bajo los números de acceso 40098, 67136, 31995 y 31998 de la ATCC.

(C) Una lectina como las secuencias nucleótidas de varios genes *Clivia miniata* de lectina de unión a manosa (Van Damme et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24:825).

(D) Una proteína vinculante de vitamina, como avidina y sus homólogos, que son útiles como larvicidas contra pestes de insectos. Consulte Pat. N.º 5.659.026 de EE. UU.

(E) Un inhibidor de enzima, por ej., un inhibidor de proteasa o un inhibidor de amilasa. Ejemplos de dichos genes incluyen el inhibidor de proteinasa cisteina del arroz (Abe et al., 1987 J. Biol. Chem. 262:16793), un inhibidor de proteinasa del tabaco I (Huub et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21:985), y un inhibidor de a-amilasa (Sumitani et al., 1993 Biosci. Biotech. Biochem. 57:1243).

(F) Una hormona o feromona específica de insecto como ecdisteroide y hormona juvenil, una variante de ella, una mimética basada en la misma o un antagonista o agonista de ella como la expresión de baculovirus de esterasa de hormona juvenil clonada, un desactivador de hormona juvenil (Hammock et al., 1990 Nature 344:458).

(G) Un péptido o neuropéptido específico del insecto que, al expresarse, interrumpe la fisiología de la peste afectada (J. Biol. Chem. 269:9). Los ejemplos de dichos genes incluyen un receptor de hormona diurética de insecto (Regan, 1994), una alostatina identificada en *Diploptera punctata* (Pratt, 1989), y neurotoxinas paralíticas específicas del insecto (Pat. N.º 5.266.361 de EE. UU.).

(H) Un veneno específico de insecto producido en la naturaleza por una serpiente, una avispa, etc. como un péptido insectotóxico de escorpión (Pang, 1992 Gene 116:165).

(I) Una enzima responsable de una hiperacumulación de monoterpeno, un sesquiterpeno, un esteroide, ácido hidroaxámico, un derivado de fenilpropanoide u otra molécula no proteica con actividad insecticida.

(J) Una enzima involucrada en la modificación, incluyendo la modificación de una molécula biológicamente activa, por ejemplo, enzima glicolítica, una enzima proteolítica, una enzima lipolítica, una nucleasa, una ciclasa, una transaminasa, una esterasa, una hidrolasa, una fosfatasa, una quinasa, una fosforilasa, una polimerasa, una elastasa, una chitinasa y una glucanasa, ya sean naturales o sintéticas. Ejemplos de dichos genes incluyen, un gen callas (aplicación publicada por PCT WO93/02197), secuencias de codificación de chitinasa (que pueden obtenerse, por ejemplo, de la ATCC bajo los números de acceso 3999637 y 67152), chitinasa anquilostoma del tabaco (Kramer et al., 1993 Insect Molec. Biol. 23:691), y gen ubi4-2 poliubiquitina del perejil (Kawalleck et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21:673).

(K) Una molécula que estimula la transducción de señales. Ejemplos de dichas moléculas incluyen secuencias nucleótidas para clones cADN calmodulina de frijoles chinos (Botella et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24:757) y una secuencia nucleótida de clon cADN calmodulina del maíz (Griess et al., 1994 Plant Physiol. 104:1467).

(L) Un péptido de momento hidrofóbico. *Consulte* Pat. N.ºs 5.659.026 y 5.607.914; esta última enseña los péptidos sintéticos antimicrobiales que confieren resistencia a la enfermedad.

(M) Una permeasa de membrana, un formador de canal o bloqueador de canal, como un análogo de péptido lítico cecropina-ß (Jaynes et al., 1993 Plant Sci. 89:43) que hace resistentes a las plantas de tabaco transgénico para *Pseudomonas solanacearum*.

(N) Una proteína viral invasiva o una toxina compleja derivada de la misma. Por ejemplo, la acumulación de proteínas de recubrimiento viral en células de planta transformadas imparten resistencia a la infección virósica y/o desarrollo de enfermedad efectuado por el virus de cual deriva el gen de proteína que recubre, al igual que los virus relacionados. Se ha conferido la resistencia de la proteína por medio del recubrimiento a plantas transformadas contra el virus mosaico de la alfalfa, virus mosaico del pepino, virus cepa del tabaco, virus X de la papa, virus Y de la papa, virus etch del tabaco, virus cascabeleo del tabaco y virus mosaico del tabaco. Consulte, por ejemplo, Beachy et al. (1990) Ann. Rev. Phytopathol. 28:451.

(O) Un anticuerpo específico de insecto o una inmunotoxina derivada del mismo. Así, un anticuerpo orientado a una función metabólica crítica en las entrañas del insecto desactivaría a la enzima afectada, matando al insecto. Por ejemplo, Taylor et al. (1994) Abstract #497, Seventh Int'l. Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions shows enzymatic inactivation in transgénic tobacco via production of single-chain antibody fragments.

(P) Un anticuerpo específico de virus. Consulte, por ejemplo, Tavladoraki et al. (1993) Nature 266:469, que muestra que las plantas transgénicas que expresan genes de anticuerpos recombinantes están protegidas contra ataques de virus.

(Q) Una proteína de desarrollo lento producida en la naturaleza por un patógeno o parásito. Así, la poligalacturonasas fúngicas a-1,4-D facilitan la colonización fúngica y la liberación de nutrientes de planta al solubilizar la pared celular de la planta galacturonasa homo-a-1,4-D (Lamb et al., 1992) Bio/Technology 10:1436. La clonación y caracterización de un gen que codifica un proteína inhibidora de endopoligalacturonasa del frijol es descripta por Toubart et al. (1992 Plant J. 2:367).

(R) Una proteína de desarrollo lento producida en la naturaleza por una planta, como el gen de desactivación de ribosoma de la cebada que entrega una resistencia superior a las enfermedades fúngicas (Longemann et al., 1992). Bio/Technology 10:3305.

(S) Interferencia de ARN, en la que una molécula de ARN se usa para inhibir la expresión del gen objetivo. Una molécula de ARN en un ejemplo es parcial o totalmente trenzada, lo que activa una respuesta silenciosa, resultando en una grieta de dsARN en pequeños ARN interferentes, que son incorporados en un complejo de objetivos que destruye los ARN homólogos. Consulte, por ej. Fire et al., Patent 6,506,559 de EE.UU.; Graham et al.6,573,099.

[00147] Genes que confieren resistencia a un herbicida

(A) Genes que codifican resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristema, como una imidazalinona, sulfonanilida o herbicida sulfonilurea. Genes ilustrativos en este código de categoría para una enzima ALS mutante (Lee et al., 1988 EMBOJ. 7:1241), que también se conoce como enzima AHAS (Miki et al., 1990 Theor. Appl. Genet. 80:449).

(B) Uno o más genes adicionales que codifiquen resistencia o tolerancia al glifosato impartido por la sintasa EPSP mutante y genes aroA, o mediante la desactivación metabólica por parte de genes como GAT (acetiltransferasa de glifosato) o GOX (oxidasa de glifosato) y otros compuestos fosfono como glufosinato (genes *pat* y *bar*; DSM-2), y ácidos ariloxifenoxipropiónicos y ciclohexanodionos (genes codificadores del inhibidor ACCase). Consulte, por ejemplo, Pat. N.º. 4.940.835 de EE. UU., que revela la secuencia nucleótida de una forma de EPSP que puede conferir resistencia al glifosato. Una molécula de ADN que codifica un gen *aroA* mutante puede obtenerse bajo el número de acceso 39256 de ATCC, y la secuencia

nucleótida del gen mutante se divulga en Pat. N.º 4.769.061 de EE. UU. La aplicación de patente europea N.º 0 333 033 y la Pat. N.º 4.975.374 de EE. UU. muestran secuencias de nucleótidos de genes de sintetasa de glutamina que confieren resistencia a herbicidas como L-fosfinotricina. La secuencia nucleótida del gen de fosfinotricinacetil-transferasa está publicada en la aplicación europea N.º 0 242 246. De Greef et al. (1989) Bio/Technology 7:61 describe la producción de plantas transgénicas que expresa la codificación de los genes quiméricos *bar* para la actividad de fosfinotricina acetil transferasa. Los genes ilustrativos que confieren resistencia a los ácidos ariloxifenoxipropiónicos y ciclohexanodiónicos, como setoxidima y haloxifop, son los genes Accl-S1, Accl-S2 y Accl-S3 descriptos por Marshall et al. (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435.

(C) Genes que codifican resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe la fotosíntesis, como la triazina (*psbA* y *gs+* genes) y un benzonitrilo (gen nitrilasa). Przibilla et al. (1991) Plant Cell 3:169 describe el uso de plásmidos que codifican genes *psbA* mutantes para transformar *Chlamydomonas*. Las secuencias nucleótidas para genes de nitrilasa se divulgan en Pat. N.º 4.810.648 de EE. UU., y las moléculas de ADN que contienen estos genes están disponibles bajo los números de acceso 53435, 67441 y 67442 de ATCC. La clonación y expresión de la codificación del ADN para una glutationa S-transferasa se describe en Hayes et al. (1992) Biochem. J. 285:173.

(D) Los genes que codifican resistencia o tolerancia a un herbicida que unido a hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), enzimas que catalizan la reacción en la que el para-hidroxifenilpiruvato (HPP) se transforma en homogentisato. Esto incluye herbicidas como isoxazoles (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, Pat. N.º. 5.424.276 de EE. UU.), en particular isoxaflutole, que es un herbicida selectivo para el maíz, diketonitrilos (EP496630, EP496631), en particular 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO2CH3-4-CF3 fenil)propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO2CH3-4-2,3Cl2fenil)propano-1,3-diona, triketonas (EP625505, EP625508, Pat. N.º 5.506.195 de EE. UU.), en particular sulcotriona, y pirazolinatos. Un gen que produce una superabundancia de HPPD en plantas puede brindar tolerancia o resistencia a dichos herbicidas, incluyendo, por ejemplo, a los genes descriptos en Patente N.ºs 6.268.549 y 6.245.968 de EE. UU., y Aplicación de Patente, Publicación N.º 20030066102.

(E) Genes que codifican resistencia o tolerancia a herbicidas fenoxi auxinos, como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y que también pueden transferir resistencia o tolerancia a

herbicidas de ariloxifenoxipropionato (AOPP). Ejemplos de dichos genes incluyen el gen de la enzima α-quetoglutarato-dependiente dioxigenasa (*aad-1*), descriptos en Patente N.º 7.838.733 de EE. UU.

(F) Genes que codifican resistencia o tolerancia a herbicidas fenoxi auxinos, como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y que también pueden conferir resistencia o tolerancia a herbicidas de piridiloxi auxina, como fluoroxipir o triclopir. Ejemplos de dichos genes incluyen el gen de la enzima dioxigenasa dependiente de α-quetoglutarato (*aad-12*) , descriptos en WO 2007/053482 A2.

(G) Genes que codifican resistencia o tolerancia a dicamba (*consulte, por ej*. Publicación de Patente N.º 20030135879).

(H) Genes que brindan resistencia o tolerancia a herbicidas que inhiben la protoporfirinogen oxidasa (PPO) (consulte Pat. N.º 5.767.373 de EE. UU.).

(I) Genes que brindan resistencia o tolerancia a herbicidas triazina (como atrazina) y herbicidas derivados de urea (como diuron) que se unen a las proteínas núcleo de los centros de reacción del fotosistema II (PS II) (Consulte Brussian et al., (1989) EMBO J. 1989, 8(4): 1237-1245.

[00148] Genes que confieren o contribuyen a un rasgo con valor agregado

(A) Metabolismo de ácidos grasos modificado, por ejemplo, transformando el maíz o *Brassica* con un gen antisentido o desaturasa estearoil-ACP para incrementar el contenido de ácido esteárico de la planta (Knultzon et al., 1992) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:2624.

(B) Contenido de fitato disminuido

(1) Introducción de un gen codificador de fitasa, como el gen de fitasa *Aspergillus niger* (Van Hartingsveldt et al., 1993 Gene 127:87), mejora la disociación de fitato, agregando más fosfato libre a la planta transformada.

(2) Se puede introducir un gen que reduzca el contenido de fitato. En maíz, esto, por ejemplo, puede lograrse clonando y luego reintroduciendo ADN asociado con el alelo simple que es responsable de los mutantes de maíz caracterizados por bajos niveles de ácido fítico (Raboy et al., 1990 Maydica 35:383).

(C) Composición de carbohidrato modificada efectuada, por ejemplo, transformando plantas con una codificación de gen para una enzima que altere el patrón de ramificación del almidón. Ejemplos de dichas enzimas incluyen, gen de fructosiltransferasa *Streptococcus mucus*

(Shiroza et al., 1988) J. Bacteriol. 170:810, gen de levansucrasa *Bacillus subtilis* (Steinmetz et al., 1985 Mol. Gen. Genel. 200:220), *Bacillus licheniformis* a-amilasa (Pen et al., 1992 Bio/Technology 10:292), genes de tomate invertasa (Elliot et al., 1993), gen amilasa de cebada (Sogaard et al., 1993 J. Biol. Chem. 268:22480), y enzima de ramificación del almidón de endosperma II (Fisher et al., 1993 Plant Physiol. 102:10450).

[00149] Se pueden emplear varios ensayos en conexión con la molécula de ácido nucleico de ciertas materializaciones de la divulgación. Las siguientes técnicas son útiles en una variedad de situaciones, y en una materialización, son útiles para detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico y/o del polipéptido codificado en una célula de planta. Por ejemplo, la presencia de la molécula puede determinarse en una variedad de formas, incluyendo el uso de una sonda o cebo de la secuencia, el ensayo ELISA para detectar la proteína codificada, un Western blot (inmuno-ensayo) para detectar la proteína o un Northern o Southern blot para detectar ARN o ADN. Se pueden emplear ensayos enzimáticos para detectar enzima DGT-28. También, se puede generar un anticuerpo que pueda detectar la presencia de la proteína DGT-28 usando procedimientos reconocidos por el arte. Técnicas adicionales, como la hibridización *in situ*, manchado de enzima e inmunomanchado, también pueden usarse para detectar la presencia u expresión de la construcción recombinante en órganos y tejidos específicos de la planta. Un transgén puede expresarse selectivamente en algunos tejidos de la planta o en algunas etapas de desarrollo, o el transgén puede expresarse en sustancialmente todos los tejidos de la planta, sustancialmente a lo largo de su vida. Sin embargo, también se aplica cualquier modo de expresión combinatoria.

[00150] El análisis Southern es un método de detección usado comúnmente, en el cual en ADN se corta con restricción endonucleosa y fraccionado en un gel agaroso para separar el ADN mediante peso molecular y después transferirlo a membranas de nylon. Luego se hibridiza con el fragmento de sonda que se etiquetó radioactivamente con ^{32}P (o otras etiquetas de sonda) y lavado en una solución SDS.

[00151] Similarmente el análisis Northern emplea un protocolo similar, en el que el ARN se corta con restricción endonucleosa y fracciona en un gel agaroso para separar el ARN mediante peso molecular y después transferirlo a membranas de nylon. Luego se hibridiza con el fragmento de sonda que se etiquetó radioactivamente con ^{32}P (o otras etiquetas de sonda) y lavado en una solución SDS. El análisis de ARN (*por ej*. mARN) aislado de los tejidos de interés

puede indicar niveles de expresión relativos. Por lo general si el mARNestá presente o la cantidad de mARN aumentó, puede asumirse que el transgén correspondiente está siendo expresado. El análisis Northern, u otros protocolos analíticos de mARN puede usarse para determinar los niveles de expresión de un transgén introducido o gen nativo.

[00152] En el análisis Western, en lugar de aislar el ADN/ARN, la proteína de interés se extrae y ubica en un gel acrilamida. La proteína se transfiere a una membrana y contactada con una sustancia clasificada. *Consulte por ej*. Hood et al., "Commercial Production of Avidin from Transgénic Maize; Characterization of Transformants, Production, Processing, Extraction and Purification" *Molecular Breeding* 3:291-306 (1997); Towbin et al, (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications" Proc Natl Acad Sci USA 76(9): 4350-4354; Renart et al. "Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure" Proc Natl Acad Sci USA 76(7): 3116-3120.

[00153] Los ácidos nucleicos aquí, o segmentos de los mismos, pueden usarse para diseñar cebadores para amplificación PCR. Al realizar la amplificación PCR, puede tolerarse un cierto grado de desajuste entre el cebador y la plantilla. Las mutaciones, inserciones y eliminaciones pueden producirse en un cebador dado mediante métodos conocidos por un artesano habilidoso.

[00154] Otro ejemplo de método de detección es la técnica de pirosecuenciado como la describe Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). En este método, se diseña un oligonucleótido que solapa al ADN genómico adyacente e inserta una unión de ADN. El oligonucleótido se hibridiza a un producto PCR de una sola cepa desde la región de interés (un cebador en la secuencia insertada y uno en la secuencia genómica de flanco) e incubado en presencia de una polimerasa de ADN, ATP, sulfurilasa, luciferasa, apirasa, adenosina 5' fosfosulfato y luciferina. Se agregan DNTP individualmente y la incorporación resulta en una señal leve que se mide. Una señal leve indica la presencia de una secuencia de flanco/inserto de transgén debido a una amplificación exitosa, hibridización y extensión de base múltiple.

[00155] Se describieron las balizas moleculares para uso en detección de secuencia. Escuetamente, una sonda oligonucleótida FRET está diseñada para que solape al genoma de flanco e inserte la unión de ADN. La única estructura de la sonda FRET resulta en la contención de una estructura secundaria que mantiene las fracciones de enfriamiento y fluorescencia en la

cercanía. La sonda FRET y los cebadores PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserto y uno en la secuencia genómica de flanco) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. Tras una exitosa amplificación PCR, la hibridización de la(s) sonda(s) FRET a la secuencia objetivo resulta en la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de las fracciones de enfriamiento y fluorescencia. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia de inserto de transgén/genómica debido a la amplificación e hibridización exitosa.

[00156] El ensayo de sonda de hidrólisis, también conocido como TAQMAN® (Life Technologies, Foster City, Calif.), es un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. Brevemente, una sonda oligonucleótida FRET está diseñada con un oligo dentro del transgén y uno en la secuencia genómica de flanco para detección de evento específico. La sonda FRET y los cebadores PCR (un cebador en la secuencia de ADN de inserto y uno en la secuencia genómica de flanco) se ciclan en presencia de una polimerasa termoestable y dNTP. La hibridización de la sonda FRET resulta en una grieta y liberación de la fracción fluorescente de la fracción de enfriamiento de la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia insertada de transgén/de flanco debido a la amplificación e hibridización exitosa.

[00157] ELISA o inmunoensayo vinculado a la enzima se conoces desde el año 1971. En general, los antígenos solubilizados en una solución amortiguadora son revestidos en una superficie plástica. Cuando se agrega suero, los anticuerpos pueden unirse al antígeno en la fase sólida. La presencia o ausencia de estos anticuerpos puede demostrarse cuando se conjuga a una enzima. Agregar el sustrato adecuado detectará la cantidad de conjugado unido que puede cuantificarse. Un ensayo ELISA común es aquel que usa anticuerpos policlonales anti (proteína) biotinilada. Por ejemplo, ELISA usado para determinación cuantitativa de niveles de laccasa puede ser un ensayo sándwich de anticuerpo que utiliza anticuerpos de conejo policlonales obtenidos comercialmente. El anticuerpo se conjuga a fosfatasas alcalinas para su detección. En otro ejemplo, un ensayo ELISA para detectar tripsina o tripsinógeno usa anticuerpos pliclonales antitripsinógeno o antitripsina y conjugado de fosfatasa alcalina estreptavidina.

[00158] Ciertas materializaciones se relacionan al proceso de hacer cruces usando una planta de una materialización de esta divulgación como al menos un padre. Por ejemplo, las materializaciones particulares se relacionan a una planta híbrida F_1 que tenga uno o ambos padres

como los aquí especificados. Otras materializaciones se relacionan con la semilla producida por dichos híbridos F_1. Otra materialización se relaciona con el método de producir una semilla híbrida F_1 cruzando una planta ejemplificada con una planta diferente (por ej. origen endócrino) y cosechar la semilla híbrida resultante. Otras materializaciones se relacionan con una planta ejemplificada que es padre hembra o macho. Las características de las plantas resultantes pueden mejorarse mediante una consideración cuidadosa de las plantas padres.

V. Tolerancia al glifosato mediada por DGT-28

[00159] Los polipéptidos que tengan al menos un 90% de secuencia de identidad de SEQ ID NO:1 pueden tener actividad enzimática EPSPS. Por lo tanto, los polipéptidos que tienen al menos un 90% de identidad de SEQ ID NO:1, ácidos nucleicos que codifican a un polipéptido que tengan al menos un 90% de identidad de SEQ ID NO:1 (*por ej*. SEQ ID NOs 2-4), y ácidos nucleicos que se hibridicen en un ácido nucleico que tenga SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 bajo condiciones de alta astringencia pueden usarse en algunas materializaciones para entregar tolerancia al glifosato a una célula u organismo (*por ej*. una célula de una planta o una planta). Siempre que una planta o una célula de una planta sea resistente a fórmulas herbicidas de glifosato puede ser útil en una variedad de aplicaciones, donde esas células de planta que tengan dicha resistencia puedan tolerar la exposición a una cantidad suficiente de glifosato que se usa para controlar al menos algunas malezas en un área bajo cultivo.

[00160] El glifosato, una composición que contiene N- (fosfonometil) glicina, es un componente muy usado en herbicidas. El glifosato se formula como una sal en concentrado líquido acuoso, un concentrado sólido, una emulsión o una microemulsión. El glifosato puede aplicarse sobre las plantas desde su nacimiento y a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo de la planta.

[00161] Las variedades de plantas tolerantes al glifosato usadas en combinación con las formulaciones herbicidas de glifosato se convirtieron en el programa estándar para el manejo de malezas en la producción de cultivos en Estados Unidos y en todo el mundo. La principal ventaja para los productores al usar plantas resistentes al glifosato es que permite aplicación simple y conveniente del glifosato, un espectro amplio, herbicida post aparición, para controlar plantas y pastos no deseados (*por ej*. "malezas") con excelente seguridad del cultivo y menor dependencia de aplicaciones herbicidas previas a la planta. Otros beneficios incluyen una mejor adecuación a sistemas de labranza reducidos. Los cultivos resistentes al glifosato expandieron las opciones para

el manejo de malezas y facilitó mucho el control de malezas, ya que es más barato y más flexible. Los productores informaron que realizan menos recorridas por el campo para aplicar herbicidas y menos viajes de cultivo, que ahorra combustible y reduce la erosión del suelo. Los cultivos resistentes al glifosato, por lo tanto, reducen los riesgos ambientales planteados por los herbicidas, mientras que incrementa la eficacia del control químico de malezas necesario.

[00162] Así, algunas materializaciones aquí funcionan para controlar malezas selectivamente en un área bajo cultivo que contenga una planta con un polipéptido que tenga al menos un 90% de identidad de SEQ ID NO:1, un ácido nucleico que codifique un polipéptido que tenga al menos un 90% de identidad de SEQ ID NO:1, y/o un ácido nucleico que se hibridice a un ácido nucleico que tenga SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 bajo condiciones de alta astringencia, en donde la planta incrementó su resistencia al glifosato cuando se la compara con una planta de la misma especia que no tenga ácido(s) nucleico(s) y/o polipéptido. En algunos ejemplos, un método provisto aquí comprende la aplicación de suficiente cantidad de glifosato herbicida al follaje del cultivo y malezas para controlar el crecimiento de estas últimas.

[00163] Las materializaciones particulares aquí, proveen un método para matar o controlar malezas o vegetación no deseada en un área de cultivo que contenga un cultivo (*por ej.* una planta que contenga un polipéptido que tenga al menos un 90% de identidad de SEQ ID NO:1, un ácido nucleico que codifique un polipéptido que tenga al menos un 90% de identidad de SEQ ID NO:1, y/o un ácido nucleico que se hibridice a un ácido nucleico que tenga SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 bajo condiciones de alta astringencia). En algunos ejemplos, el método comprende la aplicación de glifosato al cultivo y/o al área de cultivo, por ejemplo, aplicar una cantidad de glifosato al follaje de la planta cultivada y simultáneamente a las malezas que crecen cerca de ella, donde la cantidad es suficiente para que controle las malezas o la vegetación no deseada, mientras deja la planta cultivada sustancialmente ilesa.

[00164] Una composición de glifosato puede aplicarse a plantas a un índice de aplicación suficiente para entregar resultados biológicos deseados, por ejemplo, control de crecimiento de malezas sin afectar significativamente a las plantas cultivadas resistentes al glifosato. Estas tasas de aplicación se expresan por lo general como cantidad de glifosato por unidad de área tratada, *por ej.* gramos por hectárea (g/ha). Lo que constituye un “efecto significativo” varía según las normas y prácticas de quienes investigan, desarrollan, comercializan y usan composiciones y la selección de

índices de aplicación que son significativamente efectivas para una composición está dentro de la habilidad de aquellos que son capaces en el arte.

[00165] En ciertos ejemplos, la cantidad de composición de glifosato aplicada por unidad de área para dar un 85% de control de una especie de maleza como la medida por la reducción del crecimiento o mortalidad se usa para definir un índice de aplicación. La selección de un número de índices de aplicación de herbicida glifosato suficiente para controlar malezas en un área de cultivo está dentro de la habilidad de un científico agricultor ordinario. Aquellos hábiles en el arte reconocerán del mismo modo que las condiciones de planta individuales, el clima y las condiciones de crecimiento, junto con los ingredientes activos específicos y su índice de peso en la composición, puede influenciar el grado de efectividad del herbicida en una aplicación particular.

[00166] En algunas materializaciones, una composición de glifosato acuoso puede aplicarse a los tejidos foliares de plantas para matar o controlar el crecimiento de una amplia variedad de plantas no deseadas, incluyendo pasto anual o perenne y especies de malezas de hoja ancha, aplicando composiciones de glifosato acuoso a los tejidos foliares de plantas. La cantidad relativa de glifosato presente en una composición herbicida contemplada (*por ej*. un concentrado sólido particulado, concentrado líquido, composición lista para usar y composición de mezcla en tanque) puede variar dependiendo de muchos factores, incluyendo, por ejemplo, la especie de maleza a controlar y el método de aplicación. Generalmente hablando, sin embargo, la concentración de glifosato y opcionalmente un surfactante y/o algún otro adyuvante o aditivo (como se describió en otro lado aquí) usado en la composición herbicida es suficiente para controlar malezas dentro de un área de cultivo.

[00167] Una composición herbicida de pulverizador puede aplicarse como una solución acuosa o dispersión, mientras la composición se fabrica lista para aplicación o los resultados de la posterior disolución de un concentrado de glifosato líquido o la adición de agua a un concentrado de glifosato sólido particulado. Sin embargo, el término “acuoso” como se usa aquí, incluye composiciones que comprenden una pequeña cantidad de solvente no acuoso, siempre que el solvente predominante sea agua. Una composición de pulverizador herbicida puede aplicarse al follaje de plantas a tratar mediante cualquiera de los métodos adecuados que son bien conocidos por aquellos que tienen habilidad en el arte, incluyendo técnicas de aplicación aérea y terrestres (*por ej*. barra pulverizadora terrestre, un pulverizador manual, y un aplicador de mecha).

[00168] En algunos ejemplos, una composición de concentrado líquido se formula para incluir al glifosato en una concentración de al menos alrededor de 50 gramos, al menos alrededor de 75 gramos, o al menos alrededor de 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690 o 700 gramos (equivalente ácido o a.e.) por litro o más. El rango de concentración de glifosato puede ser, por ejemplo, desde alrededor de 50 a cerca de 680 gramos (a.e.) por litro (gpl) desde alrededor de 100 a cerca de 600 gpl, desde alrededor de 250 a cerca de 600 gpl y desde alrededor de 360 a cerca de 540 gpl.

[00169] Cuando se expresa como un porcentaje en peso basado en el peso total del concentrado del glifosato, un concentrado líquido puede tener, por ejemplo, al menos cerca de 10 % en peso de glifosato (a.e.), al menos alrededor de 15 % en peso, y al menos un 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, 62, 63, 64, 65, 66, 67, o 68 % en peso o más. El rango de concentración de glifosato puede ser, por ejemplo desde cerca del 10% en peso hasta alrededor de 70% en peso a.e. desde cerca del 20% en peso hasta alrededor de 68% en peso o desde cerca de 25% en peso hasta alrededor de 45% en peso.

[00170] Si se aplica el glifosato como una composición lista para usarse, la concentración del glifosato puede ser, por ejemplo, de alrededor del 1% en peso hasta cerca del 3% en peso a.e. y desde cerca del 1% en peso hasta el 2% en peso.

[00171] Las composiciones de los pulverizadores puede formularse para aplicación de por ejemplo, al menos cerca de 1 galón de composición de pulverizador por acre, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 galones por acre y más. El volumen de pulverización de la composición de pulverizador puede variar, por ejemplo de alrededor de 1 galón hasta cerca de 100 galones, de alrededor de 2 galones hasta cerca de 40 galones por acre y desde alrededor de 2 galones hasta alrededor de 5 galones por acre para aplicación de aérea, y desde 5 galones hasta cerca de 20 galones por acre para aplicación terrestre.

[00172] En algunos ejemplos, una formulación de concentrado líquido que tenga una fase acuosa donde el glifosato esté presente predominantemente en la forma de una sal y una fase no acuosa que contenga opcionalmente un segundo ingrediente herbicida activo que sea relativamente insoluble en agua puede emplearse. Dichas formulaciones pueden incluir por ejemplo, emulsiones

(incluyendo macroemulsiones y microemulsiones, agua en aceite, aceite en agua y tipos en agua) suspensiones y suspoemulsiones. La fase no acuosa puede comprender en ciertas instancias un componente microencapsulado (*por ej*. un herbicida microencapsulado). En formulaciones que tengan fase no acuosa, la concentración de glifosato a.e. en la composición como un todo puede sin embargo estar dentro de los rangos ejemplares particulares recitados aquí para formulaciones de concentrado acuoso.

[00173] Las formas de sal adecuadas de glifosato que pueden usarse según cualquiera de las formulaciones incluyen, por ejemplo, sales metálicas alcalinas, por ejemplo, sales de sodio y potasio, sales de amonio, sales de di-amonio como dimetilamonio, sales alcalinas, por ejemplo, dimetilamina y sales de isopropilamina, sales alcanolaminas, por ejemplo, sales de etanolamina, sales de alquilsulfonio, por ejemplo, sales de trimetilsulfonio, sales de sulfoxonio y mezclas o combinaciones del tipo. Algunos ejemplos de formulaciones comerciales de glifosato incluyen sin restricción: GLYPHOMAX™, GLYPHOMAX™ XRT, GLYPHOMAX™ PLUS, DURANGO™, ROUNDUP™ ULTRA, ROUNDUP™ ULTRAMAK, ROUNDUP™ CT, ROUNDUP™ EXTRA, ROUNDUP™ BIOACTIVE, ROUNDUP™ BIOFORCE, RODEO™, POLARIS™, SPARK™, ACCORD™ SP, ACCORD™ XRT, y ACCORD™ CONCENTRATE, todos los cuales contienen glifosato en su sal de isopropilamonio (IPA); ROUNDUP™ DRY y RIVAL™, que contienen glifosato como su sal de amonio; ROUNDUP™ GEOFORCE, una formulación de glifosato sódico; TOUCHDOWN™, una formulación de sal de glifosato trimesio, TOUCHDOWN™ IQ, una formulación de sal de glifosato de di-amonio, TOUCHDOWN™ TOTAL IQ, una formulación de glifosato potásico, y RUNDUP™ WEATHERMAX, una formulación de glifosato potásico. Las formulaciones de glifosato pueden incluir agentes de seguridad, surfactantes y/o adyuvantes.

[00174] Si se desea, el usuario puede mezclar uno o más adyuvantes con una composición de glifosato y el agua de la disolución cuando prepara una formulación para aplicar. Dichos adyuvantes pueden incluir surfactante adicional y/o una sal inorgánica (*por ej.* sulfato de amonio) con el objetivo de mejorar más la eficacia del herbicida.

[00175] Si lo desea, el usuario puede también emplear agentes de seguridad adecuados en la formulación de glifosato para proteger más a las plantas y/o agregar resistencia cruzada a más herbicidas. Los agentes de seguridad que reducen la fitotoxicidad de herbicidas para las plantas cultivadas mediante un mecanismo molecular o fisiológico, sin comprometer la eficacia del control de malezas. Los agentes aseguradores suelen actuar para incrementar el sistema inmunológico de la

planta activando/expresando cP450. Los agentes aseguradores ejemplares incluyen sin limitarse a: benoxacor, cloquintocet, ciometrinil, diclormida, dicoclonona, dietolato, fenclorazole, fenclorim, flurazole, fluxofenim, furilazole, isoxadifen, mefenpyr, mefenato, anhídrido naftálico y oxabetrinil.

[00176] Los agentes aseguradores pueden usarse para proteger cultivos de pasto de muchas semillas, por ejemplo y sin limitarse a, maíz, sorgo granífero y arroz sembrado en humedal, contra herbicidas aplicados antes de la aparición e incorporados antes de la planta de las familias de tiocarbonato y cloroacetanilidas. Los agentes aseguradores también se desarrollaron para proteger los cultivos de cereal invernales como el trigo, contra aplicaciones de postemergencia de herbicidas sulfoniluera y ariloxifenoxipropionato. El uso de agentes aseguradores para la protección del maíz y el arroz contra herbicidas de sulfoniluera, imidazolinona, cicloexanediona, isoxazola y triketona también está bien establecido.

[00177] Los activadores de planta (una nueva clase de componentes que protegen a las plantas activando sus mecanismos de defensa) también pueden usarse en las materializaciones aquí descriptas. Los activadores de plantas ejemplares incluyen acibenzolar y probenazole.

[00178] Las materializaciones de la invención presente se definen más en los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos se dan solamente como ilustración. Desde la discusión anterior y de estos ejemplos, una persona hábil en el arte puede determinar las características esenciales de esta invención y sin apartarse del espíritu y el alcance, puede realizar diferentes cambios y modificaciones de las materializaciones de la invención para adaptarla a los múltiples usos y condiciones. Así, las diferentes modificaciones de las materializaciones de la invención, además de las mostradas y descriptas aquí, serán aparentes a aquellos hábiles en el arte a partir de la siguiente descripción. Dichas modificaciones también están intencionadas para que entren en el alcance de las declaraciones anexadas. Lo siguiente se incluye como ilustración y no limita el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos

[00179] Las materializaciones de la presente publicación se describen con mayor profundidad en los siguientes ejemplos, que se ofrecen como ilustración y no limitan la invención de cualquier manera.

[00180] Una mutación de aminoácido simple (G96A) en la enzima 5-enolpiruvil shikimato-3- fosfato sintasa (EPSPS) de *Escherichia coli* puede resultar en insensibilidad al glifosato (Padgette *et al.,* (1991); Eschenburg *et al.,* (2002); Priestman *et al.,* (2005); Haghani *et al.,* (2008)). Mientras que esta mutación confiere resistencia al glifosato, también se la conoce por afectar negativamente a la unión de sintasa EPSP con su sustrato natural, fosfoenolpiruvato (PEP). El cambio resultante en la eficiencia de unión de sustrato puede resultar en una enzima mutada no apta para dar resistencia *in planta* al glifosato.

[00181] La base de datos de NCBI Genbank se buscó *in silico para* proteína de sintasa EPSP y secuencias polinucleótidas que contienen naturalmente una alanina en una posición análoga dentro de la enzima EPSP sintasa como la mutación G96A que se introdujo en la versión *E. coli* de la enzima (Padgette *et al.,* (1991); Eschenburg *et al.,* (2002); Priestman *et al.,* (2005); Haghani *et al.,* (2008)).

[00182] Una enzima que se identifico como que contiene una alanina natural en esta posición fue DGT-28 (GENBANK ACC NO: ZP_06917240.1) de *Streptomyces sviceus* ATCC29083. Mayor búsqueda de información *in silico* reveló otras tres enzimas *Streptomyces* únicas con mayor homología a DGT-28; DGT-31 (GENBANK ACC NO: YP_004922608.1); DGT-32 (GENBANK ACC NO: ZP_04696613); y DGT-33 (GENBANK ACC NO: NC_010572). Cada una de estas enzimas contiene una alanina natural en una posición análoga dentro de la enzima de sintasa EPSP como la de la mutación G96A que se introdujo en la versión *E. coli* de la enzima. **FIG. 1**.

[00183] Debido a que las proteínas de sintasa EPSP de los distintos organismos son de largos diferentes, el número de la mutación para la versión *E.coli* de la enzima de sintasa EPSP no necesariamente corresponde con el número de la mutación para las enzimas de sintasa EPSP de los otros organismos. Estas enzimas de sintasa EPSP identificadas no se caracterizaron previamente en relación a resistencia al glifosato o afinidad al sustrato PEP. Incluso, estas enzimas de sintasa EPSP representan una nueva clase de enzimas de sintasa EPSP y no contienen motivos de secuencia que se hayan usado para caracterizar los descriptos previamente Clase I (secuencias de planta derivadas descriptas con mayor detalle en la Patente N.º RE39247 de EE. UU.), II (secuencias derivadas de bacterias descriptas con mayor profundidad en la Patente N.º RE39247 de EE. UU.), y III (secuencias derivadas de bacterias descriptas con mayor profundidad en la patente International Patent Application WO 2006/110586) enzima de sintasa EPSP.

[00184] Las nuevas enzimas DGT-28, DGT-31, DGT-32, y DGT-33 se caracterizaron como resistentes al glifosato y con afinidad al sustrato PEP en comparación con las enzimas de sintasa EPSP de Clase I.Las siguientes enzimas de Clase I; DGT-1 de *Glycine max*, DGT-3 de *Brassica napus* (GENBANK ACC NO: P17688), y DGT-7 de *Triticum aestivum* (GENBANK ACC NO: EU977181) se usaron para comparación. Las enzimas de sintasa EPSP de Clase I y las variantes mutantes en adelante se sintetizaron y evaluaron. Una mutación introducida en las enzimas de sintasa EPSP de la planta consistió con la mutación de glicina a alanina realizada dentro de la enzima de sintasa EPSP en una ubicación similar a la de la mutación G96A de la versión *E. coli* de la enzima. Además, se introdujeron mutaciones de Treonina a Isoleucina y Prolina a Serina dentro de estas enzimas de sintasa EPSP de Clase I en posiciones análogas a las del aminoácido 97 (T a I) y aminoácido 101 (P a S) en la sintasa EPSP de *E. coli* como se describe en Funke *et al.*, (2009).

[00185] **FIG. 1** muestra una alineación parcial de secuencia de DGT-28, DGT-31, DGT-32, y DGT-33 a otras enzimas de sintasa EPSP. Las cuatro enzimas DGT comparten una alanina conservada en la posición 96 de aminoácido *aroA* de la enzima de sintasa EPSP. La ubicación de este aminoácido está indicada por un asterisco y el residuo del aminoácido está subrayado.

[00186] **FIG. 2** muestra la alineación de las enzimas DGT-1, DGT-3, y DGT-7. La ubicación del residuo de aminoácido que se mutó de glicina a alanina se indica con el primer asterisco. La ubicación del residuo de aminoácido que se mutó de treonina a isoleucina se indica con el segundo asterisco. La ubicación del tercer residuo de aminoácido que se mutó de prolina a serina se indica con el tercer asterisco. Estas mutaciones se introdujeron en diferentes versiones de DGT-1, DGT-3, y DGT-7. Las diferentes versiones (v1, v2, v3… vN) de los genes que contienen las mutaciones se describen con mayor detalle a continuación.

Ejemplo 2: Optimizacion de la Secuencia para la Expresion en Plantas y Bacteria

[00187] Optimizacion de Plantas El codón parcial para dicotiledóneas y monocotiledóneas (maíz) fue calculado como la frecuencia en la cual un único codón es usado relativamente a los codones para todos los aminoácidos. **Cuadro 1.** Alternativamente, el codón parcial puede ser calculado como la frecuencia en la cual un solo codón es usado para codificar un aminoácido en particular, relativo a todos los otros codones para el aminoácido en cuestión (condones sinónimos). En el diseño de las regiones de codificación para la expresión en plantas, el codón primario ("la

primera elección") preferido por la planta fueron determinados, así como el segundo, tercero, cuarto, etc.; y son elecciones de los codones preferidos cuando múltiples elecciones existen.

[00188] Análisis de la secuencia de codificación DGT-28 desde *S.sviceus* reveló la presencia de varias secuencias de motivos que pueden ser perjudiciales a la óptima expresión de la planta, así como la composición de un codón no-óptimo para la expresión en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.

[00189] **Tabla 1.** La representación del codón sinónimo de las regiones codificadoras de los genes de plantas monocotiledóneas (maíz %) y dicotiledóneas (dicot %), se encuentran en las columnas D, E, I y J. Los valores de un conjunto de representaciones del codón parcialmente equilibrado para un gene sintético optimizado para planta se encuentran en las columnas C y H.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Amino Acido	**Codón**	**Peso Promedio**	**Maíz %**	**Dicot %**	**Amino Acido**	**Codón**	**Peso Promedio**	**Maíz %**	**Dicot %**
ALA (A)	**GCA**	25,5	18	25	**LEU (L)**	**CTA**	**DNU**	8	8
	GCC	35,6	**34**	27		**CTC**	34,3	26	19
100	**GCG**	**DNU**	24	6		**CTG**	**DNU**	**29**	9
	GCT	39,0	24	**42**	**100**	**CTT**	34,3	17	**28**
ARG (R)	**AGA**	27,4	15	**30**		**TTA**	**DNU**	5	10
	AGG	31,5	**26**	25		**TTG**	31,4	15	**26**
	CGA	**DNU**	9	8	**LYS (K)**	**AAA**	30,6	22	39
100	**CGC**	21,7	**24**	11	**100**	**AAG**	69,4	**78**	**61**
	CGG	**DNU**	15	4	**MET (M)**	**ATG**	**100**	**100**	**100**
	CGT	19,4	11	21	**PHE (F)**	**TTC**	63,2	**71**	**55**
ASN (N)	**AAC**	61,4	**68**	**55**	**100**	**TTT**	36,8	29	45
100	**AAT**	38,6	32	45	**PRO (P)**	**CCA**	41,4	26	**42**
ASP (D)	**GAC**	52,6	**63**	42		**CCC**	25,3	**24**	17
100	**GAT**	47,4	37	**58**	**100**	**CCG**	**DNU**	**28**	9
CYS (C)	**TGC**	61,8	**68**	**56**		**CCT**	33,3	22	32
100	**TGT**	38,2	32	44	**SER (S)**	**AGC**	26,0	**23**	18
FIN	**TAA**		20	**48**		**AGT**	**DNU**	9	14
100	**TAG**		21	19	**100**	**TCA**	22,4	16	19
	TGA		**59**	33		**TCC**	26,3	**23**	18
GLN (Q)	**CAA**	48,4	38	**59**		**TCG**	**DNU**	14	6
100	**CAG**	51,6	**62**	41		**TCT**	25,4	15	**25**
GLU (E)	**GAA**	38,8	29	**49**	**THR (T)**	**ACA**	28,0	21	27
100	**GAG**	61,2	**71**	**51**		**ACC**	39,5	**37**	30
GLY (G)	**GGA**	28,5	19	**38**	**100**	**ACG**	**DNU**	22	8
	GGC	29,0	**42**	16		**ACT**	32,5	20	**35**
101	**GGG**	16,0	20	12	**TRP (W)**	**TGG**	**100**	**100**	**100**

	GGT	26,6	20	33	TYR (Y)	TAC	65,0	73	57
HIS (H)	CAC	54,1	62	46	100	TAT	35,0	27	43
100	CAT	45,9	38	54	VAL (V)	GTA	DNU	8	12
ILE (I)	ATA	15,9	14	18		GTC	28,7	32	20
100	ATC	47,9	58	37	100	GTG	38,0	39	29
	ATT	36,4	28	45		GTT	33,3	21	39

*DNU = No usar

[00190] Para diseñar los genes optimizados de plantas que codifican una proteína DGT-28, las secuencias de ADN fueron diseñadas para codificar las secuencias de aminoácidos, utilizando un código redundante genético establecido desde la tabla parcial de codones compilada a partir de la proteína de las secuencias de codificación, para las plantas huéspedes particulares. En la **Tabla 1**, las columnas D y I presentaron las distribuciones (en % de uso de todos los codones para ese aminoácido) de codones sinónimos para cada aminoácido, como se encuentran en las regiones codificantes de plantas monocotiledóneas (maíz). Las columnas E y J presentaron las distribuciones (en % de uso de todos los codones para ese aminoácido) de codones sinónimos para cada aminoácido, como se encuentran en las regiones codificantes de plantas dicotiledóneas. Algunos codones sinónimos, para algunos aminoácidos, raramente se encuentran en los genes de plantas (por ej. CGG). Por lo general, un codón es consideradoa que se utiliza raramente, si está representado en alrededor de 10% o menos del tiempo para codificar el aminoácido correspondiente en los genes de cualquier tipo de planta (indicado por DNU en las columnas C y H de la Tabla 1). Para equilibrar la distribución de las elecciones de codones restantes para un aminoácido, una representación promedio para cada codón se calculó usando la siguiente fórmula:

Promedio Ponderado % de C1 = 1/(%C1 + %C2 + %C3 + *etc*.) x %C1 x 100, (1)

donde C1 es el codón en cuestión, y %C2, %C3, etc. representan el promedio de los valores de % para dicots de los condones sinónimos restantes (valor % promedio para codones relevantes son tomados de las Columnas C y H) de **Tabla 1**.

[00191] El % del valor medio ponderado para cada codón se da en las columnas C y H de la Tabla 1.

[00192] Utilizando el procedimiento anterior, una nueva secuencia de ADN que codifica esencialmente la secuencia de aminoácidos de la proteína DGT-28, fue diseñado para la expresión óptima en plantas dicotiledóneas, usando una distribución equilibrada de codones utilizados con frecuencia encontrados en genes de plantas dicotiledóneas. Una segunda secuencia de ADN que codifica esencialmente la secuencia de aminoácidos de la proteína DGT-28 fue diseñado para la expresión óptima en plantas dicotiledóneas, usando una distribución equilibrada de codones utilizados con frecuencia encontrados en genes de plantas monocotiledóneas. Las dos nuevas secuencias de ADN difieren de las secuencias originales de ADN que codifican el *dgt-28* por la sustitución de la planta (primera, segunda, tercera, o cuarta elección de preferencia) para especificar codones del aminoácido apropiados en cada posición dentro de la secuencia de aminoácidos de proteínas.

[00193] Diseño de las secuencias de ADN optimizados de plantas se iniciaron por la traducción-invertida de las secuencias de la proteína DGT-28 (Numero de Acceso Genbank: ZP_06917240.1). SEQ ID NO: 1 fue traducido invertidamente utilizando una tabla parcial de codón dicotiledónea construida a partir de la **Tabla 1**, columnas E y J. Una segunda traducción invertida de SEQ ID NO:1 se completó usando una tabla parcial de codones monocotiledónes construida a partir de la **Tabla 1**; Columnas D e I.

[00194] Las secuencias iniciales de traducción invertida fueron modificados por medio de la compensación en los cambios del codón (manteniendo al mismo tiempo la representación global media ponderada), quitando o agregando sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, y eliminando estructuras secundarias intracatenarias altamente estables y otras secuencias que podrían ser perjudiciales para manipulaciones de clonación o expresión del gen modificado en plantas. La secuencia de ADN se volvió a analizar para los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción que podrían haberse creado por las modificaciones. Los sitios identificados fueron modificados mediante la sustitución de los codones relevantes con codones de primera elección, o de segunda, tercera, o cuarta preferencia. Otros sitios en las secuencias que podrían afectar a la transcripción o traducción del gen de interés, incluyen el exón: cruces de intrones (5 'o 3'), poli A señales de adición, y los señales de terminación de ARN polimerasa. Las secuencias modificadas fueron analizadas y modificadas aún más para reducir la frecuencia de TA o dobletes CG, y para aumentar la frecuencia de dobletes TG o CT. Además de estos dobletes, los bloques de secuencia que tienen más de seis residuos consecutivos de [G + C] o [A + T] pueden afectar a la transcripción o

traducción de la secuencia. Por lo tanto, estos bloques de secuencias también se modificaron mediante la sustitución de los codones de la primera o segunda elección, etc.; con otros codones preferidos de elección. Codones raramente utilizados no se incluyeron en un grado sustancial en el diseño de genes, se utiliza sólo cuando sea necesario para dar cabida a un criterio de diseño diferente de composición de codones, *per se* (por ej., adición o eliminación de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción).

[00195] El recién diseñado, secuencia optimizada de poli nucleótidos *dgt-28 v5* de planta dicotiledónea optimizada, está enumerada en la SEQ ID NO:2. El recién diseñado, secuencia optimizada de poli nucleótidos *dgt-28 v6* de planta monocotiledónea, está enumerada en la SEQ ID NO:3; esta secuencia se modificó ligeramente mediante la inclusión de una alanina en la segunda posición del amino ácido para introducir un sitio de enzima de restricción. Las secuencias de ADN resultantes tienen un mayor grado de diversidad de codones, una composición de bases deseable, contiene sitios de reconocimiento de enzimas de restricción estratégicamente ubicados, y carece de secuencias que pueden interferir con la transcripción del gen, o con la traducción del producto ARNm.

[00196] Síntesis de fragmentos de ADN que comprenden SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO: 3 contienen secuencias adicionales, tales como marcos-de-6-paradas (codones de parada situados en los seis marcos de lectura que se agregan al extremo 3' de la secuencia codificante), y un sitio 5' de restricción para la clonación fueron realizados por proveedores comerciales (DNA2.0, Menlo Park, CA). La molécula de ácido nucleico sintética se clonó después en vectores de expresión y transformada en plantas o bacterias como se describe en los Ejemplos a continuación.

[00197] Estrategias similares de optimización de los codones fueron usadas para diseñar *dgt-1*, *dgt-3 v2* (G173A), *dgt-3 v3* (G173A; P178S), *dgt-3 v4* (T174I; P178S), *dgt-7 v4* (T168I; P172S), *dgt-32 v3*, *dgt-33 v3*, y *dgt-33 v3*. La versión del codón optimizado de estos genes son listados como SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, and SEQ ID NO:144, respectivamente.

[00198] Optimizacion Bacteriana Una nueva secuencia de ADN que codifica la proteína DGT-28 de SEQ ID NO:1 que esta optimizada para la expresión en células *in Escherichia coli* fue diseñada. Diseño de la secuencia optimizada del ADN del *E. coli*-de fue iniciada por traducción inversa de la secuencia de la proteína de SEQ ID NO:1, utilizando una propiedad de un protocolo de optimización del codón de GeneArt (Regensburg, Alemania). La secuencia inicial fue optimizada

por medio de la compensación en los cambios del codón (manteniendo al mismo tiempo la representación global media ponderada), quitando o agregando sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, y eliminando estructuras secundarias intracatenarias altamente estables y otras secuencias que podrían ser perjudiciales para manipulaciones de clonación o expresión del gen modificado. Un ejemplo de tal secuencia perjudicial para evitar dentro de una región de codificación es una secuencia de unión a RNA ribosómico 16S ("Shine-Dalgarno"), tales como AGGAGG, lo que podría codificar, por ejemplo, dos aminoácidos consecutivos de arginina, pero que también podría servir como un señal intragénico (y por lo tanto indeseable) de iniciación de traducción. La secuencia de ADN *E. coli*-parcial *dgt*-28 (*dgt*-28 *v1*) que codifica la proteína de SEQ ID NO: 1 se da como SEQ ID NO: 4.

[00199] Para facilitar la clonación y para asegurar la iniciación de la traducción eficiente, una secuencia de reconocimiento al terminal 5 ' de la enzima de restricción *NdeI* se coloca al inicio de la traducción ATGcodon. También para facilitar la clonación, y para asegurar la adecuada traducción en la terminación, las bases que codifican a dos traducciones TAA paran a los codones y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *XhoI* se incluyeron en el extremo 3' de la región codificante. Síntesis de un fragmento de ADN que contiene SEQ ID NO: 4 fue efectuado por el proveedor comercial, GeneArt™.

[00200] Estrategias similares a la optimización del codón *E. coli* fueron usados para diseñar *dgt-1 v5, dgt-1 v6* (G112A), *dgt-1 v7* (G112A; P117S), *dgt-1 v8* (T113I; P117S), *dgt-3 v6* (G105A), *dgt-3 v7* (G105A; P112S), *dgt-3 v8* (T106I; P112S), *dgt-7 v5, dgt-7 v6* (G113A), *dgt-7 v7* (G113A; P117S), *dgt-7 v8* (T114I; P117S), *dgt-32 v5*, y *dgt-33 v5*. Las secuencias de las versiones *dgt-1*, *dgt-3*, y *dgt-7* fueron modificadas por la extracción de la secuencia de dirección al cloroplasto. La versión del codón-*E. coli* optimizado de estos genes son listados como SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, y SEQ ID NO:24, respectivamente.

Ejemplo 3: Vectores para la Expresión Bacteriana de Genes de Tolerancia a Glifosato

[00201] Construcción del Vector de la Expresion pET, *dgt-28* para la Expresion *E. coli* Para pruebas in vitro, la secuencia del gene optimizado *dgt*-28 *v1 E.coli* (SEQ ID NO:4) fue sintetizado y clonado por GeneArt™. La secuencia de genes sintetizada *dgt*-28 *v1* fue clonada al

vector de la expresión pET28 *vía* la adición de sitios de restricciones de *Nde I* y *Xho I*. La construcción resultante presentó una N-terminal 6X His y se marcó como pDAB100445. **FIG. 14.**

[00202] Mutagénesis dirigida al sitio de la *dgt*-28 *v1*. Mutagénesis dirigida al sitio se llevó a cabo en *dgt*-28 *v1* para evaluar el papel de la alanina en la posición 84 en la prestación de tolerancia al glifosato. Esta alanina natural fue mutada a glicina para determinar si el cambio reduciría la tolerancia de la enzima a glifosato o afinidad por el PEP. Este residuo de aminoácido fue seleccionado, ya que corresponde con la mutación G96A que se introdujo en la síntesis EPSP de *E. coli* como se ha descrito previamente.

[00203] El kit Quick Change II™ de Stratagene™ (Santa Clara, CA) fue usado para efectuar la mutagénesis. Las reacciones PCR fueron establecidas de acuerdo al protocolo QuickChange™ usando pDAB100445 (*dgt*-28 *v1*) como ADN modelo. La construcción que contiene la secuencia del gen mutado *dgt*-28 *v2* fue designado pDAB102946 (**FIG. 15**) y confirmado *vía* secuenciación de ADN. Los siguientes cebadores se diseñaron para hacer el cambio de aminoácidos:

[00204] Una segunda ronda de mutagénesis se llevó a cabo en *dgt*-28 *v2* en un intento de reducir aún más su tolerancia al glifosato. Una segunda mutación T172A, fue presentado a la ya mutagenizada *dgt*-28 *v2*. La alanina recíproca a la mutación de treonina de la EPSP sintetiza en esta posición, se ha descrito anteriormente en Haghani *et al.*, (2008), que dio lugar a la insensibilidad a glifosato. El resultado final fue la producción de un A84G doble, T172A mutante que fue designado como *dgt*-28 *v3*. Las reacciones PCR fueron establecidas de acuerdo al protocolo QuickChange™ usando pDAB100445 (*dgt*-28 *v2*) como ADN modelo. La construcción que contiene la secuencia del gen mutado *dgt*-28 *v3* fue designado pDAB100469 (**FIG. 16**). Los siguientes cebadores fueron usados para producir la mutación T172A:

[00205] Construcciones Adicionales, Vector de Expresión pET para la Expresión de *E. Coli*. Para pruebas *in vitro*, las secuencias de genes *dgt-1 v5, dgt-1 v6, dgt-1 v7, dgt-1 v8, dgt-3 v6, dgt-3 v7, dgt-3 v8, dgt-7 v5, dgt-7 v6, dgt-7 v7, dgt-7 v8, dgt-32 v5, and dgt-33 v5* fueron sintetizadas y clonadas (GeneArt™). Los genes sintetizados fueron clonados en el vector de expresión pET28. Las construcciones resultantes fueron etiquetadas como pDAB102028 (**FIG. 17**) que contiene *dgt-1 v5*, pDAB102029 (**FIG. 18**) que contiene *dgt-1 v6*, pDAB102032 (**FIG. 19**) que contiene *dgt-1 v7*, pDAB102034 (**FIG. 20**) que contiene *dgt-1 v8*, pDAB100429 (**FIG. 21**) que

contiene *dgt-3 v6*, pDAB100442 (**FIG. 22**) que contiene *dgt-3 v7*, pDAB100430 (**FIG. 23**) que contiene *dgt-3 v8*, pDAB102036 (**FIG. 24**) que contiene *dgt-7 v5*, pDAB102038 (**FIG. 25**) que contiene *dgt-7 v6*, pDAB102040 (**FIG. 26**) que contiene *dgt-7 v7*, y pDAB102042 (**FIG. 27**) que contiene *dgt-7 v8*.

[00206]

[00207] Clonación de DG-32, y DGT-33. Para pruebas *in vitro*, los siguientes genes de optimización a plantas; *dgt-32 v3*, y *dgt-33 v3* fueron amplificados fuera de los vectores binarios pDAB107532 (**FIG. 11**) y pDAB107534 (**FIG. 12**), respectivamente. Los siguientes grupos cebadores fueron usados:

pMALDGT32R (SEQ ID NO:30; GATATCCTATTATTAACGACCTTCCAG) para *dgt*-32, y pMALDGT33F (SEQ ID NO:31; CATATGGGTGCAGTTACCGTTATTGA),

[00208] Entonces, secuencias amplificadas fueron subclonadas al pMAL-c5X para que cada gene fuese una fusión dentro del marco con la secuencia codificada *malE*. Las expresiones finales construidas fueron pDAB107713 (**FIG. 29**) que contenían *dgt-32 v3*, y pDAB107714 (**FIG. 30**) que contenían *dgt-33 v3*.

Ejemplo 4: Ensayo Cinético In-Vitro Bioquímico Enzimático

[00209] La Sobreexpresión Y Purificación De Enzimas Recombinantes DGT. Las proteínas recombinantes DGT fueron sobreexpuestas en células Rosetta2™ (DE3) (Novagen™, Madison, WI) a partir de las construcciones descritas anteriormente. Una única colonia fue usada para inocular 50 mL culturas iniciales de LB, conteniendo cloranfenicol (25 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL), las cuales fueron cultivadas durante la noche a una temperatura de 37°C. Las culturas nocturnas fueron usadas para inocular 1L de LB conteniendo cloranfenicol (25 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL). Las culturas fueron cultivadas a una temperatura de 37 °C para un O.D.$_{600}$ = 0.6 y entonces ubicadas en agua helada por 10 minutos. La expresión de las proteínas objetivas fue lograda por medio de la adición de IPTG a una concentración final de 500 µM.

[00210] La inducción fue permitida para continuar durante la noche a una temperatura de 20°C, seguida por la cosecha *vía* centrifugación a 8,000 rpm durante 20 minutos. Los sedimentos celulares se almacenaron a -80 °C hasta que sea necesario para la purificación. Todos los pasos de purificación fueron llevados a cabo a una temperatura de 4 C. Los sedimentos celulares de culturas de 1L fueron resuspendidos en el Buffer A de 20-30mL (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 2

mM DTT, 1 mM EDTA, 20 mM imidazol, y 5% glicerol). El cocktail inhibidor de la proteasa COMPLETE™ (1 tableta/50 mL, Roche, Indianapolis, IN) y lisozima (1 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) fueron adicionados y la suspensión fue mezclada por 20 minutos. La lisis celular se realizó con un Branson™ Sonifier™ 250 (3 x 60 segundos) seguida por la eliminación de los restos celulares por centrifugación a 16,000 rpm durante 45 minutos.

[00211] Enzimas DGT se purificaron hasta homogeneidad en un solo paso a través de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) utilizando una columna cruda HisTrap 5 ml FF. La columna fue equilibrada en el Buffer A y la muestra fue cargada en el mismo buffer. La columna entonces fue lavada con una columna de 10 volúmenes del Buffer A, seguida por la evolución en un Buffer B a 0-100 % (50 mM HEPES pH 7.5, 200 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 500 mM imidazol, y 5% glicerol) de gradiente linear sobre 25 volúmenes de columna. Las fracciones conteniendo las proteínas objetivas, así como juzgadas por el análisis SDS-PAGE, fueron concentradas a 2.5mL usando un dispositivo Millipore de ulracentrifugación equipado con un 10 kDA de peso molecular de corte (MWCO). Las enzimas DGT purificadas fueron intercambiadas en el buffer usando columnas PD-10 (GE Healthcare) a 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM DTT, y 5% glicerol y subsecuentemente concentradas ~1 mL. Las amuestras fueron típicamente diluidas 1:50 y el espectro UV-visible fue registrado a partir de 240-700 en un espectrofotómetro Cary50™ Bio UV-visible. Un coeficiente de extinción teórico se utilizó a continuación para calcular la concentración de proteínas basada en la absorbancia a 280 nm (ExPASy, Geneva, Suiza).

[00212] Expresión y Purificación de Recombinantes DGT-32 y Fusiones DGT-33. Las enzimas DGT-32 y DGT-33 fueron construidas para contener la fusión de maltosa localizada en el término del aminoácido de la enzima. Células *Escherichia coli* transformadas con pDAB107712 (Fig. 28), pDAB107713, y pDAB107714 fueron aisladas y confirmadas. Una sola colonia de cada cepa bacteriana se utilizó para inocular 50 ml de LB conteniendo 100 µg/µL de carbenicilina y 25 µg/µL de cloranfenicol. El cultivo iniciador se cultivó durante la noche a 37 ° C y posteriormente, se utilizó para inocular 600 ml de LB suplementado con 0,2% de glucosa, 100 µg/µL de carbenicilina, y 25µg/µL de cloranfenicol. Las culturas fueron cultivadas a 37°C a un OD_{600} = 0.4 y en ese momento, IPTG fue agregado a la concentración final de 50 µM IPTG. Las culturas fueron inducidas por 15 horas a 18°C. Al día siguiente las culturas fueron cosechadas por medio de la centrifugación a 8,000 rpm por 20 minutos para sedimentar las células. La pasta celular se almaceno a -80°C hasta que sea necesaria la purificación.

[00213] Gránulos congelados se resuspendieron en 20-30 ml del Buffer A (50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol, y 1 mM DTT) y 1 tableta de inhibidor de la proteasa (Roche Complete). Una vez que el sedimento se resolubilizó completamente a 1 mg/ml de lisozima fue agregado y la muestra se mezcló a 4 ºC durante 15-20 minutos. Después de la incubación con la lisozima de la muestra se transfirió a un tubo de centrífuga de 50 ml y se colocó en hielo. La muestra fue entonces sometida a ultrasonidos por intervalos de 1 minuto, seguidos por 4 minutos de refrigeración. Este paso fue repetido dos o más veces, llegando a un total de tres ciclos de ultrasonidos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 16,500 rpm durante 45 minutos y el sobrenadante se cargó en un circuito de inyección de 50 ml. El lisado bruto fue aplicado a una columna de amilosa, la cual fue lavada por 7 volúmenes de columna con buffer A, y se eluyó en 100% buffer B (Buffer A y 10 mM de maltosa). La proteína objetivo fue reunida y se concentrada a 2,5 mL usando un centricón 30 kDa MWCO. La proteína purificada fue el buffer intercambiado a 50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, y 5% glicerol usando una columna de gel de filtración PD-10. Las concentraciones de la proteína fueron determinadas *vía* el ensayo Bradford usando BSA como predefinición. La proteína pura fue congelada en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C.

[00214] Caracterización Cinética In Vitro De La Planta Y Las Enzimas Bacterianas DGT. Las actividades enzimáticas de dgts de tipo salvaje (WT) y mutantes DGTs fueron medidos por la producción de fosfato inorgánico (P_i) en un procedimiento modificado descrito por Lanzetta *et al*. (1979) Anal. Bioch. 100:95-7. Ensayos fueron llevados a cabo en 96-well plate format con un total de 50, en un lector de placas Spectra-Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Ensayos típicos contenían 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM DTT, y 1 mM S3P. Concentraciones de PEP y glifosato fueron variadas como indicadas. Glifosato fue obtenido de Sigma como el ácido libre y fue resuspendido en ddH_2O. Glifosato fue solubilizado por la adición de KOH hasta que la mezcla llego a un pH neutro. Ensayos fueron iniciados por la adición de la enzima DGT en concentraciones que variaban entre 0.01-1 µM. Las reacciones fueron finalizadas por la adición de 235 µL de una mezcla 3:1 de verde malaquita: solución de molibdato de amonio. Después del desarrollo completo del color (~1 minuto), el cambio de la absorción en 660nm fue registrado y el valor de P_i formado fue calculado desde una curva predefinida. Las reacciones controladas que no tenían enzimas fueron usadas para corregir absorbancia de fondo. Altas concentraciones de PEP (>2 mM) y glifosato (>30 mM) contribuyeron un valor importante de absorbancia de fondo usando este

método de detección. La información digitada a la ecuación Michaelis-Meten, la cual permitió la determinación de K_m y V_{max} (Ecuación 3) mientras que el IC_{50} fue determinado en la Ecuación 4, donde *y* es la actividad relativa y *s* es el coeficiente Hill. La información fue analizada usando el software GraFit™ versión 5 (Erithacus Software Limited, Horley, U.K.).

$$v = \frac{V_{\max}.[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{\mathrm{IC}_{50}}\right)^s} \quad (4)$$

[00215] El valor IC_{50} para un inhibidor competitivo cambiara dependiendo de la concentración del substrato, por la tanto los valores de IC_{50} en la **Tabla 2** fueron obtenidos en 1mM PEP y en 60 µM PEP (una estimativa de las concentraciones del PEP intracelular en plantas). Únicamente los valores IC_{50} medidos en la misma concentración de PEP deben ser comparados (determinaciones K_m para DGT-32 y DGT-33 fueron determinadas en 100 µM PEP). Adicionalmente, los valores IC_{50} altamente tolerantes a enzimas no pudieron ser determinados correctamente por el método Lanzetta y por lo tanto, fueron estimados tomando en base la actividad relativa.

[00216] Cinética de las Plantas DGTs. Dos enzimas con secuencias nativas no-mutables, DGT-1 v5 y DGT-7 v5, fueron probadas primeramente para establecer los parámetros base para la sensibilidad del glifosato. Ambas proteínas mostraron un bajo valor K_m para PEP (~70 µM) y estaban sensibles al glifosato con valores IC_{50} de ~20 µM (**Tabla 2**) en 1 mM PEP. Como fue observado para DGT-1 v6, DGT-3 v6 y DGT-7 v6, un único punto de mutación de G a A mejoró significativamente la tolerancia al glifosato (valores IC_{50} de 8-21 mM) pero también aumentaron el K_m por PEP ~8-veces. La mutación doble (GAPS), para todos los DGT derivados de plantas (DGT-1 v7, DGT-3 v7, y DGT-7 v7), también mejoraron la tolerancia al glifosato pero una vez más resulto en un considerable aumento en el PEP K_m. **Tabla 2.** Los TIPS mutantes (DGT-1 v8, y DGT-7 v8) fueron tolerantes a concentraciones modestas de glifosato (3-6 mM) pero en contraste al GA y GAPS mutantes, los niveles de K_m permanecieron cerca del tipo-salvaje de proteínas entre 60-200 µM. **FIG. 31** demuestra los cambios en la tolerancia de glifosato para DGT-1 (A) y DGT-7 (B) sobre la introducción de las mutaciones especificadas. La concentración PEP fue mantenida a 1mM

para los experimentos resultando en la información exhibida in **FIG. 31,** que probablemente condujo al elevado IC_{50} (>80mM) para DGT-7 v8. Más procedimientos fueron llevados a cabo para determinar si los niveles más bajos de PEP alteraron la tolerancia relativa al glifosato. Los niveles fisiológicos relevantes del PEP varían entre 5-60 µM. Con 60µM PEP, el valor IC disminuyo significativamente (3.6mM) sugiriendo que la determinación inicial fue influenciada por el exceso de PEP, como era esperado de la cinética Michaelis-Meten e indicado en el **Cuadro 2.**

[00217] FIG. 31 exhibe los valores obtenidos después de la introducción de varias mutaciones dentro del DGT-1 (A) y DGT-7 (B) usando 1 mM PEP. Para ambos, A y B, la curva del IC_{50} con triángulos cerrados representan el tipo-salvaje, círculos cerrados representan GA mutantes, cuadrados abiertos representan GAPS mutantes y cuadrados cerrados representan TIPS mutantes.

[00218] Cuadro 2. Estado estacionario, parámetros cinéticos de las enzimas DGT. Los valores de IC_{50} mayor que 50 son estimaciones debido a las limitaciones del método utilizado. *IC_{50} para glifosato fue determinado en 100 µM PEP.

IC_{50} (mM Glifosato)							
		Proteína	Versión de la Secuencia	IC_{50} en 1 mM PEP	IC_{50} en 60 µM PEP	K_M^{PEP} (µM)	K_{cat} / K_m (M^{-1} s^{-1})
Enzimas de Plantas	Soja	DGT-1 v5	Nativo	0,0	0,0	73,0	7.41E+04
		DGT-1 v6	GA	21,1	17,3	608,2	1.34E+04
		DGT-1 v7	GA PS	>80.0	>80.0	1291,2	6.67E+03
		DGT-1 v8	TI PS	13,3	5,9	151,4	1.23E+04
	Canola	DGT-3 v6	GA	15,8	8,7	1073,4	1.39E+04
		DGT-3 v7	GA PS	>50.0	42,0	2728,3	2.28E+03
		DGT-3 v8	TI PS	13,3	4,8	196,8	3.29E+04
	Trigo	DGT-7 v5	Nativo	0,0	0,0	75,6	2.15E+05
		DGT-7 v6	GA	8,1	15,1	538,2	1.61E+04
		DGT-7 v7	GA PS	19,7	15,4	1103,2	1.46E+04
		DGT-7 v8	TIPS	>80.0	3,6	60,5	1.36E+04
Enzimas Bacterianas		DGT-28v1	Nativo	>80.0	>80.0	91,6	1.32E+05

	DGT-28 v2	AG	>50.0	2,2	161,5	6.86E+04
	DGT-28 v3	AGTA	>50.0	5,2	27,3	6.01E+02
	DGT-32	Nativo	--	>50.0*	139,8	1.30E+03
	DGT-33	Nativo	--	>50.0*	114,2	2.40E+03

[00219] La Cinética Bacteriana de DGTs. De las enzimas bacterianas, el DGT-28 v1 posee los parámetros cinéticos generales más favorables (IC_{50} Elevado y los valores k_{cat}/Km). La enzima fue tolerante a glifosato en concentraciones >80 mM y exhibió una eficiencia catalítica de 1.32 x 10^5 M^{-1} s^{-1}. La mutación A→G en DGT-28 v2 disminuyó el IC_{50} a 2.17 mM (en 60 µM PEP) y causó una leve elevación en el K_m para PEP (161 µM). Esta enzima mutante sostiene la alta eficiencia catalítica en DGT-28 v1. Aún con un IC_{50} reducido, esta enzima mutante es adecuada para proveer una tolerancia al glifosato *in planta* en ciertas aplicaciones. La información sugiere que en esta nueva clase de síntesis EPSP, la alanina no es la única determinante para la tolerancia al glifosato. Para explorar otros determinantes posibles una variante adicional fue construida, DGT-28 v3 (A84G T172A doble mutante). Esta enzima exhibió una tolerancia reducida al glifosato con un valor IC_{50} de 5.15 mM (en 60 µM PEP). La reducción en IC_{50} por DGT-28 v3 fue acompañada por un aumento de eficiencia catalítica de 200 veces, sugiriendo que la segunda mutación llevo efectos no intencionados (**Cuadro 2**). La mayor identidad de DGT-28 v1 homologa (~75 % identidad amino ácida), DGT-32 y DGT-33, tienen un bajo K_m's para PEP (~114 - 139 µM), pero la eficiencia catalítica fue 100 menor a la DGT-28 v1. Esta caída en eficiencia catalítica es probablemente derivada de la fusión de la proteína de unión con la maltosa. Las enzimas también son insensible al glifosato mostrando valores de IC_{50} mayores a 50 mM. Como resultado de estos ensayos *in vitro*, que indicaron varias enzimas DGT que proporcionaron la tolerancia al glifosato, las enzimas DGT fueron probadas *in planta*.

Ejemplo 5: Clonación de vectores de transformación de plantas

[00220] Vector de Construcción de planta binaria. Se utilizaron métodos de clonación estándar en la construcción de vectores de entrada que contienen una secuencia de polinucleótido péptido de tránsito cloroplástico unido a dgt-28 como estructura de fusión. Los vectores de entrada que contiene un péptido de tránsito (TRAP) fusionados a dgt-28 fueron ensamblados utilizando la

IN-FUSION™ Advantage (Clontech, Mountain View, CA). Como resultado de la fusión, el primer aminoácido, metionina, se eliminó de dgt-28. Péptidos de tránsito TraP4 v2 (SEQ ID NO:33), TraP5 v2 (SEQ ID NO:34), TraP8 v2 (SEQ ID NO:35), TraP9 v2 (SEQ ID NO:36), TraP12 v2 (SEQ ID NO:37), y TraP13 v2 (SEQ ID NO:38) fueron sintetizados cada uno por DNA2.0 (Menlo Park, CA) y fusionados a fragmento finales de 5 'de *dgt-28*, hasta e incluyendo un único emplazamiento de reconocimiento de endonucleasa de restricción de *AccI*.

[00221] Plásmidos binarios que contenían varias Trap y casetes de expresión de dgt-28 fueron impulsados por el promotor de ubiquitina 10 de Arabidopsis thaliana (AtUbi10 v2; Callis, et al, (1990) J. Biol. *Chem.*, 265: 12486-12493) y flanqueados por los Agrobacterium tumefaciens abren una región no traducida de estructura de lectura de veintitrés 3' (AtuORF23 3' UTR v1; U.S. Pat. No. 5,428,147).

[00222] La Trap montada y las casetes de expresión de dgt-28 fueron diseñadas utilizando GATEWAY® Technology (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformaron en plantas a través de la transformación de plantas mediante Agrobacterium. Las endonucleasas de restricción se obtuvieron del New England Biolabs (laboratorio de biología de Nueva Inglaterra (NEB; Ipswich, MA) y se utilizó ligasa de ADN T4 (Invitrogen) para la ligadura de ADN. Reacciones de entrada se realizaron utilizando GATEWAY® LR CLONASE® enzyme mix (Invitrogen) para el montaje de un vector de entrada en un único vector de destino, que contenía el seleccionable promotor del mosaico vírico de la mandioca del casete marcador (CsVMV v2;. Verdaguer et al, (1996) Plant Mol. *Biol.*, 31: 1129-1139) – *DSM-2* (U.S. Pat. Appx. 124862007) - Agrobacterium tumefaciens abren una región no traducida de estructura de lectura de 3' (AtuORF1 3' UTR v6; Huang *et al.*, (1990) *J. Bacteriol.* 172:1814-1822). Preparaciones de plásmidos se realizaron utilizando NUCLEOSPIN® Plasmid Kit (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA) o el Midi Kit plásmido (Qiagen) siguiendo las instrucciones de los proveedores. Los fragmentos de ADN fueron aislados utilizando QIAquick ™ Kit de Gel de Extraction (Qiagen) después de la electroforesis de gel de agarosa de tris-acetato.

[00223] Colonias de todos los plásmidos montados fueron examinados inicialmente por digestión de restricción de ADN miniprep. El ADN plasmídico de los clones seleccionados se secuenciaron por un proveedor comercial de secuenciación (MWG Eurofins ™ Operon, Huntsville, AL). Los datos de secuencia fueron reunidos y analizados mediante el SOFTWARE SEQUENCHER™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

[00224] Las construcciones binarias siguientes expresan las diversas TraP: secuencias de genes de fusión dgt-28: pDAB107527 (**FIGURA 3**) contiene TraP4 v2:*dgt-28 v5* (SEQ ID NO:79); pDAB105530 (**FIGURA 4***)* contiene TraP5 v2: *dgt-28 v5* (SEQ ID NO:80); pDAB105531 (**FIGURA 5**) contiene TraP8 v2: *dgt-28 v5* (SEQ ID NO:81); PDAB105532 (**FIGURA 6**) contiene TraP9 v2: *dgt-28 v5* (SEQ ID NO:82)*;* pDAB105533 (**FIGURA 7**) contiene TraP12 v2: *dgt-28 v5* (SEQ ID NO:83); y pDAB105534 (**FIGURA 8**) contiene TraP13 v*2*:*dgt-28 v5* (SEQ ID NO:84). La secuencia dgt-28 v5 de pDAB105534 fue modificada en el que el primer codón (GCA) se cambió a (GCT).

[00225] Adicional Vector de Construcción de planta binaria Estrategias de clonación similares a las descritas anteriormente se utilizaron para construir los plásmidos binarios que contienen *dgt-31*, *dgt*-32, *dgt*-33, *dgt*-1, *dgt*-3 y *dgt-7*.

[00226] Los genes derivado de microbios; dgt-3, dgt-32, y dgt-33, se fusionaron con diferentes péptido de tránsito del cloroplasto que el descrito anteriormente. Los péptidos de tránsito de cloroplasto siguientes se utilizaron; TraP14 v2 (SEQ ID NO:39), TraP23 v2 (SEQ ID NO:40), TraP24 v2 (SEQ ID NO:41). pDAB107532 (**FIGURA 11**) contiene *dgt-32 v3* fusionado a TraP14 v2 (SEQ ID NO:42), pDAB107534 (**FIGURA 12**) contiene *dgt-33 v3* fusionado a TraP24 v2 (SEQ ID NO:43), y pDAB1017533 (**FIGURA 54)** contiene *dgt-33 vl* fusionado a TraP23 v2 (SEQ ID NO:143). Los casetes de expresión de dgt fueron impulsados por el promotor de *ubiquitina 10 de Arabidopsis thaliana* (promotor AtUbi10 v2) y flanqueados por los *Agrobacterium tumefaciens* abren una región no traducida de estructura de lectura de veinte y tres 3' (AtuORF23 3’ UTR v1). Un casete de marcador seleccionable de DSM-2 que contiene promotor mosaico vírico de la mandioca (CsVMV v2) – *DSM-2* – Agrobacterium tumefaciens abren una región no traducida de estructura de lectura de 3' (AtuORF1 3’ UTR v6) también estaba presente en el vector binario.

[00227] Binarios adicionales se construyen en el que dgt-31 v3, dgt-32 v3, y DGT-33 v3se fusionan con las anteriormente descritas secuencias de péptido de tránsito cloroplasto. Por ejemplo, la secuencia de TRAP8 v2 se fusiona a dgt-31 v3, dgt-32 v3, y dgt-33, y se clonan en vectores binarios como los descritos anteriormente.

[00228] Los vectores binarios que contienen los genes de clase I (*dgt-1, dgt-3, y dgt-7*) fueron construidos. Los vectores binarios siguientes expresan las diversas TraP: secuencias de genes de fusión dgt-28: pDAB4104 (**FIGURA 9**),que contiene la secuencia dgt-1 v4 como se describe en la publicación N º 2011/0124503 de Solicitud de patente de EE.UU., que está

flanqueada por las secuencias de Nicotiana *tabacum* osmotina como se describe en la publicación N º 2009/0064376 de Solicitud de patente de EE.UU.; pDAB102715 (**FIG.** 10); pDAB102716 (**FIGURA** 45); pDAB102717 (**FIGURA** 46); y pDAB102785 (**FIGURA** 13). Los diversos péptidos de tránsito de cloroplasto de Trap que se fusionaron a dgt-28, dgt-31, dgt-32 y dgt-33 no se han añadido a los genes de clase I, ya que estas secuencias derivadas de plantas poseen péptidos tránsito del cloroplasto de plantas nativas. Estos vectores se describen con más detalle en la Tabla 3.

[00229] **Tabla 3**. Descripción de los vectores binarios que contienen un gen clase I de sintasa de EPSP (es decir, dgt-1, dgt-3, o dgt-7).

Nombre	**Descripción**	**Mutación EPSPS**
pDAB4104	RB7 MAR v2 :: CsVMV promotor v2 / NtOsm 5' UTR v2 / *dgt*-1 v4 / NtOsm 3' UTR v2 / AtuORF24 3' UTR v2 :: AtUbi10 promotor v4 / *pat* v3 / vector binario AtuORF1 3'UTR v3	TI PS
pDAB102715	AtUbi10 promotor v2 / *dgt*-3 v2/ AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV promotor v2 / *pat* v9 / vector binario AtuORF1 3'UTR v6	GA
pDAB102716	AtUbi10 promotor v2 / *dgt*-3 v3 / AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV promotor v2 / *pat* v9 / vector binario AtuORF1 3'UTR v6	GA PS
pDAB102717	AtUbi10 promotor v2 / *dgt*-3 v4 / AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV promotor v2 / *pat* v9 / vector binario AtuORF1 3'UTR v6	TI PS
pDAB102785	AtUbi10 promotor v2 / *dgt*-7 v4 / AtuORF23 3'UTR :: CsVMV promotor v2 /*DSM-2* v2 / vector binario AtuORF1 3'UTR v6	TI PS

Ejemplo 6: Transformación en *Arabidopsis* y Selección

[00230] Transformación <u>*Arabidopsis thaliana*</u>. *Arabidopsis* se transformó utilizando el método de inmersión floral de Clough y Bent (1998). Una colonia de Agrobacterium seleccionada que contiene uno de los plásmidos binarios descritos anteriormente se utilizó para inocular uno o más pre-cultivos de caldo YEP de 100 ml que contiene espectinomicina (100 mg /L) y kanamicina (50 mg / L). El cultivo se incubó durante la noche a 28 ° C con agitación constante a 225 rpm. Las células se sedimentaron a aproximadamente 5000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante resultante. El sedimento celular se resuspendió suavemente en un medio de 400 ml de Dunking que contiene: 5% (w/v) sacarosa, 10 µg/L 6-benzylaminopurine, y 0.04% Silwet™ L-77. Plantas aproximadamente de 1 mes de edad se sumergieron en el medio durante 5-10 minutos con agitación suave. Las plantas fueron colocadas de lado y cubiertas con bolsas de

plástico transparentes u opacas durante 2-3 horas, y luego se coloca en posición vertical. Las plantas se cultivaron a 22 ° C, con luz durante 16-horas / 8-horas a oscuro. Aproximadamente 4 semanas después de la inmersión, las semillas se cosecharon.

[00231] Selección de plantas transformadas. Semillas recién cosechadas T_1 [que contiene dgt y casetes de expresión *DSM-2*] se dejaron secar durante 7 días a temperatura ambiente. Semillas T1 se sembraron en bandejas de germinación de 26,5 x 51-cm , recibiendo cada uno una parte alícuota de 200 mg de semillas T1 estratificadas (~10.000 semillas) que había sido previamente suspendida en 40 ml de solución al 0,1% de agarosa y se almacenó a 4 ° C durante 2 días para completar los requisitos de latencia y garantizar la germinación sincronizada de las semillas.

[00232] Sunshine Mix LP5 estaba cubierto con vermiculita fina y sub-irrigación con solución de Hoagland hasta su humidificación, después ocurrió el drenaje por gravedad. Cada parte alícuota de 40 ml de semilla estratificada se sembró uniformemente sobre la vermiculita con una pipeta y se cubrió con cubiertas de humidificación durante 4-5 días. Las cubiertas se eliminaron 1 día antes de la selección inicial transformante utilizando una pulverización de post-emergencia glufosinato (seleccionar para el DSM-2 gen co-transformado).

[00233] Siete días después de la siembra (DAP) y de nuevo 11 DAP, plantas T1 (cotiledón y etapa 2-4-LF, respectivamente) se pulverizaron con una solución de 0,2% de herbicida Liberty (200 g ai / L glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) en un volumen de pulverización de 10 ml / bandeja (703 L / ha) utilizando una boquita de pulverización DeVilbiss de aire comprimido para proporcionar una tasa efectiva de 280 g de glufosinato ai / ha por aplicación. Las sobrevivientes (plantas en crecimiento activo) se identificaron 4-7 días después de la pulverización final y se trasplantaron individualmente en potes de 3 pulgadas preparados por medio de macetas (Metro Mix 360). La plantas trasplantadas se cultivaron en el invernadero (22 ± 5 ° C, 50 ± 30% HR, 14 h luz: 10 oscuridad, mínimo 500 naturales µE/m2s1 + luz suplementaria). El análisis de confirmación molecular se completó en las plantas T1 supervivientes para confirmar que el gen de tolerancia al glifosato se había integrado de forma estable en el genoma de las plantas.

[00234] Confirmación Molecular . La presencia del *dgt-28* y de los transgenes *DSM-2* sin el genoma de las plantas *Arabidopsis* que fueron transformados con pDAB107527, pDAB105530, pDAB105531, pDAB105532, pDAB105533, o pDAB105534 fue confirmado. La presencia de estas secuencias de polinucleótidos que se confirmó a través de ensayos con sondas de hidrólisis, la

casete de expresión de genes de PCR (también descrito como unidad de transcripción de planta PCR - PTU PCR), análisis de Southern blot y análisis cuantitativos de PCR de transcripción inversa.

[00235] Las plantas T1 de Arabidopsis fueron seleccionados inicialmente mediante un ensayo de sonda de hidrólisis, análoga a TAQMAN ™, para confirmar la presencia de DSM-2 y transgenes DGT-28. Eventos se cribaron a través de PCR de casete de expresión gen para determinar si el casete de expresión de dgt esta completamente integrado en los genomas de las plantas sin reordenamiento. Los datos generados a partir de estos estudios se utilizaron para determinar el número de copias de transgenes e identificar algunos eventos de Arabidopsis para la autofecundación y el avance de la generación T_2. Las avanzadas plantas T_2 de Arabidopsis también fueron examinados a través de ensayos con sondas de hidrólisis para confirmar la presencia y estimar el número de copias de los genes DSM-2 y de dgt dentro del cromosoma de la planta. Finalmente, un ensayo de transferencia Southern blot se usa para confirmar el número de copias estimado en un subconjunto de las plantas T_1 de Arabidopsis.

[00236] Ensayos similares se utilizaron para confirmar la presencia de transgén DGT-1de plantas transformadas con pDAB4101, la presencia del transgén dgt-32 a partir de plantas transformadas con pDAB107532, la presencia del transgén dgt-33 a partir de plantas transformadas con pDAB107534, la presencia de la dgt-3 transgén de plantas transformadas con pDAB102715, la presencia de la dgt-3 transgén de plantas transformadas con pDAB102716, la presencia del transgén dgt-3 de plantas transformadas con pDAB102717, y la presencia del transgén dgt-7 desde plantas transformadas con pDAB102785.

[00237] Prueba de sonda Hydrolysis. Número de copias se determinó en las plantas T_1 y T_2 de Arabidopsis utilizando la prueba de sonda de hidrólisis descrita a continuación. Las plantas con números variables de transgenes se identificaron y se adelantaron para posteriores estudios de tolerancia al glifosato.

[00238] Las muestras de tejido se recogieron en placas de 96 pocillos y se liofilizó durante 2 días. La maceración del tejido se realizó con un pulverizador de tejido KLECO ™ y los granos de tungsteno (Environ Metal Inc., Sweet Home, Oregón). Después de la maceración del tejido, el ADN genómico se aisló con alto rendimiento usando el kit Plant Biosprint ™96 (Qiagen ™, Germantown, MD) según el protocolo sugerido por el fabricante. El ADN genómico se cuantifica mediante KIT DE PRUEBA DE QUANT-IT™ PICO GREEN DNA (Sondas Moleculares, Invitrogen, Carlsbad, CA). ADN genómico fue cuantificado a alrededor de 2 ng / l para la prueba de

sonda de hidrólisis usando un manipulador de líquidos automatizado BIOROBOT3000 ™ (Qiagen, Germantown, MD). Determinación de número de Copia Transgene mediante el ensayo de hidrólisis de la sonda se realizó por PCR en tiempo real utilizando el LightCycler ® 480 sistema (Roche Ciencias Aplicadas, Indianápolis, IN). Los ensayos fueron diseñados para el DSM-2, dgt-28 y el gen de referencia interna, TAFII15 (GenBank ID: NC 003075; Duarte et al., (201) *BMC Evol. Biol.*, 10:61).\

[00239] Para amplificación, LIGHTCYCLER®480 Sondas Master Mix (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) se preparó a una concentración final 1X en un volumen de reacción múltiplex 10 µL que contiene 0.1 µM de cada cebo para DSM-2 y 28-dgt, 0,4 M de cada cebo para TAFII15 y 0.2 µM de cada sonda. **Tabla 4**. Una reacción de dos etapas de amplificación se realizó con una extensión a 60 ° C durante 40 segundos con adquisición de fluorescencia. Todas las muestras fueron realizadas y la media de los valores de ciclo umbral (Ct) se utilizaron para el análisis de cada muestra. El análisis de datos PCR en tiempo real se realizó utilizando el software1,5 liberación LightCycler ™ usando el módulo de quant relativo y se basa en el método ΔΔCt. Para esto, una muestra de ADN genómico a partir de un único calibrador de copia y un control conocido de copia 2 se incluyeron en cada ejecución. Los resultados de número de copias de la pantalla de sonda de hidrólisis se determinaron para las plantas T1 y T2 de Arabidopsis transgénicas.

[00240] **Tabla 4**. Información de cebo y de sonda para el ensayo de sonda de hidrólisis DSM-2, dgt-28 y el gen de referencia interna (TAFII15).

Nombre de cebo	**Secuencia**
DSM2A (SEQ ID NO:44)	5’ AGCCACATCCCAGTAACGA 3’
DSM2S (SEQ ID NO:45)	5’ CCTCCCTCTTTGACGCC 3’
Sonda DSM2 Cy5 (SEQ ID NO:46)	5’ CAGCCCAATGAGGCATCAGC 3’
DGT28F (SEQ ID NO:47)	5’ CTTCAAGGAGATTTGGGATTTGT 3’
DGT28R (SEQ ID NO:48)	5’ GAGGGTCGGCATCGTAT 3’
Sonda UPL154	Cat# 04694406001 (Roche, Indianápolis, IN)
Sonda TAFFY-HEX (SEQ ID NO:49)	5’ AGAGAAGTTTCGACGGATTTCGGGC 3’
TAFII15-F (SEQ ID NO:50)	5’ GAGGATTAGGGTTTCAACGGAG 3’
TAFII15-R (SEQ ID NO:51)	5’ GAGAATTGAGCTGAGACGAGG 3’

[00241] Confirmación de integración de *dgt-28* vía Análisis de Southern Blot. Análisis de Southern blot se utilizó para establecer el patrón de integración del fragmento de hebra-T de ADN insertado e identificar los eventos que contenían DGT-28. Los datos fueron generados para

demostrar la integración y la integridad de las inserciones de transgenes en el genoma de *Arabidopsis*. Los datos de Southern blot se utilizaron para identificar la simple integración de una copia intacta del ADN de la hebra T. El análisis detallado de Southern blot se llevó a cabo usando una sonda amplificada de PCR específica para el casete de expresión del gen dgt-28. La hibridación de la sonda con el ADN genómico que había sido digerido con fragmentos de ADN genómico de enzimas identificadas de restricción especifica, los patrones que se utilizaron para identificar la longitud completa, eventos T1 transgénicas de simples inserción para el avance a la siguiente generación.

[00242] Las muestras de tejido se recogieron en 2 ml de tubos cónicos (Eppendorf ™) y se liofilizó durante 2 días. La maceración del tejido se realizó con un pulverizador de tejido KLECKO ™ y granos de tungsteno. Después de la maceración del tejido, el ADN genómico se aisló utilizando un procedimiento de aislamiento de CTAB. El ADN genómico fue purificado utilizando el kit de Tips genómicos de Qiagen ™. El ADN genómico se cuantifica mediante kit de prueba de Quant-IT™ Pico Green DNA (Sondas Moleculares, Invitrogen, Carlsbad, CA). ADN genómico cuantificado se ajustó a 4 µg para una concentración constante.

[00243] Para cada muestra, 4 µg de ADN genómico se digirió completamente con la enzima de restricción SwaI (New England Biolabs, Beverley, MA) y se incubaron a 25 ° C durante la noche, luego NsiI se añadió a la reacción y se incubaron a 37 ° C durante 6 horas. El ADN digerido se concentró por precipitación con solución de precipitación Quick ™ (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD) según el protocolo sugerido por el fabricante. El ADN genómico se resuspendió luego en 25 µL de agua a 65 ° C durante 1 hora. Muestras resuspendidas se cargaron en un gel de agarosa 0,8% preparado en 1X TAE y sometidas a electroforesis durante la noche a 1,1 V / cm en 1X tampón TAE. El gel fue sometido de forma secuencial a la desnaturalización (0,2 M NaOH / NaCl 0,6 M) durante 30 minutos, y la neutralización (0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) / NaCl 1,5 M) durante 30 minutos.

[00244] La transferencia de fragmentos de ADN a membranas de nylon se llevó a cabo por solución capilaridad pasiva 20 X SSC durante la noche a través del gel sobre IMMOBILON tratada ™ NY + transferencia de la membrana (Millipore, Billerica, MA) mediante el uso de una mecha de papel de cromatografía y toallas de papel. Después de la transferencia, la membrana se lavó brevemente con 2X SSC, reticulado con el Stratalinker ™ 1800 (Stratagene, La Jolla, CA), y el vacío al horno a 80 ° C durante 3 horas.

[00245] Los blots se incubaron con solución de pre-hibridación (Hyb Perfect plus, Sigma, St. Louis, MO) durante 1 hora a 65 ° C en frascos rotatorios de vidrio utilizando un modelo 400 de incubadora hibridación (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA). Las sondas se preparó a partir de un fragmento de PCR que contiene la secuencia codificadora completa. La amplificación de PCR se purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAEX™ II y se marcaron con dCTP-a^{32}P a través del kit Random Prime RT IT ™ (Stratagene, La Jolla, CA). Los blots se hibridaron durante la noche a 65 ° C con sonda desnaturalizada añadió directamente al tampón de hibridación a aproximadamente 2 millones de conteos por transferencia por ml. Después de la hibridación, las transferencias se lavaron secuencialmente a 65 °C con 0.1X SSC / 0.1% SDS durante 40 minutos. Por último, los blots fueron expuestos a pantallas de imágenes de almacenamiento de fósforo y usando sistema de formación de imágenes de Molecular Dynamics Storm 860 ™.

[00246] Los análisis de Southern blot completados en este estudio se utilizaron para determinar el número de copias y confirmar que los eventos seleccionados contenían el transgén dgt-28 dentro del genoma de *Arabidopsis*.

[00247] Confirmación de casete de expresión de dgt-28 vía Análisis de PCR. La presencia de expresión de la casete del gen dgt-28 contenida en los eventos de plantas T1 fue detectada por un punto final de reacción de PCR. Los cebos (Tabla 5) específico para el promotor AtUbi10 v2 y regiones v1 AtuORF23 UTR 3 'del casete de expresión del gen dgt-28 fueron utilizados para la detección.

[00248] **Tabla 5**. Los cebos de oligonucleótidos utilizados para la confirmación de casete de expresión del gen dgt-28.

Nombre de cebo	**Secuencia**
Sonda TAFFY-HEX (SEQ ID NO:52)	5’ CTGCAGGTCAACGGATCAGGATAT 3’
Oligo revertido (SEQ ID NO:53)	5’ TGGGCTGAATTGAAGACATGCTCC 3’

[00249] Las reacciones de PCR se requiere un estándar de protocolo de tres pasos de ciclo de PCR para amplificar el casete de expresión de gen. Todas las reacciones de PCR se realizaron utilizando las siguientes condiciones de PCR: 94 ° C durante tres minutos, seguido por 35 ciclos de 94 ° C durante treinta segundos, 60 ° C durante treinta segundos, y 72 ° C durante tres minutos. Las reacciones se terminaron mediante el kit EX-TAQ ™ PCR (Takara Biotechnology Inc. Otsu, Shiga, Japón) según las instrucciones del fabricante. Después del ciclo final, la reacción se incubó a 72 ° C

durante 10 minutos. La electroforesis de gel TAE de agarosa se utilizó para determinar el tamaño del amplicón de PCR. Amplicones de PCR de un tamaño esperado indicó la presencia de un casete de expresión de longitud completa del gen, estaban presente en el genoma de los eventos de *Arabidopsis* transgénicos.

[00250] Confirmación relativa de la transcripción de dgt-28 a través del análisis de transcripción cuantitativa reversa de PCR. Las muestras de tejido de plantas transgénicas dgt-28 se recogieron en placas de 96 pocillos y se congelaron a 80 ° C. La maceración del tejido se realizó con un pulverizador de tejido KLECO ™ y granos de tungsteno (Environ Metal Inc., Sweet Home, Oregón). Después de la maceración del tejido, el RNA total se aisló en formato de alto rendimiento usando el kit Plant Biosprint ™96 (Qiagen ™, Germantown, MD) según el protocolo sugerido por el fabricante que incluye el tratamiento opcional DNaseI en la columna.. Este paso fue seguido posteriormente por un adicional tratamiento de ADNasa I (Ambion ™, Austin, TX) del total de los eluidos ARN. la síntesis de ADNc se realizó utilizando el total de ARN como molde con el kit de la transcripción inversa de alta capacidad de cDNA ™ (Applied Biosystems, Austin, TX) según la técnica recomendada por el fabricante con la adición del oligonucleótido, TVN. Cuantificación de la expresión se completó mediante el ensayo de hidrólisis de la sonda y se realizó por PCR en tiempo real utilizando el LightCycler ® 480 sistema (Roche Ciencias Aplicadas, Indianápolis, IN). Los ensayos fueron diseñados por el *dgt-28* y el gen de referencia interna, TAFII15 (GenBank ID: AT4G24610) utilizando el Software Probe Design 2.0 LIGHTCYCLER®. Para amplificación, Sondas Master Mix LIGHTCYCLER®480 (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) se preparó a una concentración final 1X en un volumen de reacción múltiplex 10 µL que contiene 0.4 µM de cada cebo y 0.2 µM de cada sonda. **Tabla 6**.

[00251] Tabla 6. Los cebos PCR utilizados para el análisis de la transcripción inversa cuantitativa PCR de *dgt-28.*

Nombre de cebo	**Secuencia**
AT26410LP (SEQ ID NO:54)	5’ CGTCCACAAAGCTGAATGTG 3’
AT26410RP (SEQ ID NO:55)	5’ CGAAGTCATGGAAGCCACTT3′
UPL146	Cat# 04694325001 (Roche, Indianápolis, IN)
DGT28F (SEQ ID NO:56)	5’ CTTCAAGGAGATTTGGGATTTGT3′
DGT28R (SEQ ID NO:57)	5’ GAGGGTCGGCATCGTAT 3’
Sonda UPL154	Cat# 04694406001 (Roche, Indianápolis, IN)

[00252] Se realizó una reacción de amplificación de dos pasos con una extensión de 60 ºC durante 40 segundos con adquisición de fluorescencia. Todas las muestras se realizaron por triplicado y se emplearon los valores medios del ciclo umbral (Ct) para el análisis de cada muestra. Se realizó una reacción de transcripción inversa menos para cada muestra para asegurarse que no se encontraba presente contaminación alguna del gADN. Se realizó un análisis de los datos PCR en tiempo real basándose en el método CTΔΔ. Este ensayo se usó para determinar la expresión relativa de eventos *dgt-28* en *Arabidopsis* transgénica que se determinaron eran hemicigóticos y homocigóticos. Los niveles de transcripción relativos del mARN *dgt-28*variaban desde un plegamento de 2,5 a un plegamento de 207,5 mayor que el control interno. Estos datos indican que las plantas transgénicas *dgt-28* contenían una casete de expresión genética funcional del *dgt-28* y que las plantas eran capaces de transcribir el *transgén* dgt-28.

[00253] Análisis de Western Blot. Se detectó DGT-28 en muestras de hojas obtenidas de plantas *Arabidopsis thaliana* transgénicas. Los extractos de plantas procedentes de plantas transgénicas *dgt-28* y los estándares de proteína DGT-28 se incubaron con una solución tamponada de muestra NUPAGE® LDS (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía DTT a 90 ºC durante 10 minutos y se separó electroforéticamente en un gel prefabricado de acrilamida. Posteriormente las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el protocolo del fabricante. Tras bloquearlo con la mezcla de bloqueo WESTERNBREEZE® (Invitrogen) se detectó la proteína DGT-28 mediante un antisuero anti-DGT-28 seguido por antifosfatasa de cabra anti-conejo. La proteína detectada se visualizó mediante el reactivo de análisis Western BCIP/NBT de sustrato de quimioluminiscencia (KPL, Gaithersburg, MD). La producción de proteína DGT-28 intacta *vía* Western Blot indicaba que las plantas transgénicas *dgt-28* que fueron sometidas al ensayo expresaban la proteína DGT-28.

Ejemplo 7: Tolerancia al glifosato

[00254] Las plantas transgénicas T_1 *Arabidopsis* que contenían el transgén *dgt-28* fueron pulverizadas con diferentes tasas de glifosato. Se aplicaron tasas elevadas en este estudio para determinar los niveles de resistencia relativos (105, 420, 1,680 o 3,360 g ae/ha). Una tasa de uso 1X típica de glifosato que controlará la *Arabidopsis* es 420 g ae/ha. Las formulaciones de glifosato con la incorporación de sulfato de amonio se aplicaron a las plantas con un rociador automático calibrado en 187 L/ha. Las plantas T_1 *Arabidopsis* que se usaron en este estudio presentaban un número de copias variable del transgén *dgt-28.* Las plantas con una copia baja de *dgt-28* T_1

Arabidopsis presentaban autopolinización y se empleaban para producir plantas T_2. **La tabla 7** muestra la comparación de plantas transgénicas *dgt-28,* extraídas de un gen con resistencia a herbicidas con glifosato, *dgt-1*, y controles de plantas naturales. **La tabla 8** muestra la comparación de plantas transgénicas *dgt-32*, y *dgt-33*extraídas de un gen con resistencia a herbicidas con glifosato, *dgt-1*, y controles de plantas naturales. **La tabla 9** muestra la comparación de enzimas sintasa EPSP bacterianas noveles con enzimas sintasa Clase I EPSP y los controles con una tasa de glifosato de 1,680 g ae/ha.

[00255] Resultados de la selección de glifosato de plantas *dgt-28 Arabidopsis* transformadas Se eligieron en primer lugar los transformantes del *Arabidopsis* T_1 a partir de la naturalidad de semillas sin transformar usando un esquema de selección de glifosinato. Se analizaron tres planos o 30.000 semillas de cada elemento T_1. Las plantas T_1 arriba seleccionadas estaban caracterizadas molecularmente y el número de plantas con copias se trasplantó posteriormente a macetas individuales y se pulverizaron con varias tasas de glifosato comercial descrito previamente. La respuesta de estas plantas se presenta en términos de % de lesiones visuales 2 semanas después del tratamiento (WAT). Los datos se presentan en una tabla que muestra las plantas individuales que no presentan lesiones o lesiones pequeñas (<20%), lesiones moderadas (20-40%) o lesiones graves (>40%). Se presenta una media aritmética y una desviación estándar de cada elementos usado para la transformación de *Arabidopsis.* La variedad en la respuesta individual se indica asimismo en la última columna de cada tasa y transformación. La *Arabidopsis* natural, no -transformada (c.v. Columbia) funcionaba como control sensible al glifosato.

[00256] El nivel de respuesta de la planta variaba. Esta variación puede atribuirse al hecho de que cada planta representa un evento de transformación independiente y así el número de copias del gen de interés varía de planta a planta. Se observó que algunas plantas que contenían el transgén no toleraban el glifosato; no se completó un análisis completo para determinar si estas plantas expresaban el transgén. Es probable que la presencia de un número de copias elevado del transgén en las plantas T_1 *Arabidopsis* provocara una silenciación del transgén u otros efectos epigenéticos que provocaron sensibilidad al glifosato, a pesar de la presencia del *transgén* dgt-28.

[00257] Se presenta una media de lesiones de la población general según tasas en la **Tabla 9** para tasas de glifosato de 1,680 g ae/ha para demostrar la notable diferencia entre las plantas transformadas con *dgt-3, dgt-7, dgt-28, dgt-32,* y *dgt-33* frente a los controles *dgt-1* y naturales.

[00258] La tolerancia que ofrece las sintasas bacterianas noveles EPSP variaba dependiendo de las enzima específica. DGT-28, DGT-32, y DGT-33 inesperadamente ofrecieron una notable tolerancia al glifosato. Los genes *dgt* impartían resistencia al herbicida a plantas individuales T_1 *Arabidopsis* en todos los péptidos de tránsito testados. Como tales, el uso de péptidos de tránsito para su importación a cloroplastos adicionales (*esto es*, TraP8 – *dgt-32* o TraP8 – *dgt-33*) ofrecerían protección al glifosato con niveles de lesiones similares a los reportados dentro del tratamiento dado.

[00259] **Tabla 7**. La respuesta del *dgt-28* transformado T_1 *Arabidopsis* a una diversidad de tasas de glifosatos aplicados postemergencia, en comparación con una población de *dgt-1* (T_4) resistente a los homocigotos, y un control no transformado. % de lesiones visuales a 14 días tras la aplicación.

pDAB107527: TraP4 v2 -- *dgt-28 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	4	0	0		3.8	7.5	0-15
420 g ae/ha glifosato	2	1	1		28.8	28.1	0-65
1.680 g ae/ha glifosato	0	2	2		55.0	26.8	35-85
3.360 g ae/ha glifosato	0	2	2		43.8	18.0	30-70
pDAB105530: TraP5 v2 -- *dgt-28 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	6	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	2	2	2		39.3	37.4	8-100
420 g ae/ha glifosato	1	4	1		33.0	26.6	8-85
1.680 g ae/ha glifosato	0	4	2		47.5	27.5	25-85
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	6		76.7	13.7	50-85

pDAB105531: TraP8 v2 -- *dgt-28 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	3	1	0		10.8	10.4	0-25
420 g ae/ha glifosato	3	0	1		22.8	18.6	8-50
1.680 g ae/ha glifosato	4	0	0		5.3	3.8	0-8
3.360 g ae/ha glifosato	0	4	0		29.3	6.8	22-35

pDAB105532: TraP9 v2 -- *dgt-28 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	3	0	1		17.5	28.7	0-60
420 g ae/ha glifosato	1	1	2		39.5	25.1	18-70
1.680 g ae/ha glifosato	3	0	1		26.3	36.1	5-80
3.360 g ae/ha glifosato	3	0	1		25.8	32.9	8-75

pDAB105533: TraP12 v2 -- *dgt-28 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	5	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	4	1	0		10.0	10.0	0-25
420 g ae/ha glifosato	1	1	3		53.6	34.6	8-85
1.680 g ae/ha glifosato	4	1	0		11.0	8.2	0-20
3.360 g ae/ha glifosato	0	2	3		55.0	25.5	25-80

pDAB105534: TraP13 v2 -- *dgt-28 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	5	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	4	0	1		14.0	20.6	0-50
420 g ae/ha glifosato	3	1	1		17.6	19.5	0-50
1.680 g ae/ha glifosato	3	0	2		39.0	47.1	5-100
3.360 g ae/ha glifosato	2	2	1		31.2	22.3	18-70
pDAB4104: *dgt-1* (control transformado)	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	5	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	0	0	4		80.0	0.0	80
420 g ae/ha glifosato	0	0	4		80.0	0.0	80
1.680 g ae/ha glifosato	0	0	4		80.0	0.0	80
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4		81.3	2.5	80-85
WT (control no transformado)	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	5	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	0	0	4		100.0	0.0	100
420 g ae/ha glifosato	0	0	4		100.0	0.0	100
1.680 g ae/ha glifosato	0	0	4		100.0	0.0	100
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4		100.0	0.0	100

[00260] Tabla 8. La respuesta del *dgt-32, y dgt-33* transformado T_{1} Arabidopsis a una diversidad de tasas de glifosatos aplicados postemergencia, en comparación con una población de

$_{dgt\text{-}1}$ (T_4) resistente a los homocigotos, y un control no transformado. % de lesiones visuales a 14 días tras la aplicación.

pDAB105532: TraP14 v2 -- *dgt-32 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20 %	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
420 g ae/ha glifosato	2	0	2		30.0	29.4	0-60
1.680 g ae/ha glifosato	3	0	1		17.5	21.8	5-50
3.360 g ae/ha glifosato	0	3	1		35.0	30.0	20-80
pDAB105534: TraP24 v2 -- *dgt-33 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20 %	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	2	2	0		21.3	14.9	5-40
420 g ae/ha glifosato	1	1	2		46.3	30.9	5-70
1.680 g ae/ha glifosato	1	0	3		62.5	38.8	5-90
3.360 g ae/ha glifosato	1	0	3		62.0	36.0	8-80
pDAB4104: *dgt-1* (control transformado)	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20 %	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	0	2	3		42.5	15.0	20-50
420 g ae/ha glifosato	0	1	2		38.8	11.1	25-50
1.680 g ae/ha glifosato	0	0	4		79.0	19.4	50-90

3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4		50.0	0.0	50
WT (control no transformado)	% de lesiones				% de lesiones		
Medias	<20 %	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha glifosato	0	0	4		85.0	0.0	85
420 g ae/ha glifosato	0	0	4		100.0	0.0	100
1.680 g ae/ha glifosato	0	0	4		100.0	0.0	100
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4		100.0	0.0	100

[00261] Tabla 9. La respuesta del *dgt-28*, *dgt-32*, *dgt-33*, *dgt-3*, y *dgt-7* transformado T*1* *Arabidopsis* al glifosatos aplicados postemergencia a 1,680, en comparación con una población de *dgt-1* (T*4*) resistente a los homocigotos, y un control no transformado. % de lesiones visuales a 14 días tras la aplicación.

			% de lesiones				% de lesiones		
			<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
Enzimas bacterianas	pDAB107527:	TraP4 v2 -- *dgt-28 v5*	0	2	2		55.0	26.8	35-85
	pDAB105530:	TraP5 v2 -- *dgt-28 v5*	0	4	2		47.5	27.5	25-85
	pDAB105531:	TraP8 v2 -- *dgt-28 v5*	4	0	0		5.3	3.8	0-8
	pDAB105532:	TraP9 v2 -- *dgt-28 v5*	3	0	1		26.3	36.1	5-80
	pDAB105533:	TraP12 v2 -- *dgt-28 v5*	4	1	0		11.0	8.2	0-20

	pDAB105534:	TraP13 v2 -- *dgt-28 v5*	3	0	2		39.0	47.1	5-100
	pDAB107532:	TraP14 v2 -- *dgt-32 v5*	3	0	1		17.5	21.8	5-50
	pDAB107534:	TraP24 v2 -- *dgt-33 v3*	1	0	3		62.5	38.8	5-90
Enzimas clase I	pDAB102715:	*dgt-3 v2*	4	0	3		42	48	0-100
	pDAB102716:	*dgt-3 v3*	2	1	0		14	23	0-40
	pDAB102717:	*dgt-3 v4*	3	2	1		28	35	10-100
	pDAB102785:	*dgt-7 v4*	0	1	1		45	21	30-60
	pDAB4104:	*dgt-1* (control transformado)	0	0	4		80.0	0.0	80
	--	WT (control no transformado)	0	0	4		100.0	0.0	100

[00262] *dgt-28* como un marcador seleccionable. El uso de *dgt*-28 como un marcador seleccionable como agente de selección de glifosato se testó con las plantas transformadas *Arabidopsis* descritas arriba. Aproximadamente se mezclaron 50 semillas T de $_4$ generación *Arabidopsis* (homocigotas para *dgt*-28) en aproximadamente 5,000 semillas naturales (sensibles al glifosato). Las semillas se germinaron y las plántulas se pulverizaron con una dosis seleccionada de glifosato. Se compararon varios tratamientos de glifosato; cada bandeja de plantas recibió bien una o dos temporalizaciones de aplicación de glifosato en uno de los siguientes programas de tratamiento: 7 DAP (días tras su plantación), 11 DAP o 7 seguido de 11 DAP. Como todas las plantas asimismo contenían un gen de resistencia al glifosato en el mismo vector de transformación, que contenían las plantas seleccionadas con glifosato *dgt-28* se pudieron comparar directamente con plantas seleccionadas con glufosinato que contenían *DSM-2* o *pat*.

[00263] Los tratamientos con glifosinato se aplican con una punta de pulverizador DeVilbiss™, tal como se ha descrito previamente. Las plantas transgénicas que contienen *dgt-28* se identifican como "resistentes" o "sensibles" a 17 DAP. Los tratamientos de glifosato 26.25-1680 g ae/ha que se aplican 7 y 11 días después de la plantación (DAP) muestras una selección efectiva de

plantas transgénicas *Arabidopsis* que contienen *dgt-28*. Se contaron las plantas sensibles y resistentes y se descubrió que el número de plantas sensibles al glifosato se relacionaba con el número original de semillas transgénicas que contenían el transgén *dgt-28* que se plantó. Estos resultados indican que el *dgt-28* se puede usar de forma efectiva como un marcador seleccionable alternativo para una población de *Arabidopsis* transformadas.

[00264] Heredabilidad. Los eventos de T_1 *Arabidopsis* transgénicos confirmados se autopolinizaron para producir semillas T_2. Se testó a la progenie de estas semillas aplicando el herbicida Ignite™ que contiene glufosinato (200 g ae/ha) en 100 descendientes T_2 aleatorias. Cada planta individual T_2 se transplantó a macetas de 7.5 cm2 antes de la aplicación de la pulverización (pulverizadores a una tasa de aplicación de 187 L/ha). Las familias T_1 (plantas T_2) se separaron en Resistentes 3 anticipadas: 1 modelo sensible para un único locus predominantemente heredado con herencia mendeliana tal y como lo determina el análisis chi cuadrado ($P > 0.05$). El porcentaje de familias T_1 que se separaron con la herencia mendeliana esperada aparece ilustrado en la **Tabla 10**, y demuestra que la característica *dgt-28* se transmite *vía* herencia mendeliana a la generación de T_2. Se recogieron semillas desde 5 a 15 individuos de T_2 (semillas T_3). Veinticinco hermanas de T_3 de cada 3-4 familias de T_2 seleccionadas aleatoriamente se testaron de forma progénica tal y como se ha descrito previamente. Los datos no mostraron ninguna separación y así demostraron que *dgt-28* y *dgt-3* se integran de forma estable con el cromosoma y se heredan de forma mendeliana en al menos tres generaciones.

[00265] Tabla 10. Porcentaje de familias T_1 (plantas T_2) que se separan como herencia simple mendeliana en un test de progenie de 100 plantas.

Gen de interés	**Familias T1 testadas que se separan a 1 locus (%)**
dgt-3 v2	64%
dgt-3 v3	60%
dgt-3 v4	80%
dgt-7 v4	63%
TraP5 v2 -- *dgt*-28 v5	100%
TraP8 v2 -- *dgt*-28 v5	100%
TraP9 v2 -- *dgt*-28 v5	100%
TraP12 v2 -- *dgt*-28 v5	50%

TraP13 v2 -- *dgt*-28 v5	75%
yfp Plantas de control transgénicas	100%

[00266] Datos de T_2 Arabidopsis. Las plantas de segunda generación (T_2) de eventos seleccionados T_2 *Arabidopsis* que contenían unos números bajos de copias del transgén *dgt-28* se caracterizaron más por su tolerancia al glifosato. Se seleccionaron veinticinco plantas por línea con glufosinato, como se ha descrito anteriormente, y líneas de cada constructo probado no se segregaron para el gen marcador seleccionable. El glifosato se aplicó como se describe anteriormente. La respuesta de estas plantas se presenta en términos de % de lesiones visuales 2 semanas después del tratamiento (WAT). Los datos se presentan en una histograma de individuos que no presentan lesiones o lesiones pequeñas (<20%), lesiones moderadas (20-40%) o lesiones graves (>40%). Se presenta una media aritmética y una desviación estándar de cada elemento usado para la transformación de *Arabidopsis.* La variedad en la respuesta individual se indica asimismo en la última columna de cada tasa y transformación. El *Arabidopsis* natural sin-transformar (cv. Columbia) sirvió como un control sensible al glifosato. En la generación T_2 se disponían de plantas hemicigotos y homocigotos para las pruebas en cada evento y por lo tanto, se incluyeron para cada tasa de glifosato ensayada. Las plantas hemicigotas contienen dos alelos diferentes en un solo lugar, en comparación con las plantas homocigóticas que contienen los mismos dos alelos en un lugar. La variabilidad de la respuesta a glifosato se espera en la generación T_2, como resultado de la diferencia en la dosis génica para hemicigotos en comparación con las plantas homocigotas. La variabilidad en la respuesta a glifosato se refleja en la desviación estándar y la amplitud de respuesta.

[00267] En la generación T_2 tanto los eventos de una única copia como los de multicopia de *dgt-28* se caracterizaron por la tolerancia al glifosato. Dentro de un evento, las plantas con una única copia mostraron niveles de tolerancia similares al glifosato. Los datos característicos de los eventos de una única copia de T_2 se presentan en la **Tabla 11**. aquellos eventos que contenían *dgt-28* vinculados con TraP5 v2 no ofrecieron una gran tolerancia al glifosato en comparación con los elementos *dgt-28* que contenían otros péptidos de tránsito TraP. No obstante, los elementos TraP5 *dgt-28* ofrecieron un nivel bajo de tolerancia al glifosato en comparación con el control Columbia sin transformar. Hubo ejemplos en el que se demostró que los eventos que contenían dos o más copias de *dgt-28* era más susceptibles de presentar tasas elevadas de glifosato (los datos no lo

confirman). Este incremento en la sensibilidad al glifosato es similar a los datos descritos previamente en las plantas T_1 que asimismo contenían un alto número de copias del transgén *dgt-28*. Es probable que la presencia de un número de copias elevado del transgén en las plantas *Arabidopsis* provocara una silenciación del transgén u otros efectos epigenéticos que provocaron sensibilidad al glifosato, a pesar de la presencia del transgén dgt-28.

[00268] Estos eventos contenían *dgt-28* vinculado con TraP5 v2 (pDAB105530), TraP12 v2 (pDAB105533) y TraP13 v2 (pDAB105534).

[00269] Además de *dgt-28*, los eventos T_2 *Arabidopsis* transformados con *dgt*-3 se presentan en la **Tabla 12**. Al igual que se describe para los eventos de *dgt-28* en la **Tabla 11**, la tabla de datos contiene un evento representativo que es característico de la respuesta al glifosato de cada elemento. Para la caracterización del *dgt-3* los elementos que contenían una PTU única (unidad de transformación de plantas) con el gen *dgt-3* impulsado por el promotor AtUbi10 (pDAB102716, **FIG. 45** y pDAB102715, **FIG. 10**) se compararon con elementos con el mismo gen que contenían 2 PTU del gen (pDAB102719, **FIG. 32**; pDAB102718, **FIG. 33**). Los elementos que contenían 2 PTU usaban el promotor AtUbi10 para impulsar una copia del gen y el promotor CsVMV para impulsar la otra copia. Se incorporó el uso del PTU doble para comparar las plantas transgénicas con *dgt-3* con las plantas transgénicas con *dgt-28* que contenían dos copias del transgén. Los datos demostraron que los eventos de una única copia de T_2 *dgt-3* con un único PTU era más susceptibles al glifosato que aquellos eventos de una sola copia de *dgt-28* testados, pero eran más tolerantes que los del control sin transformar. Las familias de T_1 que contenían 2 PTU del gen *dgt-3* ofrecieron un mayor nivel de tolerancia visual al glifosato en comparación con los elementos de 1 PTU. En ambos ejemplos, se compararon las familias de T_1 con *dgt*-1 y con controles naturales. Los datos de T_2 demuestran que el *dgt-28* ofrece una gran tolerancia al igual que los eventos de una única copia.

[00270] **Tabla 11** Respuesta de los eventos individuales seleccionados de T_2 *Arabidopsis* que contienen *dgt*-28 al glifosato aplicado postemergencia a tasas variables, en comparación con una población de *dgt*-1 (T_4) resistente al homocigoto, y control sin transformar. % de lesiones visuales a 14 días tras la aplicación.

pDAB105530: TraP5 v2 - *dgt-28 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
1 copia	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)

0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
420 g ae/ha glifosato	0	0	4		75.0	17.8	50-90
840 g ae/ha glifosato	0	0	4		80.0	20.0	50-90
1.680 g ae/ha glifosato	0	0	4		75.0	10.8	60-85
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4		76.3	4.8	70-80
pDAB105531: TraP8 v2 - *dgt-28 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
1 copia	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
420 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.5	1.0	0-2
840 g ae/ha glifosato	4	0	0		1.3	2.5	0-5
1.680 g ae/ha glifosato	4	0	0		7.5	5.0	5-15
3.360 g ae/ha glifosato	4	0	0		7.5	6.5	0-15
pDAB105532: TraP9 v2 - *dgt-28 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
1 copia	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
420 g ae/ha glifosato	4	0	0		2.0	4.0	0-8
840 g ae/ha glifosato	4	0	0		9.0	2.0	8-12
1.680 g ae/ha glifosato	4	0	0		7.3	4.6	2-12
3.360 g ae/ha glifosato	4	0	0		11.0	1.2	10-12
pDAB105533: TraP12 v2 - *dgt-28 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
1 copia	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
420 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
840 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
1.680 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
3.360 g ae/ha glifosato	3	1	0		13.3	7.9	8-25
pDAB105534: TraP13 v2 - *dgt-28 v5*	% de lesiones				% de lesiones		
1 copia	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
420 g ae/ha glifosato	3	1	0		5.0	10.0	0-20
840 g ae/ha glifosato	3	1	0		5.0	10.0	0-20

1.680 g ae/ha glifosato	2	2	0		10.0	11.5	0-20
3.360 g ae/ha glifosato	2	2	0		15.0	12.2	5-30
WT (control no transformado)	% de lesiones				% de lesiones		
	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
420 g ae/ha glifosato	0	0	4		100.0	0.0	100
840 g ae/ha glifosato	0	0	4		100.0	0.0	100
1.680 g ae/ha glifosato	0	0	4		100.0	0.0	100
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4		100.0	0.0	100
pDAB4104: *dgt-1* (control transformado)	% de lesiones				% de lesiones		
1 copia	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0.0	0.0	0
420 g ae/ha glifosato	0	4	0		37.5	2.9	35-40
840 g ae/ha glifosato	0	0	4		45.0	0.0	45
1.680 g ae/ha glifosato	0	0	4		47.5	2.9	45-50
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4		50.0	0.0	50

[00271] Tabla 12. Respuesta de los eventos seleccionados de T_2 *Arabidopsis* transformados con *dgt-3* al glifosato aplicado postemergencia a tasas variables. % de lesiones visuales a 14 días tras la aplicación.

pDAB102716: *dgt-3 v3* (1 PTU)	% de lesiones				% de lesiones		
1 copia segundo	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0	0	0
420 g ae/ha glifosato	1	1	2		39	25	15-65
840 g ae/ha glifosato	0	2	2		50	23	30-70
1.680 g ae/ha glifosato	0	1	3		69	19	40-80
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4		79	6	70-85

pDAB102719: *dgt-3 v3* (2 PTU)	% de lesiones				% de lesiones		
1 copia segundo	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0	0	0
420 g ae/ha glifosato	0	4	0		20	0	20
840 g ae/ha glifosato	0	3	1		38	5	35-45

1.680 g ae/ha glifosato	3	1	0		15	7	10-25
3.360 g ae/ha glifosato	2	2	0		21	8	15-30

pDAB102715: *dgt-3 v2* (1 PTU)	% de lesiones				% de lesiones		
1 copia segundo	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0	0	0
420 g ae/ha glifosato	2	2	0		26	16	10-40
840 g ae/ha glifosato	0	2	2		55	17	40-70
1.680 g ae/ha glifosato	0	2	2		56	22	35-75
3.360 g ae/ha glifosato	0	0	4		65	17	50-80

pDAB102718: *dgt-3 v2* (2 PTU)	% de lesiones				% de lesiones		
1 copia segundo	<20%	20-40%	>40%		Med.	Desv. Est.	Gama (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0		0	0	0
420 g ae/ha glifosato	4	0	0		5	7	0-15
840 g ae/ha glifosato	2	2	0		23	10	15-35
1.680 g ae/ha glifosato	3	0	1		20	20	5-50
3.360 g ae/ha glifosato	1	1	2		36	22	15-60

[00272] Datos de *Arabidopsis* T_3. Las plantas de tercera generación (T_3) de eventos de *Arabidopsis* T_2 seleccionados que contenían un bajo número de copias del transgén *dgt*-28 se caracterizan además por su tolerancia al glifosato. Veinticinco plantas por hilera se seleccionaron con glufosinato, tal y como se ha descrito, y las hileras de cada constructo examinado no se segregaron para el gen marcador seleccionable. Se aplicó glifosato según se describió anteriormente. La respuesta de las plantas se presenta en términos de % de lesión visual 2 semanas después del tratamiento (WAT). Los datos se presentan como un histograma de los individuos que exhiben pocas o ninguna lesión (<20%), lesión moderada (20-40%), o lesión grave (>40%). Se presentan una media aritmética y desviación estándar para cada constructo utilizado para la transformación de *Arabidopsis*. También se indica en la última columna el rango en respuesta individual para cada tasa y transformación. La *Arabidopsis* no-transformada (cv. Columbia) tipo silvestre sirvió como un control sensible al glifosato.

[00273] Tabla 13. Respuesta de eventos individuales de *Arabidopsis* T_3 seleccionados que contienen *dgt*-28 al glifosato aplicado postemergencia a diferentes ratios, *en comparación con una población resistente homocigota* dgt-1 (T_4) y un control no transformado. Porcentaje de lesión visual 14 días después de la aplicación.

	Rango % de Lesiones (No. Replicados				Análisis % de Lesión		

	Rango % de Lesiones (No. Replicados				Análisis % de Lesión		

	Rango % de Lesiones (No. Replicados				Análisis % de Lesión		
	<20%	20-40%	>40%		Med	D. Est.	Rango (%)

	Rango % de Lesiones (No. Replicados				Análisis % de Lesión		
	<20%	20-40%	>40%		Med	D. Est.	Rango (%)

	Rango % de Lesiones (No. Replicados				Análisis % de Lesión		
	<20%	20-40%	>40%		Med	D. Est.	Rango (%)

	Rango % de Lesiones (No. Replicados				Análisis % de Lesión		
	<20%	20-40%	>40%		Med	D. Est.	Rango (%)

	Rango % de Lesiones (No. Replicados				Análisis % de Lesión		
	<20%	20-40%	>40%		Med	D. Est.	Rango (%)

	Rango % de Lesiones (No. Replicados				Análisis % de Lesión		
	<20%	20-40%	>40%		Med	D. Est.	Rango (%)

	Rango % de Lesiones (No. Replicados				Análisis % de Lesión		

	Rango % de Lesiones (No. Replicados				Análisis % de Lesión		
	<20%	20-40%	>40%		Med	D. Est.	Rango (%)

[00274] Selección de plantas transformadas. Semillas T_1 [*dgt-31, dgt-32, y dgt-33* gen v1] recién cosechadas se dejaron secar a temperatura ambiente y se enviaron a Indianápolis para pruebas. Las semillas T_1 fueron sembrada en bandejas de germinación de 26.5 x 51cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), cada una recibiendo alícuotas de 200 mg de semillas T_1 estratificadas (~10.000 semillas) que habían sido previamente suspendidas en 40 ml de solución de agarosa al 0.1% y almacenadas a 4 °C durante 2 días para completar los requisitos de latencia y asegurar una germinación síncrona de las semillas.

[00275] Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) fue cubierta con vermiculita fina y subirrigada con solución de Hoagland hasta humedecerse, después se le dejó drenar por gravedad. Cada alícuota de 40 ml de semilla estratificada fue sembrada de forma uniforme sobre la vermiculita con una pipeta y cubierta con domos de humedad (Kord™ Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 4 a 5 días. Los domos fueron retirados una vez que las plantas habían germinado, antes de la selección de transformante inicial utilizando pulverización postemergencia de glufosinato (seleccionando para el gen *dsm-2* co-transformado).

[00276] Seis días después de la siembra (DAP) y nuevamente 10 DAP, las plantas T_1 (cotiledón y etapa 2-4-lf, respectivamente) fueron pulverizadas con una solución al 0.1% de herbicida IGNITE™ (280 g ai/l de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) a un volumen de pulverización de 10 ml/bandeja (703 l/ha) utilizando una punta de pulverización de aire comprimido DeVilbiss™ para entregar una tasa efectiva de 200 g a.e./ha de glufosinato por aplicación. Los sobrevivientes (plantas en crecimiento activo) fueron identificadas de 4 a 7 días después de la pulverización final. Las plantas sobrevivientes fueron trasplantadas individualmente en macetas de 3 pulgadas preparadas con medio de cultivo (Metro Mix 360™). Las plantas criadas

en el invernadero al menos 1 día antes de la toma de muestras de tejidos para el análisis de número de copias.

[00277] Se tomaron muestras de plantas T_1 y se completaron los análisis de número de copias para el gen *dgt-31*, *dgt-32,* y *dgt-33 v1*. Las plantas T_1 fueron luego asignadas a diferentes tasas de glifosato de modo que hubo una variedad de copias entre cada tasa. Para *Arabidopsis*, 26.25 g a.e./ha de glifosato es una dosis eficaz para distinguir las plantas sensibles de aquellas con niveles de resistencia significativos. Se aplicaron tasas elevadas para determinar los niveles relativos de resistencia (105, 420, 1680, o 3360 g a.e./ha). La **Tabla 15** muestra las comparaciones hechas a *dgt-1*.

[00278] Todas las aplicaciones de herbicida de glifosato fueron hechas con pulverizador de carril en un volumen de pulverización de 187 l/ha. El glifosato utilizado fue de la formulación sal dimetilamina Durango comercial (480 g a.e./l, Dow AgroSciences, LLC). Se accedió además a plantas T_1 de copia baja que exhibieron tolerancia al glufosinato o glifosato en la generación T_2.

[00279] Las primeras transformaciones de *Arabidopsis* se realizaron utilizando *dgt-31*, *dgt-32,* y *dgt-33 v1*. Los transformantes T_1 fueron seleccionados primero desde el fondo de las semillas no transformadas usando un esquema de selección de glufosinato. Tres pisos o 30,000 semillas fueron analizadas para cada constructo T_1. Se calculó la frecuencia de transformación y los resultados de los constructos T1 *dgt-31*, *dgt-32*, y dgt-33 *se enumeran en la* Tabla 14**.**

[00280] **Tabla 14**. Frecuencia de transformación de constructos *Arabidopsis* T1 *dgt -31, dgt-32*, y *dgt-33* seleccionados con glufosinato para la selección del gen marcador seleccionable DSM-2.

Constructo	Cartucho	Frecuencia de Transformación (%)
pDAB107532	AtUbi10/TraP14 *dgt-32 v1*	0.47
pDAB107533	AtUbi10/TraP23 *dgt-31 v1*	0.36
pDAB107534	AtUbi10/TraP24 *dgt-33 v1*	0.68

[00281] Las Plantas T_1 seleccionadas líneas arriba fueron posteriormente trasplantadas a macetas individuales y pulverizadas con diferentes tasas de glifosato comercial. **La Tabla 15** compara la respuesta de *dgt-31, dgt-32,* y *dgt-33 v1* y genes de control para impartir resistencia a glifosato a transformantes de *Arabidopsis* T_1. La respuesta se presenta en términos de % de lesión

visual 2 WAT. Los datos se presentan como un histograma de los individuos que exhiben pocas o ninguna lesiones (<20%), lesión moderada (20-40%), o lesión grave (>40%). Se presenta una media aritmética y desviación estándar para cada tratamiento. También se indica en la última columna el rango en respuesta individual para cada tasa y transformación. La *Arabidopsis* no-transformada (cv. Columbia) tipo silvestre sirvió como un control sensible al glifosato. El gen *DGT-31 (v1)* con péptido de tránsito TraP23 impartió una leve tolerancia a herbicidas a plantas de *Arabidopsis* T_1 individuales en comparación con el control negativo, pero el gen exhibido mejor´´o la tolerancia con el péptido de tránsito TraP8. Tanto DGT-32 como DGT-33 demostraron una robusta tolerancia al glifosato a las tasas probadas con TraP8 y su respectivo péptido de tránsito del cloroplasto distinto (TraP14 y TraP24 respectivamente). Dentro de un tratamiento dado, el nivel de respuesta de la planta varía mucho, lo cual puede atribuirse al hecho de que cada planta representa un evento de transformación independiente y, por lo tanto, el número de copias del gen de interés varía de una planta a otra. Es importante notar que en cada tasa de glifosato probada, había individuos que eran más tolerantes que otros. Un promedio de lesiones de la población total por tasa se presenta en la **Tabla 15** para demostrar la importante diferencia entre las plantas transformadas con *dgt-31, dgt-32,* y *dgt-33 v-1* frente a *dgt-1 v1* o controles de tipo silvestre.

[00282] Tabla 15. *dgt-31, dgt-32,* y *dgt-33 v1* transformaron la respuesta de *Arabidopsis* T_1 a una variedad de tasas de glifosato aplicadas postemergencia, en comparación con una población resistente homocigota *dgt-1* (T_4), o un control no transformado. Porcentaje de lesión visual 2 semanas después del tratamiento.

TraP23 *dgt-31*	% de lesión			% de lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
0 g a.e./ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g a.e./ha	0	0	4	81.3	2.5	80-85
420 g a.e./ha	0	0	4	97.3	4.9	90-100
1680 g a.e./ha	0	0	4	90.0	7.1	85-100
3360 g a.e./ha	0	0	4	91.3	6.3	85-100
TraP14 *dgt-32*	% de lesión			% de lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)

0 g a.e./ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g a.e./ha	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g a.e./ha	2	0	2	30.0	29.4	0-60
1680 g a.e./ha	3	0	1	17.5	21.8	5-50
3360 g a.e./ha	0	3	1	35.0	30.0	20-80
TraP24 dgt-33	% de lesión			% de lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
0 g a.e./ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g a.e./ha	2	2	0	21.3	14.9	5-40
420 g a.e./ha	1	1	2	46.3	30.9	5-70
1680 g a.e./ha	1	0	3	62.5	38.8	5-90
3360 g a.e./ha	1	0	3	62.0	36.0	8-80
TraP8 dgt-31		% de lesión			% de lesión	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
0 g a.e./ha de glifosato	4	0	0		0.0	0.0
105 g a.e./ha	0	1	3		43.8	17.0
420 g a.e./ha	1	2	1		43.8	32.5
1680 g a.e./ha	0	1	3		71.3	27.8
3360 g a.e./ha	0	0	4		81.3	8.5
TraP8 dgt-32		% de lesión			% de lesión	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
0 g a.e./ha de glifosato	4	0	0		0.0	0.0
105 g a.e./ha	4	0	0		0.0	0.0

420 g a.e./ha	4	0	0		7.5	5.0
1680 g a.e./ha	3	1	0		10.8	9.6
3360 g a.e./ha	4	0	0		12.8	3.2
TraP8 dgt-33		% de lesión			% de lesión	
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
0 g a.e./ha de glifosato	4	0	0		0.0	0.0
105 g a.e./ha	4	0	0		0.0	0.0
420 g a.e./ha	4	0	0		2.5	3.8
1680 g a.e./ha	4	0	0		6.3	2.5
3360 g a.e./ha	3	1	0		20.0	13.5
***dgt-1* (control transformado)**	% de lesión			% de lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
0 g a.e./ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g a.e./ha	0	1	3	42.5	15.0	20-50
420 g a.e./ha	0	2	2	38.8	11.1	25-50
1680 g a.e./ha	0	0	4	79.0	19.4	50-90
3360 g a.e./ha	0	0	4	50.0	0.0	50
WT (control no transformado)	% de lesión			% de lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
0 g a.e./ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g a.e./ha	0	0	4	100.0	0.0	100
420 g a.e./ha	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g a.e./ha	0	0	4	100.0	0.0	100

3360 g a.e./ha	0	0	4	100.0	0.0	100

TraP23 *dgt-31*	% de lesión			% de lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	0	0	4	81.3	2.5	80-85
420 g ae/ha	0	0	4	97.3	4.9	90-100
1680 g ae/ha	0	0	4	90.0	7.1	85-100
3360 g ae/ha	0	0	4	91.3	6.3	85-100
TraP14 *dgt-32*	% de lesión			% de lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	2	0	2	30.0	29.4	0-60
1680 g ae/ha	3	0	1	17.5	21.8	5-50
3360 g ae/ha	0	3	1	35.0	30.0	20-80
TraP24 dgt-33	% de lesión			% de lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	2	2	0	21.3	14.9	5-40
420 g ae/ha	1	1	2	46.3	30.9	5-70
1680 g ae/ha	1	0	3	62.5	38.8	5-90
3360 g ae/ha	1	0	3	62.0	36.0	8-80
***dgt-1* (transformed control)**	% de lesión			% de lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)

0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	0	1	3	42.5	15.0	20-50
420 g ae/ha	0	2	2	38.8	11.1	25-50
1680 g ae/ha	0	0	4	79.0	19.4	50-90
3360 g ae/ha	0	0	4	50.0	0.0	50
WT (non-transformed control)	% de lesión			% de lesión		
Promedios	<20%	20-40%	>40%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
420 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

Ejemplo 8: *dgt-32 y dgt-33* como Marcadores Seleccionables

[00283] *dgt-32* y *dgt-33 v1* se utilizan como marcadores seleccionables con glifosato como el agente de selección. El rendimiento de estos marcadores se analiza con *Arabidopsis* transformada. Aproximadamente 50 semillas de *Arabidopsis* generación T_4 (homocigotas para *dgt-32 y dgt-33 v1*) se adicionaron a aproximadamente 5,000 semillas de tipo silvestre (sensibles). Varios tratamientos son comparados, cada bandeja de plantas recibieron una o dos temporizaciones de aplicación de glifosato en uno de los siguientes regímenes de tratamiento: 7 DAP, 11 DAP, o 7 seguido de 11 DAP. Puesto que todos los individuos también contienen el gen *dsm-2* en el mismo vector de transformación, *dgt-32* y *dgt-33* seleccionados con glifosato pueden ser directamente comparados con *dsm-2* seleccionado con glufosinato.

[00284] Los tratamientos se aplican con una boquilla de pulverización DeVilbiss™. Las plantas son identificadas como Resistentes o Sensibles 17 DAP. Los tratamientos de 26.25 a 280 g a.e./ha 2,4-D aplicados 7 y 11 días después de la siembra (DAP), son igualmente eficaces en frecuencia de selección. Estos resultados indican que *dgt-32* y *dgt 33 v1* pueden ser utilizados eficazmente como un marcador seleccionable.

[00285] Heredabilidad. Una variedad de eventos T_1 fueron autopolinizados para producir semillas T_2. Se probó la progenie de estas semillas aplicando IGNITE™ (200 g a.e./ha) a 100 hermanos T_2 aleatorios. Cada planta T_2 individual fue trasplantada a macetas de 7.5 cm cuadrados antes de la aplicación por pulverización (pulverizador de carril a tasa de aplicación 187 l/ha). Las familias T_1 (plantas T_2) que segregan en el modelo 3Resistente:1 Sensible anticipado para un locus individual heredado dominantemente con herencia mendeliana según se determina por análisis chi cuadrado ($P > 0.05$) son determinadas.

[00286] Las semillas se recolectaron de 5 a 15 individuos T_2 (semillas T_3). Veinticinco hermanos T_3 de cada una de tres familias T_2 seleccionadas al azar son probados en progenie. Los datos que no muestran segregación demuestran que *dgt-32* y *dgt-33 v1* están cada uno integrado de forma estable y heredado de forma mendeliana a por lo menos tres generaciones.

[00287] Caracterización de Tolerancia a Herbicida Adicional de líneas DGT T_3. Las semillas de *Arabidopsis* generación T*3* están estratificadas, y se siembran en bandejas de selección. Una línea de control transformada que contiene *dgt-1* y el control no transformado se plantan en una manera similar. Las plántulas se transfieren a macetas individuales de 3 pulgadas en el invernadero. Todas las plantas son pulverizadas con el uso de un pulverizador de carril fijado en 187 l/ha. Las plantas son pulverizadas con una variedad de glifosato de 420 a 3360 g a.e./ha (DURANGO™ DMA, Dow AgroSciences). Todas las aplicaciones son formuladas en agua. Cada tratamiento se repite 4 veces, y las plantas son evaluadas a los 7 y 14 días después del tratamiento.

Ejemplo 9: Transformación de Especies de Cultivos Adicionales

[00288] La soja es transformada con *dgt-28*, *dgt-31*, y/o *dgt-33* (con o sin un péptido de tránsito del cloroplasto) para proporcionar altos niveles de resistencia al glifosato herbicida, utilizando un método conocido para los expertos en la materia, por ejemplo, sustancialmente las mismas técnicas descritas anteriormente en el Ejemplo 11 o Ejemplo 13 de la Publicación de Patente Internacional PCT Nº WO 2007/053482, referencia que es incorporada en este documento por esta referencia en su totalidad.

[00289] El algodón es transformado con *dgt-28*, *dgt-32*, y/o *dgt-33* (con o sin un péptido de tránsito del cloroplasto) para proporcionar altos niveles de resistencia al glifosato herbicida, utilizando un método conocido para los expertos en la materia, por ejemplo, sustancialmente las mismas técnicas descritas anteriormente en el Ejemplo 14 de la Patente EE.UU. **7,**838,733, o en el

Ejemplo 12 de la Publicación de Patente Internacional PCT Nº WO 2007/053482, cada una de cuyas referencias son incorporadas en este documento por esta referencia en su totalidad.

[00290] La colza es transformada con *dgt-28*, *dgt-31*, y/o *dgt-33* (con o sin un péptido de tránsito del cloroplasto) para proporcionar altos niveles de resistencia al glifosato herbicida utilizando un método conocido para los expertos en la materia, por ejemplo, sustancialmente las mismas técnicas descritas anteriormente en el Ejemplo 26 de la Patente EE.UU. 7,838,733, o en el Ejemplo 22 de la Publicación de Patente Internacional PCT Nº WO 2007/053482.

Ejemplo 10: Transformación del Maíz

[00291] Constructos de ADN para Transformación del Maíz. Como se describe líneas arriba, se utilizaron métodos estándar de clonación en la construcción de vectores binarios para uso en transformación de maíz mediada con *Agrobacterium tumefaciens*. **La Tabla 16** enumera los vectores que fueron construidos para la transformación del maíz. Los siguientes elementos genéticos fueron utilizados en los vectores que contenían *dgt-20*; el promotor *Zea mays* Ubiquitina 1 (ZmUbi1; Patente EE.UU. No. 5,510,474) se utilizó para accionar la secuencia de codificación *dgt-28* que está flanqueada por una región no traducida *Zea mays* Lipasa 3' (ZmLip 3'UTR; Patente EE.UU. No. 7179902), el cartucho marcador seleccionable consiste en el promotor *Zea mays* Ubiquitina 1 que se utilizó para accionar la secuencia de codificación *aad-1* (Patente EE.UU. No. 7,838,733) la cual está flanqueada por una región no traducida *Zea mays* Lipasa 3'. La secuencia de codificación *aad-1* confiere tolerancia a los herbicidas de auxina fenoxi, tales como, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y a herbicidas ariloxifenoxipropionatos (AOPP) .

[00292] Los constructos *dgt-28* fueron construidos como vectores binarios estándar y vectores de sistema superbinario *Agrobacterium* (Japan Tobacco, Tokio, JP). Los vectores binarios estándar incluyen: pDAB107663, pDAB107664, pDAB107665 y pDAB107665. Los vectores de sistema superbinario *Agrobacterium* incluyen pDAB108384, pDAB108385, pDAB108386 y pDAB108387.

[00293] Se completaron constructos adicionales que contienen un gen reportero de *proteína fluorescente amarilla* (*yfp*; Solicitud Patente EE.UU. 2007/0298412). pDAB109812 contiene un cartucho de gen reportero *yfp* que es accionado por el promotor *Zea mays Ubiquitina 1 y flanqueado por la región no traducida* Zea mays *por 5 3 ' (Zm per5 3'UTR;* Patente EE.UU. No. 7179902), el cartucho marcador seleccionable consiste en el promotor del virus baciliforme de la caña de azúcar

(SCBV; Patente EE.UU. No. 5,994,123) que se utiliza para accionar la expresión de aad-*1 y está flanqueado por la región no traducida* Zea mays *Lipasa 3'*. . pDAB101556 contiene un cartucho de *yfp* que es accionado por el promotor de *Zea mays* Ubiquitina 1 y flanqueado por el *Zea mays* por la región 5 3' no traducida, el cartucho de marcador seleccionable consiste en el promotor de *Zea mays* Ubiquitina 1 que se utiliza para ejecutar la expresión de *aad*-1 y está flanqueado por la región no traducida de *Zea mays* Lipasa 3'. *pDAB107698 contiene un cartucho dgt*-28 que es accionado por el promotor *Zea mays* Ubiquitina 1 y está flanqueado por una región no traducida *Zea mays* Lipasa 3', un cartucho *yfp* que fue accionado por el promotor *Zea mays* Ubiquitina 1 y flanqueado por la región no traducida *Zea mays* por 5 3', el cartucho de marcador seleccionable consiste en el promotor de virus baciliforme de la caña de azúcar que es usado para accionar la expresión de *aad*-1 y está flanqueado por la región no traducida *Zea mays* Lipasa 3'. Estos tres constructos son vectores binarios estándar.

[00294] Tabla 16. Vectores de Transformación del Maíz

No. plásmido	Figura No:	Descripción de Elementos Génicos
pDAB107663	34	ZmUbi1/TraP4 *dgt*-28/ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/*aad*-1/ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB107664	35	ZmUbi1/TraP8 *dgt*-28/ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ *aad*-1 /ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB107665	36	ZmUbi1/TraP23 *dgt*-28/ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ *aad*-1 /ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB107666	37	ZmUbi1/TraP5 *dgt*-28/ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ *aad*-1 /ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB109812	38	ZmUbi1/*yfp*/ZmPer5 3'UTR :: SCBV / *aad*-1 /ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB101556	39	ZmUbi1/*yfp*/ZmPer5 3'UTR :: ZmUbi1/ *aad*-1 / ZmLip 3'UTR vector binario
pDAB107698	40	ZmUbi1/TraP8 *dgt*-28/ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/*yfp*/ZmLip 3'UTR::SCBV/ *aad*-1 /ZmLip 3'UTR
pDAB108384	41	ZmUbi1/TraP4 *dgt*-28/ZmLip 3'UTR:: ZmUbi1/ *aad*-1 /ZmLip 3'UTR supervector binario
pDAB108385	42	ZmUbi1/TraP8 *dgt*-28/ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ *aad*-1 /ZmLip 3'UTR precursor superbinario
pDAB108386	43	ZmUbi1/TraP23 *dgt*-28/ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ *aad*-1 /ZmLip 3'UTR precursor superbinario
pDAB108387	44	ZmUbi1/TraP5 *dgt*-28/ZmLip 3'UTR::ZmUbi1/ *aad*-1 /ZmLip 3'UTR precursor superbinario

[00295] Esterilización de mazorca y aislamiento de embrión. Para obtener embriones inmaduros de maíz, plantas de la línea endogámica *Zea mays* B104 fueron cultivadas en el invernadero y fueron autopolinizadas o polinizadas por hermanos para producir mazorcas. Las mazorcas se cosecharon aproximadamente 9 a 12 días después de la polinización. En el día experimental, la superficie de las mazorcas fue esterilizada mediante inmersión en una solución al 20% de hipoclorito de sodio (5%) y agitado durante 20-30 minutos, seguido de tres enjuagues en agua estéril. Después de la esterilización, embriones cigóticos inmaduros (1.5 a 2.4 mm) fueron diseccionados asépticamente de cada mazorca y distribuidos aleatoriamente en tubos de microcentrífuga conteniendo medios de infección líquidos (**Medio LS Basal, 4.43 gm/l; Solución de Vitamina N6 [1000X], 1,00 ml/l, L-prolina, 700,0 gm/l; Sacarosa, 68.5 gm/l, D(+) Glucosa, 36.0 gm/l; 10mg/ml de 2.4-D, 150 µl/l**). Para un conjunto dado de experimentos, se utilizaron los embriones agrupados de tres mazorcas para cada transformación.

[00296] ***Iniciación de Cultivo*** **Agrobacterium :**

[00297] Stocks de glicerol de *Agrobacterium* conteniendo los vectores de transformación binarios descritos líneas arriba fueron sembradas en placas de medio mínimo AB conteniendo antibióticos apropiados y fueron cultivados a 20ºC durante 3 a 4 días. Una sola colonia fue recogida y sembrada en placas de YEP conteniendo los mismos antibióticos y fue incubada a 28ºC durante 1 a 2 días.

[00298] *Cultivo y Co-cultivo* Agrobacterium**. Colonias de** *Agrobacterium* fueron tomadas de la placa YEP, suspendidas en 10 ml de medio de infección en un tubo desechable de 50 ml, y la densidad celular se ajustó a OD_{600} nm de 0.2-0.4 usando un espectrofotómetro. Los cultivos de *Agrobacterium* se colocaron en un agitador rotatorio a 125 rpm, a temperatura ambiente, mientras fe realizada la disección de embriones. Embriones cigóticos inmaduros de tamaño entre 1.5 y 2.4 mm fueron aislados de los granos de maíz esterilizados y colocados en 1 ml del medio de infección) y lavados una vez en el mismo medio. La suspensión de *Agrobacterium* (2 ml) fue añadida a cada tubo y los tubos fueron colocados en la plataforma de un agitador durante 10 a 15 minutos. Los embriones fueron transferidos a medios de co-cultivo (MS Salts, 4,33 gm/l, L-prolina, 700,0 mg/l; Myo-inositol, 100.0 mg/l; hidrolizado enzimático de caseína 100.0 mg/l; 30 mM Dicamba-Koh, 3.3 mg/l; sacarosa, 30.0 gm/l; Gelzan™, 3.00 gm/l; MS-Vitamina Modificada [1000X], 1.00 ml/l; 8.5 mg/ml de $AgNo_3$, 15.0 mg/l; DMSO, 100 µM), orientados con el escutelo hacia arriba e incubados a 25°C, bajo luz las 24horas a intensidad de luz 50 µ mol m^{-2} seg^{-1} durante 3 días.

[00299] Selección de Callos y Regeneración de Eventos Putativos. Tras el período de co-cultivo, los embriones fueron transferidos a medios de reposo (MS Salts, 4.33 g/l de L-prolina;, 700.0 mg/l; 1,2,3,5/4,6 - hexahidroxiciclohexano, 100 mg/l; MES [(ácido 2 - (N-morfolino)-etanosulfónico), ácido libre] 0.500 gm/l; hidrolizado enzimático de caseína 100.0 mg/l; 30 mM Dicamba-KOH, 3.3 mg/l; Sacarosa, 30.0 gm/l; Gelzan 2.30 gm/l; MS-Vitamina Modificada [1000X], 1.00 ml/l; 8.5mg/ml AgNo3, 15.0 mgm/l; Carbenicilina, 250.0 mg/l) sin agente selectivo e incubados bajo luz las 24 horas a intensidad de luz de 50 µmoles m^{-2} seg^{-1} y a 25ºC durante 3 días.

[00300] Los experimentos de respuesta de dosificación de inhibición del crecimiento sugirieron que concentraciones de glifosato de 0.25 mM y superiores eran suficientes para inhibir el crecimiento celular en la línea de maíz B104 no transformada. Los embriones fueron transferidos a medios de Selección 1 conteniendo 0.500 mM de glifosato (MS Salts, 4.33 g/l de L-prolina;, 700.0 mg/l; Myo-inositol, 100.0 mg/l; MES [ácido (2 - (N-morfolino)-etanosulfónico), ácido libre] 0,500 gm/l; hidrolizado enzimático de caseína 100.0 mg/l; 30 mM Dicamba-KOH, 3.3 mg/l; Sacarosa, 30.0 gm/l; Gelzan™ 2.30 gm/l; MS-Vitamina Modificada [1000X], 1.00 ml/l; 8.5mg/ml AgNo3, 15.0 mg/l; Carbenicilina, 250.0 mg/l) e incubados bajo oscuridad y/o] bajo luz de 24 horas a intensidad de luz 50 µmoles m^{-2} seg^{-1} durante 7 a 14 días a 28°C.

[00301] Selección de Callos y Regeneración de Eventos Putativos. Tras el período de co-cultivo, los embriones fueron transferidos a medios de reposo (MS Salts, 4.33 g/l de L-prolina;, 700.0 mg/l; 1,2,3,5/4,6 - hexahidroxiciclohexano, 100 mg/l; MES [(ácido 2 - (N-morfolino)-etanosulfónico), ácido libre] 0.500 gm/l; hidrolizado enzimático de caseína 100.0 mg/l; 30 mM Dicamba-KOH, 3.3 mg/l; Sacarosa, 30.0 gm/l; Gelzan 2.30 gm/l; MS-Vitamina Modificada [1000X], 1.00 ml/l; 8.5mg/ml AgNo3, 15.0 mgm/l; Carbenicilina, 250.0 mg/l) sin agente selectivo e incubados bajo luz las 24 horas a intensidad de luz de 50 µmoles m^{-2} seg^{-1} y a 25ºC durante 3 días.

[00302] Los experimentos de respuesta de dosificación de inhibición del crecimiento sugirieron que concentraciones de glifosato de 0.25 mM y superiores eran suficientes para inhibir el crecimiento celular en la línea de maíz B104 no transformada. Los embriones fueron transferidos a medios de Selección 1 conteniendo 0.500 mM de glifosato (MS Salts, 4.33 g/l de L-prolina;, 700.0 mg/l; Myo-inositol, 100.0 mg/l; MES [ácido (2 - (N-morfolino)-etanosulfónico), ácido libre] 0,500 gm/l; hidrolizado enzimático de caseína 100.0 mg/l; 30 mM Dicamba-KOH, 3.3 mg/l; Sacarosa, 30.0 gm/l; Gelzan™ 2.30 gm/l; MS-Vitamina Modificada [1000X], 1.00 ml/l; 8.5mg/ml AgNo3,

15.0 mg/l; Carbenicilina, 250.0 mg/l) e incubados bajo oscuridad y/o] bajo luz de 24 horas a intensidad de luz 50 µmoles m^{-2} seg^{-1} durante 7 a 14 días a 28°C.

[00303] Los callos embriogénicos proliferantes se transfirieron a medio Selección 2 conteniendo 1.0 mM de glifosato (MS Salts, 4.33 gm/l; 1,2,3,5/4,6 - hexahidroxiciclohexano, 100mg/l; L-prolina, 700.0 mg/l; MES [(ácido 2 - (N-morfolino)-etanosulfónico), ácido libre] 0.500 gm/l; hidrolizado enzimático de caseína 100.0 mg/l; 30 mM Dicamba-KOH, 3.3 mg/l; Sacarosa, 30.0 gm/l; Gelzan™ 2,30 gm/l; MS-Vitamina Modificada [1000X], 1.00 ml/l; 8.5 mg/ml AgNo3, 15.0 mg/l; Carbenicilina, 250.0 mg/l; ácido R-haloxifop 0.1810 mg/l), y se incubaron en oscuridad y/o bajo luz las 24 horas con intensidad de luz 50 µmol m^{-2} seg^{-1}durante 14 días a 28°C. Este paso de selección permitió al callo transgénico proliferar y diferenciarse. El período de selección de callo duró de tres a cuatro semanas.

[00304] Los callos embriogénicos proliferantes se transfirieron a medio PreReg 2 conteniendo 0.5 mM de glifosato (MS Salts, 4.33 gm/l; 1,2,3,5/4,6 - hexahidroxiciclohexano, 100mg/l; L-prolina, 350.0 mg/l; MES [(ácido -2 - (N-morfolino)-etanosulfónico), ácido libre] 0.250 gm/l; hidrolizado enzimático de caseína 50.0 mg/l; NAA-NaOH 0.500 mg/l; ABA-EtOH 2.50 mg/l; BA 1.00 mg/l 2.50 mM Dicamba-KOH, 1.00 mg/l; Sacarosa, 45.0 gm/l; Gelzan™ 2,50 gm/l; MS-Vitamina Modificada [1000X], 1.00 ml/l; 8.5 mg/ml AgNo3, 1.00 mg/l; Carbenicilina, 250.0 mg/l), y se incubaron en oscuridad y/o bajo luz las 24 horas con intensidad de luz a 50 µmol m^{-2} seg^{-1}durante 7 días a 28°C.

[00305] Callos embriogénicos con yemas similares a brotes se transfirieron a medios de Regeneración conteniendo 0,5 mM de glifosato (MS Salts, 4.33 gm/l; 1,2,3,5/4,6 - hexahidroxiciclohexano, 100.0 mg/l; Sacarosa, 60.0 g/l; Gellan Gum G434™ 3.00 gm/l; MS-Vitamina Modificada [1000X], 1.00 ml/l, Carbenicilina, 125.0 mg/l) y se cultivaron bajo 24 horas de luz a intensidad de la luz 50 micromoles m^{-2} seg^{-1} durante 7 días.

[00306] Pequeños brotes con raíces primarias se transfirieron a medios de enraizamiento (MS Salts, 4.33 gm/l; MS-Vitamina Modificada [1000X], 1.00 ml/l; 1,2,3,5/4,6 - hexahidroxiciclohexano, 100 mg/l; sacarosa, 60,0 gm/l; Gellan Gum G434™ 3.00 gm/l; Carbenicilina, 250.0 mg/l) en fitobandejas y se incubaron bajo 16/8 h. de luz/oscuridad a intensidad de luz 140-190 µmoles m^{-2} seg^{-1} durante 7 días a 27°C. Plántulas transgénicas putativas fueron analizadas en busca del número de copia del transgén usando los protocolos descritos anteriormente y se transfirieron a suelo.

[00307] Confirmación Molecular de la Presencia de los transgenes *dgt-28* y *aad-1* dentro de las Plantas de Maíz. La presencia de las secuencias de polinucleótidos *dgt-28* y *aad-1* fue confirmada *vía* ensayos con sonda de hidrólisis. Plantas de maíz T_0 aisladas fueron cribadas inicialmente *mediante* un ensayo de sonda de hidrólisis, análogo a TAQMAN™, para confirmar la presencia de transgenes *aad-1* y *dgt*-28. Los datos generados a partir de estos estudios se utilizaron para determinar el número de copia del transgén y se utilizaron para seleccionar eventos de maíz transgénico para retrocruzamiento y avance a la generación T_1.

[00308] Se recogieron muestras de tejido en placas de 96 pocillos, la maceración del tejido se realizó con un pulverizador de tejidos KLECO™ y perlas de acero inoxidable (Hoover Precision Products, Cumming, GA), en solución tampón RLT Qiagen™. Después de la maceración del tejido, el ADN genómico fue aislado en formato de alto rendimiento usando el kit de planta Biosprint 96™ (Qiagen, Germantown, MD) según el protocolo sugerido por el fabricante. El ADN genómico fue cuantificado mediante kit de ensayo de ADN Quant-IT™ Pico Green (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADN genómico cuantificado fue ajustado a alrededor de 2ng/µL para el ensayo de sonda de hidrólisis usando un manipulador de líquidos automatizado BIOROBOT3000™ (Qiagen, Germantown, MD). La determinación del número de copia transgén mediante el ensayo de sonda de hidrólisis, análogo al ensayo TAQMAN®, fue realizado por PCR en tiempo real utilizando el sistema LIGHTCYCLER®480 (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Los ensayos fueron diseñados para *aad*-1, *dgt*-28 y una invertasa de gen de referencia interna (GenBank Accesion No: U16123.1) utilizando el LIGHTCYCLER® Probe Design Software 2.0. Para amplificación, LIGHTCYCLER®480 Probes Master mix (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) fue preparado a concentración final de 1X en un volumen de 10µL de reacción múltiplex conteniendo 0.4 µM de cada iniciador para *aad*-1 y *dgt*-28 y 0.2 µM de cada sonda (**Tabla 17**).

[00309] Una reacción de amplificación de dos etapas fue realizada con una extensión a 60°C durante 40 segundos con adquisición de fluorescencia. Todas las muestras fueron promediadas y los valores de umbral de ciclo (Ct) se utilizaron para el análisis de cada muestra. El análisis de datos PCR en tiempo real se realizó utilizando software LightCycler® versión 1.5 usando el módulo quant relativo y está basado en el método ΔΔCt. Los controles incluyeron una muestra de ADN genómico de un de calibrador de copia única y dos copias de control conocido que se incluyeron en cada pasada. **La Tabla 18** enumera los resultados de los ensayos de sonda de hidrólisis.

[00310] Tabla 17. Las secuencias de iniciador y sonda utilizados para el ensayo de sonda de hidrólisis de *aad*-1, *dgt*-28 y referencia interna (Invertasa).

Nombre de Oligonucleótido	**Gen Detectado**	**NO ID SEC:**	**Oligo Secuencia**
GAAD1F	*aad*-1 iniciador delantero	58	TGTTCGGTTCCCTCTACCAA
GAAD1P	*aad*-1 sonda	59	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA
GAAD1R	*aad*-1 iniciador inverso	60	CAACATCCATCACCTTGACTGA
IV-Probe	Sonda invertasa	61	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC
FIV-Taq	Iniciador delantero invertasa	62	TGGCGGACGACGACTTGT
IVR-Taq	Iniciador inverso invertasa	63	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
zmDGT$_2$8 F	*dgt*-28 iniciador delantero	64	TTCAGCACCCGTCAGAAT
zmDGT$_2$8 FAM	*dgt*-28 sonda	65	TGCCGAGAACTTGAGGAGGT
zmDGT$_2$8 R	*dgt*-28 iniciador inverso	66	TGGTCGCCATAGCTTGT

[00311] Tabla 15. T_0 resultados de cantidad de copia para eventos *dgt*-28. Eventos de baja copia consistieron en 1-2 copias de transgenes, los números de copia única se enumeran entre paréntesis. Eventos de alta copia contenían 3 o más copias de transgenes.

Plásmido usado para la transformación	**# de Eventos de Baja Copia (copia única)**	**# de Eventos de Alta Copia**
pDAB107663	43 (31)	10
pDAB107664	30 (24)	5
pDAB107665	40 (27)	10
pDAB107666	24 (12)	12
pDAB109812	2 (1)	0
pDAB101556	25 (15)	10
pDAB107698	3 (1)	2

Ejemplo 11: Tolerancia al herbicida en maíz transformado *dgt*-28

[00312] A eventos de transformación de *Zea mays dgt-28* (T_0) se les permitió aclimatarse en el invernadero y se cultivaron hasta que las plantas transicionaron de tejido de cultivo a condiciones de crecimiento en invernadero (es decir, 2.4 hojas nuevas, de aspecto normal, emergieron de la fronda). Las plantas fueron cultivadas a 27 °C bajo condiciones de 16 horas de luz:8 horas de oscuridad en el invernadero. Las plantas fueron entonces tratadas con formulaciones comerciales de DURANGO DMA™ (que contiene el herbicida glifosato) con la adición de sulfato de amonio al 2% m/v. Las aplicaciones de herbicida se hicieron con un rociador automático a un volumen de rocío de 187 L/ha, altura de rocío de 50 cm. Las plantas fueron rociadas con un rango de glifosato desde 280 hasta 4480 g de glifosato ae/ha, que es capaz de causar daño significativo a líneas de maíz sin transformar. Una dosis letal se define como la tasa que causa >95% de daño a la B104 endógama.

[00313] Los resultados de las plantas de maíz T_0 *dgt-28* demostraron que la tolerancia al glifosato se alcanzó a tasas de hasta 4480 g ae/ha. Un tipo de medio específico se usó en la generación T_0. El mínimo retraso en el crecimiento y el crecimiento general de las plantas transformadas en comparación con las plantas de control no transformadas demostraron que *dgt-28* proporciona una robusta tolerancia al glifosato cuando se liga a los péptidos de tránsito del cloroplasto TraP5, TraP8 y TraP23.

[00314] Plantas seleccionadas T_0 son autosembradas o retrocruzadas para una mayor caracterización en la siguiente generación. 100 líneas elegidas de *dgt-28* incluyendo a las plantas T_1 son rociadas con 140-1120 g ae/ha de glufosinato o 105-1680 g ae/ha de glifosato. Tanto el marcador seleccionable como el gen resistente al glifosato están incluidos en el mismo plásmido. Por lo tanto, si un gen tolerante al herbicida es seleccionado al rociarlo con un herbicida, se presume que ambos genes están presentes. 14 días después del tratamiento, las plantas resistentes y sensibles se cuentan para determinar el porcentaje de líneas que se segregaron como una sola característica dominante Mendeliana de locus único (3R:1S), determinada por un análisis de chi cuadrada. Estos datos demuestran que *dgt-28* es hereditario como un gen robusto de resistencia al glifosato en una especie monocotiledónea. Tasas mayores de glifosato se aplican a las sobrevivientes de T_1 o F_1 para caracterizar aún más la tolerancia y protección que proporciona el gen *dgt-28*.

[00315] La tolerancia al herbicida post-emergencia en *dgt-28* transformó al maíz T_0. Los eventos T_0 de *dgt-28* enlazados con TraP4, TraP5, TraP8 y TraP23 fueron generados por la

transformación de *Agrobacterium* y se les permitió aclimatarse bajo condiciones controladas de cámara de crecimiento hasta que de 2-4 hojas nuevas, de aspecto normal, habían emergido de la fronda. A las plantas se les asignaron números de identificación individuales y se tomaron muestras para análisis del número de copias tanto de *dgt-28* como de *aad-1*. Con base en los análisis del número de copias, se seleccionaron plantas para análisis de expresión de proteínas. Las plantas se trasplantaron a macetas más grandes con nuevo medio de cultivo y se cultivaron a 27°C bajo condiciones de 16 horas de luz:8 horas de oscuridad en el invernadero. Las plantas restantes de las que no se tomaron muestras para expresión de proteínas fueron entonces tratadas con formulaciones comerciales de DURANGO DMA™ (glifosato) con la adición de sulfato de amonio al 2% m/v. Los tratamientos se distribuyeron de modo que cada grupo de plantas contenía eventos T_0 con un número variable de copias. Las aplicaciones de herbicida se hicieron con un rociador automático a un volumen de rocío de 187 L/ha, altura de rocío de 50 cm. Las plantas fueron rociadas con un rango de glifosato desde 280 hasta 4480 g ae/ha de glifosato, capaz de causar daño significativo a líneas de maíz sin transformar. Una dosis letal se define como la tasa que causa >95% de daño a la B104 endógama. B104 era el origen genético de las plantas transformadas.

[00316] Los resultados de las plantas de maíz T_0 *dgt-28* demostraron que la tolerancia al glifosato se alcanzó hasta a 4480 g ae/ha. **Tabla 16.** El mínimo retraso en el crecimiento y el crecimiento general de las plantas transformadas en comparación con las plantas de control no transformadas demostraron que *dgt-28* proporciona una robusta tolerancia al glifosato cuando se liga a TraP5, TraP8 y TraP23.

[00317] **Tabla 16.** Respuesta de los eventos T_0 *dgt-28* con número variable de copias a tasas de glifosato de entre 280 y 4480 g ae/ha + sulfato de amonio al 2.0% m/v 14 días después del tratamiento.

TraP4 *dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
280 g ae/ha	5	0	0	1.0	2.2	0-5
560 g ae/ha	6	0	0	2.0	4.0	0-10
1.120 g ae/ha	12	0	0	1.3	3.1	0-10
2.240 g ae/ha	7	0	0	1.7	4.5	0-12

4.480 g ae/ha	7	0	0	1.1	3.0	0-8
TraP8 *dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	6	0	0	0.0	0.0	0
280 g ae/ha	5	1	0	6.7	8.8	0-20
560 g ae/ha	0	2	0	20.0	0.0	20
1.120 g ae/ha	7	0	0	1.4	2.4	0-5
2.240 g ae/ha	3	1	0	7.5	15.0	0-30
4.480 g ae/ha	6	0	0	1.7	4.1	0-10
TraP23 *dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	6	0	0	0.8	2.0	0-5
280 g ae/ha	7	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1.3	2.5	0-5
1.120 g ae/ha	10	2	0	3.3	7.8	0-20
2.240 g ae/ha	6	0	0	1.3	3.3	0-8
4.480 g ae/ha	6	1	0	4.3	7.9	0-20
TraP5 *dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
280 g ae/ha	7	1	0	5.0	14.1	0-40
560 g ae/ha	8	0	0	0.6	1.8	0-5
1.120 g ae/ha	7	1	0	5.0	14.1	0-40
2.240 g ae/ha	8	0	0	0.0	0.0	0
4.480 g ae/ha	8	0	0	0.0	0.0	0

[00318] Los análisis de expresión de proteínas por medio de un ELISA estándar demostraron un rango de medias de la proteína DGT-28 de 12.6 a 22.5 ng/cm^2 en todas las construcciones probadas.

[00319] Confirmación de tolerancia al glifosato en la generación F_1 bajo condiciones de invernadero. Plantas T_0 de una sola copia que no fueron rociadas fueron retrocruzadas con el origen B104 no transformado para mayor caracterización en la siguiente generación. En la generación T_1, la tolerancia al glifosato fue evaluada para confirmar la herencia del gen *dgt-28*. Para plantas T_1, se aplicó el herbicida ASSURE II™ (35 g ae/ha de quizalofop-metil) en la etapa de crecimiento V1 para seleccionar para la proteína AAD-1. Tanto el marcador seleccionable como el gen resistente al glifosato están incluidos en el mismo plásmido. Por lo tanto si se selecciona un gen, se asume que ambos genes están presentes. A 7 días después del tratamiento, se contaron las plantas resistentes y sensibles y se retiraron las plantas nulas de la población. Estos datos demuestran que *dgt-28* (v1) es hereditario como un gen robusto de resistencia al glifosato en una especie monocotiledónea. Se tomaron muestras de las plantas para caracterización de la proteína DGT-28 por ELISA estándar y nivel de transcripción de RNA. Las plantas resistentes fueron rociadas con 560—4480 g ae/ha de glifosato como se describió anteriormente. Los datos demuestran una robusta tolerancia de *dgt-28* ligada con los péptidos de tránsito del cloroplasto TraP4, TraP5, TraP8 y TraP23 hasta 4480 g ae/ha de glifosato. **Tabla 17.**

[00320] **Tabla 17.** Respuesta de F_1 *dgt-28* con una sola copia a tasas de glifosato de entre 560 y 4480 g ae/ha + sulfato de amonio al 2.0% m/v 14 días después del tratamiento.

B104 / TraP4::*dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
1.120 g ae/ha	4	0	0	9.0	1.2	8-10
2.240 g ae/ha	4	0	0	2.5	2.9	0-5
4.480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
B104 / TraP8::*dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)

0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1.3	2.5	0-5
1.120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2.240 g ae/ha	4	0	0	5.0	4.1	0-10
4.480 g ae/ha	4	0	0	6.3	2.5	5-10
B104 / TraP23::*dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	3	1	0	10.0	10.0	5-25
1.120 g ae/ha	2	2	0	18.8	11.8	10-35
2.240 g ae/ha	4	0	0	12.5	2.9	10-15
4.480 g ae/ha	3	1	0	10.0	7.1	5-20
B104 / TraP5::*dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	8.0	0.0	8
1.120 g ae/ha	4	0	0	11.3	3.0	8-15
2.240 g ae/ha	4	0	0	12.5	2.9	10-15
4.480 g ae/ha	4	0	0	10.0	2.5	10-15
B104 no transformado	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
1.120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
2.240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4.480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

[00321] Datos de la expresión de proteínas demuestran un rango de medias de proteína DGT-28 de 42.2-88.2 ng/cm^2 en todos los eventos T_1 y construcciones probadas, estableciendo la expresión de proteínas en la generación T_1.

[00322] Caracterización de dgt-28 bajo condiciones de campo. Eventos T_1 de una sola copia fueron enviados a una ubicación en campo para crear semilla tanto hemicigota híbrida como homocigota endógama para caracterización adicional. La semilla híbrida fue creada cruzando eventos T_1 en la línea de transformación de maíz B104 con la línea endógama 4XP811 generando poblaciones híbridas segregando 1:1 (hemicigoto:nulo) para el evento. Las semillas resultantes fueron enviadas a 2 ubicaciones separadas. Un total de cinco eventos con una sola copia por construcción se plantaron en cada ubicación por triplicado en un diseño de bloque completo aleatorio. Los campos fueron diseñados para que ocurrieran aplicaciones de glifosato en la etapa de crecimiento V4 y para que a un grupo separado de plantas se les aplicara en la etapa de crecimiento V8. El híbrido convencional 4XP811/B104 se usó como control negativo.

[00323] Hileras experimentales fueron tratadas con 184 g ae/ha de ASSURE II™ (106 g ai/L quizalofop-metil) para eliminar segregantes nulos. Todas las líneas experimentales se segregaron 1:1 (sensibles:resistentes) (p=0.05) respecto a la aplicación de ASSURE II™. Se tomaron muestras de plantas resistentes seleccionadas de cada evento para cuantificación de la proteína DGT-28 por medio de un ELISA estándar.

[00324] Plantas resistentes al quizalofop-metil fueron tratadas con el herbicida comercial DURANGO DMA™ (480 g ae/L glifosato) con la adición de sulfato de amonio al 2.5% m/v en la etapa de crecimiento V4 o V8. Las aplicaciones de herbicida se hicieron con un rociador rodante calibrado para depositar un volumen de 187 L/ha, altura de rocío de 50 cm. Las plantas fueron rociadas con un rango de glifosato desde 1120 hasta 4480 g ae/ha de glifosato, capaz de causar daño significativo a líneas de maíz sin transformar. Una dosis letal se define como la tasa que causa >95% de daño a la 4XP811 endógama. Evaluaciones visuales de daños se realizaron para determinar el porcentaje de clorosis visible, el porcentaje de necrosis, el porcentaje de inhibición del crecimiento y el daño total visible a los 7, 14 y 21 días después del tratamiento. Se compararon las evaluaciones con los controles sin tratar para cada línea y con los controles negativos.

[00325] Los datos de daños visibles para todas las evaluaciones demostraron una robusta tolerancia hasta a 4480 g ae/ha de DURANGO DMA™ en ambas ubicaciones y en ambos momentos de aplicación. Se presentan eventos representativos de la aplicación en V4 de una

ubicación y son consistentes con otros eventos, momentos de aplicación y ubicaciones. **Tabla 18.** Un evento de la construcción que contenía *dgt-28* ligado con TraP23 (pDAB107665) fue tolerante a la selección por ASSURE II™ para la proteína AAD-1, pero fue sensible a todas las tasas de glifosato aplicadas.

[00326] Tabla 18. Respuesta de los eventos *dgt-28* a los que se aplicó un rango de glifosato entre 1120 y 4480 g ae/ha + sulfato de amonio al 2.5% m/v en la etapa de crecimiento V4.

4XPB11//B104/TraP4::*dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
1.120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2.240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4.480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4XPB11//B104/TraP8::*dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
1.120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2.240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4.480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4XPB11//B104/TraP23::*dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
1.120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2.240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4.480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4XPB11//B104/TraP5::*dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)

0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
1.120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2.240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4.480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0

4XPB11/B104 no transformado	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
1.120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
2.240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4.480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

[00327] Se realizaron evaluaciones adicionales durante la etapa de crecimiento reproductivo para la tasa de glifosato de 4480 g ae/ha. Las evaluaciones visuales de panículas, tiempos de polinización y llenado de la mazorca fueron similares a las de los controles sin tratamiento de cada línea para todas las construcciones, momentos de aplicación y ubicaciones. Los resultados cuantitativos para la proteína DGT-28 demostraron un rango de medias de expresión de proteína de 186.4-303.0 ng/cm^2. Los datos demuestran una robusta tolerancia del maíz con *dgt-28* transformado bajo condiciones de campo a través de las etapas de crecimiento reproductivo hasta a 4480 g ae/ha de glifosato. Los datos también demostraron detección y función de la proteína DGT-28 con base en los resultados de tolerancia al rociado.

[00328] Confirmación de heredabilidad y tolerancia de *dgt-28* en el estado homocigótico. Semillas del T_1S2 fueron plantadas bajo condiciones de invernadero como se describió anteriormente. Las mismas cinco líneas de una sola copia que fueron caracterizadas bajo condiciones de campo fueron caracterizadas en el estado homogéneo. Las plantas fueron cultivadas hasta la etapa de crecimiento V3 y separadas en tres tasas de glifosato, desde 1120 hasta 4480 g ae/ha de glifosato (DURANGO DMA™) y cuatro réplicas por tratamiento. Las aplicaciones se hicieron con un rociador automático como se describió anteriormente y fueron formuladas en sulfato de amonio al 2.0% m/v. Una aplicación de sulfato de amonio sirvió como un control sin tratamiento para cada línea. Las evaluaciones visuales se realizaron 7 y 14 días después del tratamiento, como se

describió anteriormente. Los datos demostraron una tolerancia robusta hasta a 4480 g ae/ha de glifosato para todos los eventos examinados. **Tabla 19.**

[00329] Tabla 19. Respuesta de los eventos *dgt-28* homocigóticos a los que se aplicó un rango de glifosato entre 1120 y 4480 g ae/ha + sulfato de amonio al 2,0% m/v.

TraP4 *dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
1.120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2.240 g ae/ha	4	0	0	3.8	2.5	0-5
4.480 g ae/ha	4	0	0	14.3	1.5	12-15
TraP8 *dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
1.120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2.240 g ae/ha	4	0	0	9.0	1.2	8-10
4.480 g ae/ha	4	0	0	11.3	2.5	10-15
TraP23 *dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
1.120 g ae/ha	4	0	0	4.5	3.3	0-8
2.240 g ae/ha	4	0	0	7.5	2.9	5-10
4.480 g ae/ha	4	0	0	15.0	0.0	15
TraP5 *dgt-28*	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
1.120 g ae/ha	4	0	0	1.3	2.5	0-5
2.240 g ae/ha	4	0	0	9.0	2.0	8-12
4.480 g ae/ha	4	0	0	15.0	2.4	12-18
B104 no transformado	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)

0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
1.120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
2.240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4.480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

[00330] La línea de pDAB107665 que no fue tolerante bajo condiciones de campo no demostró tolerancia al glifosato y es por tanto consistente con las observaciones de campo (los datos no se muestran). Con excepción de la línea previamente mencionada, todas las réplicas que fueron tratadas con glifosato de las líneas no fueron sensibles al glifosato. Por lo tanto, los datos demuestran heredabilidad a una población homogénea de maíz *dgt-28* de una manera mendeliana. La expresión de la proteína DGT-28 por medio de un ELISA estándar demostró un rango de medias de expresión de proteína de 27.5-65.8 ng/cm^2 a lo largo de eventos de una sola copia que eran tolerantes al glifosato. Los datos demuestran proteínas funcionales y estabilidad de la proteína DGT-28 a lo largo de las generaciones.

Ejemplo 12: Tolerancia **al herbicida post-emergente uso de glifosato como marcador seleccionable**

[00331] Como se describió anteriormente, plantas T_0 transformadas fueron movidas de cultivo de tejidos y aclimatadas en el invernadero. Los eventos probados contenían *dgt-28* ligado a los péptidos de transporte del cloroplasto TraP5, TraP8 y TraP23. Se demostró que estas plantas T_0 proporcionaban robusta tolerancia hasta a 4480 g ae/ha de glifosato, y las plantas no transformadas fueron controladas con glifosato a concentración tan baja como 280 g ae/ha. Estos datos demuestran que *dgt-28* puede ser utilizado como un marcador seleccionable usando una concentración de glifosato en el rango de 280-4480 g ae/ha.

[00332] Cierta cantidad de semillas de líneas de maíz fijas que contienen el transgén *dgt-28* son incluidas en una cantidad de semillas de maíz no transformadas. Las semillas son plantadas y se les permite crecer hasta la etapa de desarrollo V1-V3, momento en el que las plántulas son rociadas con una dosis seleccionante de glifosato en el rango de 280-4480 g ae/ha. Después de 7-10 días, las plantas sensibles y resistentes son contadas, y la cantidad de plantas tolerantes al glifosato muestra correlación con el número original de semillas transgénicas que contienen el transgén *dgt-28* que son plantadas.

Ejemplo 13: Acumulación de maíz *dgt-28*

[00333] La proteína AAD-1 se usa como el marcador seleccionable en maíz transformado *dgt-28* para propósitos de investigación. El gen *aad-1* también puede ser utilizado como una característica de tolerancia a herbicidas en el maíz para proporcionar una tolerancia robusta 2,4-D hasta a una aplicación V8 en un cultivo. Cuatro eventos de las construcciones pDAB107663 (TraP4::*dgt-28*), pDAB107664 (TraP8::*dgt-28*) y pDAB107666 (TraP5::*dgt-28*) fueron caracterizados para la tolerancia de una aplicación de una mezcla en tanque de glifosato y 2,4-D. El estudio de caracterización fue completado con semillas F_1 bajo condiciones de invernadero. Las aplicaciones se hicieron en un rociador automático como se describió anteriormente a las siguientes tasas: 1120-2240 g ae/ha de glifosato (seleccionador para el gen *dgt-28*), 1120-2240 g ae/ha de 2,4-D (seleccionador para el gen *aad-1*), o una mezcla en tanque de los dos herbicidas a las tasas descritas. Las plantas fueron evaluadas 7 y 14 días después del tratamiento. Los resultados del rocío para aplicaciones de herbicidas a 2240 g ae/ha se muestran en la **Tabla 20.**

[00334] **Tabla 20.** Respuesta de maíz F_1 *aad-1* y *dgt-28* rociados con 2240 g ae/ha de 2,4-D, glifosato y una combinación en tanque de los dos herbicidas 14 días después del tratamiento.

	2240 g ae/ha de 2,4-D		2240 g ae/ha de glifosato		2240 g ae/ha de 2,4-D + 2240 g ae/ha de glifosato	
Evento F_1	% promedio de daños	Desv. Est.	% promedio de daños	Desv. Est.	% promedio de daños	Desv. Est.
107663[3]-012.AJ001	5.0	4.1	3.8	4.8	8.8	3.0
107663[3]-029.AJ001	2.5	5.0	1.3	2.5	5.0	5.8
107663[3]-027.AJ001	2.5	2.9	11.8	2.9	13.8	2.5
107663[3]-011.AJ001	3.8	2.5	11.5	1.0	12.8	1.5
B104	27.5	17.7	100.0	0.0	100.0	0.0

[00335] Los resultados confirman que *dgt-28* puede ser acumulado exitosamente con *aad-1*, incrementando así el espectro de herbicidas que pueden ser aplicados al cultivo en cuestión (glifosato + ácidos fenoxiacéticos para *dgt-28* y *aad-1*, respectivamente). En producción de cultivos donde existen hierbas de hojas anchas difíciles de controlar o biotipos de hierbas resistentes, la

acumulación puede usarse como un modo de controlar hierbas y proteger el cultivo en cuestión. Características adicionales de entrada o salida también pueden acumularse con el gen *dgt-28* en el maíz y otras plantas.

Ejemplo 14: Transformación de otros cultivos

[00336] Cultivos adicionales son transformadas usando técnicas conocidas. Para transformación de centeno por medio de *Agrobacterium*, *ver* p.e., Popelka JC, Xu J, Altpeter F., "Generación de centeno con bajo número de copias de transgén después de transferencia biolística de genes y producción de plantas (Secale cereale L.) de centeno transgénico instantáneamente libre de marcadores", Transgenic Res. 2003 Oct; 12(5):587-96.). Para transformación de sorgo por medio de *Agrobacterium*, *ver*, p.e., Zhao *et. al.*, "Transformación de sorgo por medio de agrobacterium", Plant Mol Biol. 2000 Dic;44(6):789-98. Para transformación de cebada por medio de *Agrobacterium*, *ver*, p.e., Tingay *et. al.*, "Transformación de cebada por medio de agrobacterium tumefaciens", The Plant Journal, (1997) 11:1369—1376. Para transformación de trigo por medio de *Agrobacterium*, *ver*, p.e., Cheng *et. al.*, "Transformación genética de trigo por medio de agrobacterium tumefaciens", Plant Physiol. 1997 Nov;115(3):971-980. Para transformación de arroz por medio de *Agrobacterium*, *ver*, p.e., Hiei *et. al.*, "Transformación de arroz por medio de agrobacterium tumefaciens", Plant Mol Biol. 1997 Sep;35(1-2):205-18. Cada una de las referencias anteriores está incorporada aquí por esta referencia completamente.

[00337] Otras técnicas de transformación (no con *Agrobacterium*) son usadas para transformar *dgt*-28, *dgt*-32, o *dgt*-33, por ejemplo, en el maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum* spp.), arroz (*Oryza* spp. y *Zizania* spp.), cebada (*Hordeum* spp.), algodón (*Abroma augusta* y *Gossypium* spp.), frijol de soya (*Glycine max*), remolacha azucarera y común (*Beta* spp.), caña de azúcar (*Arenga pinnata*), tomate (*Lycopersicon esculentum* y otras spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* y otras spp., y *Cyphomandra betacea*), papa (*Solanum tuberosum*), batata (*Ipomoea batatas*), centeno (*Secale* spp.), chiles (*Capsicum annuum*, *chinense*, y *frutescens*), lechuga (*Lactuca sativa*, *perennis*, y *pulchella*), col (*Brassica* spp.), apio (*Apium graveolens*), berenjena (*Solanum melongena*), cacahuate (*Arachis hypogea*), sorgo (*Sorghum* spp.), alfalfa (*Medicago sativa*), zanahoria (*Daucus carota*), frijoles (*Phaseolus* spp y otros géneros), avena (*Avena sativa* y *strigosa*), chícharos (*Pisum*, *Vigna*, y *Tetragonolobus* spp.), girasol (*Helianthus annuus*), calabaza (*Cucurbita* spp.), pepino

(*Cucumis sativa*). Tabaco (*Nicotiana spp.*), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), césped (*Lolium, Agrostis, Poa, Cynodon,* y otros géneros), trébol (*Trifolium*), arvejas (*Vicia*).

[00338] La resistencia al glifosato conferida por *dgt-28, dgt-32* y *dgt-33* aumenta la aplicabilidad de herbicidas de glifosato para su uso en temporada en muchos sistemas caducifolios y perennes de explotación de madera. Las especies madereras resistentes a herbicidas de glifosato aumentan la flexibilidad en el uso de estos herbicidas desde el aire sin preocuparse por daños. Por lo tanto, *dgt-28, dgt-32* y *dgt-33* son transformados a las especies madereras: aliso (*Alnus* spp.), fresno (*Fraxinus* spp.), especies de álamos y chopos (*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.).

[00339] La resistencia a herbicidas de glifosato aumenta la aplicabilidad de herbicidas de glifosato para el control selectivo de hierbas en especies ornamentales y frutales. Así, *dgt-28, Dgt-32* y/o *dgt-33* son transformados en las especies ornamentales y frutales: rosa (*Rosa spp.*), evónimo (*Euonymus spp.*), petunia (*Petunia spp.*), begonia (*Begonia spp.*), rododendro (*Rhododendron spp.*), manzana silvestre o manzana (*Malus spp.*), pera (*Pyrus spp.*), durazno (*Prunus spp.*), y caléndula (*Tagetes spp.*).

Ejemplo 15: Combinación con otros rasgos genéticos

[00340] Los cultivos transgénicos resistentes a insectos (RI) comprenden principalmente variedades de maíz, soja y algodón presentes en Norteamérica y su uso se está extendiendo a otros puntos del planeta. Varias empresas productoras de semillas han desarrollado productos transgénicos comerciales que combinan características de resistencia a insectos y tolerancia a los herbicidas, incluyendo rasgos de *Bacillus thuringiensis* (p. ej., toxinas Bt citadas en el listado de la página Web lifesci.sussex.ac.uk, 2006), rasgos de resistencia a insectos sin toxinas Bt y alguno o todos los rasgos de tolerancia a herbicidas mencionados anteriormente. La capacidad de controlar varios tipos de plagas a través de características RI es un valioso concepto comercial. No obstante, la conveniencia de este concepto se verá limitada si el control de malezas y el control de insectos son independientes entre sí.

[00341] A las mutaciones *dgt-28*, *dgt*-31 o *dgt*-32, por sí mismas o en combinación con uno o más rasgos adicionales de tolerancia a herbicidas, se insertan uno o varios rasgos agronómicos adicionales (como resistencia a insectos, resistencia a hongos o tolerancia al estrés y otros) (*ver*

www.isb.vt.edu), bien sea mediante la mejora convencional o de manera conjunta dentro de un proceso de transformación completamente nuevo. El rasgo o rasgos resistentes a insectos se combinan con *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32, o *dgt*-33. Tras obtener una secuencia de codificación de un rasgo RI, se añaden elementos de expresión génica (p. ej. promotor, intrón, 3'UTR, etc.) y se hace una inserción molecular de *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32, o *dgt*-33 al rasgo RI, recurriendo a métodos de ADN recombinante.

[00342] Los rasgos RI incluyen: Cry1F (Patentes EUA Nos. 5,126,133; 5,188,960; 5,691,308; 6,096,708; 6,573,240 y 6,737,273), Cry1A(c) (Patentes EUA Nos. 6,114,138; 5,710,020; 6,251,656 y 6,229,004), Cry1F y Cry1A(c) como triple inserción de *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32 o *dgt*-33, Cry34Ab(1) (Patentes EUA Nos. 7,323,556; 7,897,342; 7,888,495; 7,875,430; 7,932,033; 7,956,246; 6,340,593), Cry35 Ab(1) (Patentes EUA Nos. 6,340,593; 7,323,556; 7,897,342; 7,888,495; 7,875,430; 7,932,033; 7,956,246), y/o Cry35Ab(1) y Cry 34Ab(1) como triple inserción de *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32 y/o *dgt*-33.

[00343] Algunos de los beneficios incluyen un mejor control de malezas, aportado por las mutaciones *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32, o *dgt*-33 y descrito en ejemplos anteriores, junto con la capacidad de manejar plagas de insectos y/u otros problemas agronómicos. Las plantas que contienen tales rasgos combinados con *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32, y/o o *dgt*-33 ofrecen un completo paquete agronómico de cosechas de mejor calidad y la capacidad de controlar de manera flexible y económica cualquier cantidad de problemas agronómicos. Los rasgos combinados de resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas pueden aplicarse en la mayoría de cultivos de horticultura, ornamentales y forestales.

[00344] La combinación de *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32, o *dgt*-33 y la correspondiente tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos alcanzadas por varios genes resistentes a insectos, Bt o no Bt, puede aplicarse a todas las especies de cultivos enumeradas en este documento. El uso en dichos cultivos de alguno de los herbicidas comerciales que aquí se mencionan es posible gracias a la transformación de *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32, o *dgt*-33 y la inserción del rasgo correspondiente de TH o RI, bien sea a través de métodos convencionales de mejora o de la ingeniería genética. Las tasas específicas de aplicación de herbicidas que contengan los compuestos químicos mencionados se establecen a partir de las etiquetas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Crop Protection Reference) o similar, compilaciones en línea de etiquetas (p. ej., cdms.net/manuf/manuf.asp) o

cualquier guía comercial o académica de cuidado de cultivos, tal como la guía Crop Protection Guide de Agriliance (2005).

Ejemplo 16: Rasgo DGT combinado con un rasgo AAD en cualquier cultivo

[00345] Al combinar un rasgo *dgt* con un rasgo *aad* (p. ej., *aad-1*, descrito en la Patente EUA 7,838,733; o *aad-12*, descrito en la Publicación de Patentes Internacionales del PCT No. WO 2007/053482 A2), mediante la mejora convencional o de manera conjunta dentro de un proceso de transformación completamente nuevo, se mejoran la eficacia del control de maleza, la flexibilidad, y la capacidad para manejar cambios en la maleza y el desarrollo de resistencia a herbicidas.

[00346] La transformación de los cultivos mediante el uso de *aad*-1 permite que el productor aplique herbicidas de ariloxialcanoicos de manera selectiva en cultivos de plantas monocotiledóneas. Dichos cultivos tendrán un mayor margen de seguridad en cuanto a la exposición a fenoxi auxina. Adicionalmente, los herbicidas de tipo fenoxi-auxina pueden aplicarse selectivamente en cultivos de plantas dicotiledóneas transformadas con *aad-1*. La transformación de los cultivos mediante el uso de *aad-12* permite que el productor aplique herbicidas de tipo pyridyloxy auxina y ariloxialcanoicos de manera selectiva en cultivos de plantas dicotiledóneas para controlar las especies de maleza. Al *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32, o *dgt*-33 con los rasgos *aad-1* o *aad-12* es posible ofrecer a los productores un rango más amplio de herbicidas para el control de malezas. Además, el uso de combinaciones de herbicidas implica mayor flexibilidad al tratar la resistencia a los herbicidas de varias especies de maleza.

[00347] Una planta de la especie monocotiledónea o dicotiledónea en la que se han insertado rasgos *dgt* y *aad* tendrá las siguientes opciones para el control de malezas:

[00348] A. Aplicación de glifosato a una tasa estándar de tratamiento postemergencia (420 a 2160 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1120 g ae/ha) para el control de la mayoría de las especies de maleza gramíneas y de hoja ancha. Los rasgos *dgt* pueden permitir tolerancia a estas tasas de aplicación de glifosato. Para el control de malezas de hoja ancha resistentes al glifosato como la *Conyza canadensis* o malezas difíciles de controlar con glifosato (p. ej. *Commelina* spp), se aplican 280 a 2240 g ae/ha (p. ej., 560 a1120 g ae/ha) de 2,4-D de forma secuencial, mezclado en tanques o como premezcla con glifosato para mayor control. Los rasgos *aad*-1 y *aad*-12 proporcionan tolerancia al 2,4-D. Además, el *aad*-12 tolera herbicidas de tipo pyridyloxy auxina tales como triclopyr y fluroxypyr. Los herbicidas de tipo pyridyloxy auxina se aplican para controlar malezas

resistentes al glifosato como la *Conyza canadensis* y la *Commelina* spp. En el caso de triclopyr, las tasas de aplicación suelen oscilar entre 70 y 1120 g ae/ha, por ejemplo, 140 a 420 g ae/ha. En el caso de fluroxypyr, las tasas de aplicación suelen oscilar entre 35 y 560 g ae/ha, por ejemplo, 70 a 280 g ae/ha.

[00349] B. Aplicación de glifosato a una tasa estándar de tratamiento postemergencia (420 a 2160 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1120 g ae/ha) para el control de la mayoría de las especies de maleza gramíneas y de hoja ancha. Para controlar especies de malezas gramíneas resistentes al glifosato como la *Lolium rigidum* o *Eleusine indica,* se aplican de 10 a 200 g ae/ha (p. ej., de 20 a 100 g ae/ha) de quizalofop de forma secuencial, mezclado en tanques o como premezcla con glifosato para un control eficaz. El *aad*-1 proporciona tolerancia al quizalofop. La inserción del rasgo *aad*-1 junto con *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32, o *dgt*-33 en especies de cultivo da como resultado plantas tolerantes a los herbicidas descritos anteriormente.

[00350] C. El glifosato es eficaz para el control de especies de malezas gramíneas además de las especies de hoja ancha. La inserción de *aad-1* y *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32, o *dgt*-33 permite la aplicación de tasas de glifosato eficaces para el tratamiento de gramíneas (105 a 840 g ae/ha, por ejemplo, 210 a 420 g ae/ha). Posteriormente se aplica 2,4-D (280 a 2240 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1120 g ae/ha) de forma secuencial, mezclado en tanques o como premezcla con tasas eficaces de glifosato para el tratamiento de gramíneas, con el fin de garantizar el nivel necesario de control de malezas de hoja ancha. Para un mejor control de malezas gramíneas y/o para retrasar la formación de malezas resistentes al glifosato se utiliza un herbicida AOPP como quizalofop en preparación 10 a 200 g ae/ha (por ejemplo, 20 a100 g ae/ha y 20 a 35 g ae/ha). La baja tasa de glifosato también proporciona algunos beneficios para el control de malezas de hoja ancha, aunque la fuente principal de control proviene del 2,4-D.

[00351] D. De manera similar, la inserción de rasgos *aad-12* y *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32, o *dgt*-33 permite la aplicación de tasas eficaces de glifosato para el tratamiento de gramíneas (105 a 840 g ae/ha, por ejemplo, 210 a 420 g ae/ha). Posteriormente se aplica 2,4-D (280 a 2240 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1120 g ae/ha) de forma secuencial, mezclado en tanques o como premezcla con tasas de glifosato eficaces para el tratamiento de gramíneas para garantizar el nivel necesario de control de malezas de hoja ancha. Los herbicidas de triclopyr y fluroxypyr usados en los niveles señalados anteriormente también son componentes aceptables del programa de tratamiento. La baja

tasa de glifosato proporciona asimismo algunos beneficios para el control de malezas de hoja ancha, aunque la fuente principal de control proviene del 2,4-D, triclopyr o fluroxypyr.

[00352] La transformación del rasgo *aad*-12 en los cultivos facilita la utilización de uno o más herbicidas comerciales de ariloxi auxina, solos o combinados, de forma secuencial o independiente. De manera similar, el rasgo *aad-1* facilita la utilización de uno o más herbicidas comerciales de tipo fenoxi auxina, solos o combinados, de forma secuencial o independiente, con uno o varios herbicidas comerciales de tipo AOPP. La combinación de cualquiera de estos rasgos con los rasgos *dgt*-28, *dgt*-31, *dgt*-32, o *dgt*-33 permite un mejor tratamiento de las especies de maleza. Las tasas específicas de aplicación de herbicidas que contengan estos compuestos químicos se establecen a partir de las etiquetas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Crop Protection Reference) o similar, compilaciones en línea de etiquetas (p. ej. cdms.net/manuf/manuf.asp) o cualquier guía comercial o académica de cuidado de cultivos, tal como la guía Crop Protection Guide de Agriliance (2005).

Ejemplo 17: *R*rasgo DGT apilado con rasgo *AHAS* en cualquier cultivo

[00353] Los rasgos que codifican la tolerancia a los herbicidas de tipo imidazolinona (*AHAS*) se encuentran presentes actualmente en varios cultivos de Norteamérica, entre los que se incluyen maíz, arroz, girasol y trigo. Se han estado desarrollando otros cultivos tolerantes a la imidazolinona (p. ej. algodón y remolacha azucarera. Actualmente se están utilizando varios herbicidas de tipo imidazolinona (p. ej., imazamox, imazethapyr, imazaquin e imazapic) en varios cultivos tradicionales. La inserción de rasgos de tolerancia a la imidazolinona como el rasgo *AHAS* ha facilitado el uso de imazethapyr, imazamox y el imazapyr no selectivo. Hasta el momento, los cultivos tolerantes a herbicidas de tipo imidazolinona tienen la ventaja de ser no-transgénicos. Este tipo de compuestos tiene también una actividad residual significativa en el suelo, por lo que el control de malezas va más allá del período de aplicación, a diferencia del glifosato o compuestos basados en glufosinatos. No obstante, el rango de malezas controladas a través de los herbicidas de tipo imidazolinona no es tan amplio como aquel del glifosato (Agriliance, 2003). Adicionalmente, los herbicidas de tipo imidazolinona actúan de una forma (inhibición de acetolactato sintasa, ALS) a la que varias malezas han creado resistencia (Heap I (2004). Encuesta internacional de malezas resistentes a herbicidas, disponible en www.weedscience.com).

[00354] Al insertar *dgt-28, dgt-31, dgt-32 o dgt-33* con un rasgo de tolerancia a la imidazolinona, mediante la mejora convencional o de manera conjunta como un proceso de transformación completamente nuevo, se mejoran la eficacia del control de maleza, la flexibilidad, y la capacidad para manejar cambios en la maleza y el desarrollo de resistencia a los herbicidas.

[00355] Una planta de la especie monocotiledónea o dicotiledónea en la que se han insertado un rasgo *dgt* y un rasgo de tolerancia a la imidazolinona tendrá las siguientes opciones para el control de malezas:

[00356] A. Aplicación de imazethafyr a una tasa estándar de tratamiento postemergencia (35 a 280 g ae/ha, por ejemplo, 70 a 140 g ae/ha) para el control de varias especies de maleza gramíneas y de hoja ancha.

i) Las malezas de hoja ancha resistentes al inhibidor de ALS como el *Amaranthus rudis, Ambrosia trifida, Chenopodium album* (entre otras, Heap, 2004), se controlan mezclando glifosato en tanques a 420 a 2160 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1120 g ae/ha.

ii) Las especies de hoja ancha inherentemente más tolerantes a los herbicidas de tipo imidazolinona como la *Ipomoea spp.* pueden controlarse mezclando glifosato en tanques en preparaciones de 420 a 2160 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1120 g ae/ha.

iii) Las especies de hoja ancha resistentes al inhibidor de ALS como el *Sorghum halepense* and *Lolium* spp. pueden controlarse mezclando glifosato en tanques en preparaciones de 420 a 2160 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1120 g ae/ha.

iv) Las especies de hoja ancha inherentemente tolerantes (p. ej., *Agropyron repens*) pueden controlarse mezclando glifosato en tanques en preparaciones de 420-2160 g ae/ha, por ejemplo, 560 a 1120 g ae/ha.

[00357] La transformación del *dgt*-28, *dgt-28, dgt-31, dgt-32*, o *dgt-33* y su combinación con cualquier rasgo de tolerancia a la imidazolinona, mediante la mejora convencional o la ingeniería genética facilita la utilización de alguno de los herbicidas comerciales de tipo imidazolinona o glifosato, solos o en varias combinaciones. Las tasas específicas de aplicación de herbicidas que contengan estos químicos se establecen a partir de las etiquetas de herbicidas compiladas en el libro CPR (Crop Protection Reference) o similar, compilaciones en línea de etiquetas (p. ej. cdms.net/manuf/manuf.asp) o cualquier guía comercial o académica de cuidado de cultivos, tal como la guía Crop Protection Guide de Agriliance (2005).

Ejemplo 18: Transformación de la soja

[00358] La soja transgénica *(Glycine max)* que contiene un transgénico *dgt*-28 integrado de forma estable se genera a través de una transformación mediada por *Agrobacterium* de explantes de cotiledones de soya. Se utiliza una cepa desarmada de *Agrobacterium* que lleva un vector binario que contiene un *dgt-28* funcional para iniciar la transformación.

[00359] La transformación mediada por *Agrobacterium* se lleva a cabo mediante el uso de un procedimiento de medio nudo de cotiledón de Zeng *et al*. (Zeng P., Vadnais D.A., Zhang Z., Polacco J.C., (2004), *Plant Cell Rep.*, 22(7): 478-482). En pocas palabras, las semillas de soja (cv. Maverick) germinan en los medios basales y los nudos de cotiledones se aíslan y se infectan con *Agrobacterium.* La iniciación de los brotes, la elongación de los brotes y los medios de enraizamiento se complementan con cefotaxima, vancomicina y timentin para la eliminación de *Agrobacterium*. La selección a través de un herbicida se emplea para inhibir el crecimiento de los brotes no transformados. Los brotes seleccionados se transfieren a medio de enraizamiento para el desarrollo de la raíz y su posterior transferencia a una mezcla de tierra para la aclimatación de las plántulas.

[00360] Transformantes putativos. Se transfieren al invernadero las plántulas revisadas, se permite que se aclimaten y luego se realiza el pintado de hojas con un herbicida para reconfirmar la tolerancia. Se realiza un procedimiento de muestreo y de análisis molecular de estas plantas putativas T_0 con el fin de confirmar la presencia del marcador herbicida seleccionable como también la presencia del transgénico *dgt-28*. Se permite que las plantas T_0 se auto fertilicen en el invernadero para producir semillas T_1.

[00361] Se puede usar un segundo método de transformación de la soja para producir plantas transgénicas de soja adicionales. Se utiliza una cepa desarmada de *Agrobacterium* que lleva un vector binario que contiene un *dgt-28* funcional para iniciar la transformación.

[00362] La transformación mediada por *Agrobacterium* se lleva a cabo mediante el uso de un procedimiento de media-semilla de Paz et al., (Paz M., Martinez J., Kalvig A., Fonger T., and Wang K., (2005) *Plant Cell Rep.,* 25: 206-213). Durante un periodo breve, las semillas maduras de soja se esterilizan durante la noche con gas de cloro y se las embebe con H_20 estéril veinte horas antes de la transformación de las plantas mediada por *Agrobacterium.* Las semillas se cortan por la mitad con un corte longitudinal a lo largo del hilo para separar la semilla y retirar la cubierta de la semilla. El eje embrionario se escinde y los brotes/capullos axiales se eliminan

del nodo cotiledonar. Los explantes de media semilla resultantes son infectados con *Agrobacterium.* La iniciación de los brotes, la elongación de los brotes y los medios de enraizamiento se complementan con cefotaxima, vancomicina y timentin para la eliminación de *Agrobacterium*. La selección a través de un herbicida se emplea para inhibir el crecimiento de los brotes no transformados. Los brotes seleccionados se transfieren a medio de enraizamiento para el desarrollo de la raíz y su posterior transferencia a una mezcla de tierra para la aclimatación de las plántulas.

[00363] Se realiza un procedimiento de muestreo y de análisis molecular de estas plantas putativas T_0 con el fin de confirmar la presencia del marcador herbicida seleccionable como también la presencia del transgénico *dgt-28*. Se permite que las plantas T_0 se auto fertilicen en el invernadero para producir semillas T_1.

[00364] Confirmación de la heredabilidad del *dgt-28* a la generación T*1.* La heredabilidad de la proteína *dgt-28* en la generación T_1 se evaluó en una de dos maneras. El primer método incluye la siembra de semillas T_1 en los medios “Metro-Mix” y la aplicación de 411 g ae/ha IGNITE™ 280 SL en plantas germinadas en la primera fase trifoliada de crecimiento. El segundo método consistió en homogeneizar semilla por un total de 8 repeticiones utilizando un cojinete de bolas y un moledor tipo “genogrinder”. Luego se usaron pruebas de tira de ELISA de la proteína PAT para detectar eventos hereditarios ya que el marcador de elección se encontraba en el mismo plásmido que el *dgt-28*. En cualquiera de los métodos si se determinó que una sola planta era tolerante al glufosinato o se detectó con la prueba de tira de ELISA para PAT, se consideró que el evento demostró la heredabilidad para la generación T_1.

[00365] Un total de cinco constructos fueron revisados con relación a la heredabilidad tal como se describió anteriormente. Los plásmidos con contenido de dgt-28 vincularon con TraP4, TraP8 y TraP23. Los eventos que cruzaron a través de los constructos demostraron un 68% de la heredabilidad de la proteína PAT :: DGT-28 a la generación T_1.

[00366] Tolerancia a herbicidas post-emergencia en soja T_1 posterior transformada por dgt-28. Las semillas de eventos T_1 que se determinaron como heredables mediante los métodos de selección descritos anteriormente se sembraron en medios “Metro-Mix” bajo condiciones de invernadero. Las plantas se cultivaron hasta que la primera trifoliada se expandiera completamente y se las trató con 411 g ea / ha IGNITE™ 280 SL para la selección del gen *pat* tal como se describió previamente. A las plantas resistentes provenientes de cada evento se les dio

identificadores únicos y se tomaron muestras para análisis de cigosidad del gen *dgt-28*. Los datos sobre cigosidad se utilizaron para asignar réplicas de 2 hemicigotos y 2 homocigotos para cada tasa de glifosato aplicado, permitiéndose un total de 4 réplicas por tratamiento cuando se tenían en existencia suficientes plantas. Estas plantas se compararon con "wildtype Petite havana tobacco". Todas las plantas fueron sometidas a rociado mediante un pulverizador de carril fijado en 187 L/ ha. Las plantas se rociaron dentro de un rango de 560-4480 g ea/ha de sal dimetilamina (DMA) DURANGO ™. Todas las aplicaciones se formularon en agua con la adición de 2% w/v de sulfato de amonio (AMS). Las plantas se evaluaron a los 7 y 14 días después del tratamiento. Se asignó una calificación de daño a las plantas con respecto a su retraso en el crecimiento global visual, la clorosis y la necrosis. La generación T_1 se constituye en un factor de segregación, por lo que se espera alguna respuesta variable debido a diferencias en cigosidad.

[00367] Tabla 21. Los resultados del rociado demuestran a los 14 días después del tratamiento la tolerancia robusta hasta 4480 g ae/ha de glifosato de al menos un evento dgt-28 por constructo caracterizado. Todos los eventos representativos de copia única de los constructos proporcionan una tolerancia de hasta 4480 g ae/ha en comparación con el control negativo Maverick.

pDAB107543 (TraP4::*dgt-28*)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	4	0	33.8	7.5	25-40
1120 g ae/ha	2	2	0	25.0	11.5	15-35
2240 g ae/ha	2	2	0	17.5	2.9	15-20
4480 g ae/ha	0	2	2	33.8	13.1	20-45
pDAB107545 (TraP8::*dgt-28*)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0

560 g ae/ha	4	0	0	1.5	1.0	0-2
1120 g ae/ha	4	0	0	2.8	1.5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	5.0	2.4	2-8
4480 g ae/ha	4	0	0	9.5	1.9	8-12
pDAB107548 (TraP4::*dgt-28*)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1.8	2.4	0-5
1120 g ae/ha	4	0	0	2.8	1.5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	3.5	1.7	2-5
4480 g ae/ha	4	0	0	8.8	3.0	5-12
pDAB107553 (TraP23::*dgt-28*)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	5.0	0.0	5
1120 g ae/ha	4	0	0	9.0	1.2	8-10
2240 g ae/ha	4	0	0	10.5	1.0	10-12
4480 g ae/ha	4	0	0	16.5	1.7	15-18
Maverick (control neg.)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	82.5	12.6	70-100
1120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

[00368] Protección de dgt-28 contra las tasas elevadas de glifosato en la generación T_2. Una prueba de progenie en 45 plantas se llevó a cabo en dos a cinco líneas T_2 *de dgt-28* por constructo. Las líneas homocigóticas se eligieron en base a los análisis cigosidad completados en la generación anterior. Se plantaron las semillas tal como se describió previamente. Las plantas se rociaron con 411 g ea/ha de IGNITE 280 SL para la selección del marcador seleccionable PAT tal como se ha descrito previamente. Después de 3 días después del tratamiento, se contaron las plantas resistentes y las sensibles.

[00369] Para constructos que contienen TraP4 vinculado con *dgt-28* (pDAB107543 y pDAB107548), nueve de las doce líneas puestas a prueba no segregaron, confirmando así la presencia de líneas homogéneas en la generación T_2. Las líneas que contienen TraP8 vinculado con *dgt-28* (pDAB107545) mostraron que dos de las cuatro líneas no tenían segregantes y se demostró la herencia mendeliana a través de al menos dos generaciones de *dgt-28* en la soja. Se tomaron muestras de tejido de las plantas resistentes y la proteína DGT-28 fue cuantificada por métodos estándar de ELISA. Los datos demostraron un rango promedio de proteína DGT-28 de 32,8 a 107,5 ng/cm^2 para las líneas $T_{2\ no}$ segregantes puestas a prueba. Las líneas del constructo pDAB107553 (TraP23::*dgt-28*) no fueron seleccionadas previamente con glufosinato, y la respuesta a la dosis de glifosato se utilizó tanto como prueba de homogeneidad y tolerancia a las altas tasas de glifosato. Réplicas de las líneas del constructo pDAB107553 fueron tolerantes a tasas que se encuentran en un rango que va desde 560 hasta 4480 g ae/ha de glifosato, y por lo tanto se confirmaron como una población homogénea y heredable por al menos dos generaciones.

[00370] Tasas de DURANGO DMA que van desde 560 a 4480 g ae/ha de glifosato se aplicaron a la soja trifoliada 2-3 tal como se ha descrito previamente. Los datos visualmente recogidos sobre daños a los 14 días después del tratamiento confirmaron los resultados de tolerancia que se demostraron en la generación T_1

[00371] **Tabla 22.** Los datos demuestran una tolerancia robusta del tabaco sometido a *dgt-28* en niveles de hasta 3360 g ae/ha de glifosato a lo lardo de dos generaciones, en comparación con el control no transformado.

pDAB107543 (TraP4::*dgt-28*)	% Daño	% Daño

Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0		0.0	0.0
560 g ae/ha	4	0	0		10.0	0.0
1120 g ae/ha	4	0	0		10.0	4.4
2240 g ae/ha	4	0	0		13.0	2.4
4480 g ae/ha	0	4	0		15.5	4.1
pDAB107545 (TraP8::*dgt-28*)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	2.8	1.5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	5.0	0.0	5
4480 g ae/ha	4	0	0	10.0	0.0	10
pDAB107548 (TraP4::*dgt-28*)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	10.0	0.0	10
pDAB107553 (TraP23::*dgt-28*)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	-	-	-	-	-	-

560 g ae/ha	-	-	-	-	-	-
1120 g ae/ha	-	-	-	-	-	-
2240 g ae/ha	-	-	-	-	-	-
4480 g ae/ha	-	-	-	-	-	-
Maverick (control neg.)	% Daño			% Daño		
Application Rate	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	77.5	15.0	70-100
1120 g ae/ha	0	0	4	97.5	2.9	95-100
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

Ejemplo 19 Transformación de arroz con *dgt-28*

[00372] En un método ejemplar, el arroz transgénico (*Oryza sativa*) que contiene un *dgt-28* integrado de forma estable se genera a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* de las semillas esterilizadas de arroz. Se utiliza una cepa desarmada de *Agrobacterium* que lleva un vector binario que contiene un dgt-28 para iniciar la transformación.

[00373] Los medios de cultivo se ajustan a un pH de 5,8 con M KOH 1 M y se solidifican con 2,5 g/l de Phytagel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los callos embriogénicos se cultivan en platos petri de 100 x 20 mm que contenían 30 ml de medio semisólido. Las plántulas de arroz se cultivan en un medio de 50 ml en cajas MAGENTA. Las suspensiones celulares se mantienen en matraces cónico de 125 ml que conitenen 35 ml de medio líquido y que rotan 125 revolucione por minuto. La inducción y el mantenimiento de cultivos embriogénicos se producen en un ambiente de oscuridad a 25-26 °C, y la regeneración de las plantas y del cultivo de plantas enteras se lleva a cabo en habitaciones iluminadas con un fotoperíodo de 16-h (Zhang et al. 1996).

[00374] La inducción y el mantenimiento de los callos embriogénicos se realiza en un medio basal NB modificado, tal como se ha descrito anteriormente (Li *et al.* 1993), en el que los medios se adapta para contener 500 mg/l de glutamina. Los cultivos en suspensión son iniciados y mantenidos en medio líquido SZ (Zhang *et al.* 1998) con la inclusión de 30 g/L de sacarosa en

lugar de la maltosa. El medio osmótico (NBO) consiste en medio NB con la adición de 0,256 M tanto de manitol como de sorbitol. Los callos resistentes a los herbicidas se seleccionan en un medio NB suplementado con el agente herbicida de elección que sea apropiado durante 3-4 semanas. La pre-regeneración se lleva a cabo en un medio (PRH50) que consiste en un medio NB con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1 mg/l de ácido a-naftalenacético (NAA), 5 mg / l de ácido abscísico (ABA) y el herbicida de elección por 1 semana. La regeneración de plántulas después del cultivo en medio de regeneración (RNH50) que comprende un medio NB que contiene 2,4-D, 0,5 mg / l, de NAA, y herbicida de elección hasta putativamente los brotes transgénicos se regeneren. Los brotes se transfieren a un medio de enraizamiento con sales basales Murashige y Skoog de potencia media y vitaminas B% de Gambor, todo esto suplementado con 1% de sacarosa y herbicida de elección.

[00375] Las semillas maduras desecadas de *Oryza sativa* L. japónica cv. Taipéi 309 se esterilizan tal como se describe en Zhang et al. 1996. Los tejidos embriogénicos se inducen mediante el cultivo de las semillas de arroz maduras estériles sobre un medio NB en la oscuridad. El callo primario de aproximadamente 1 mm de diámetro, se retira del escutelo y se utiliza para iniciar la suspensión celular en medio líquido SZ. Luego, las suspensiones se mantienen tal como se describe en Zhang 1996. Los tejidos embriogénicos derivados de la suspensión se retiran del cultivo líquido en un periodo de 3 a 5 días después del subcultivo previo y se colocan en un medio osmótico NBO para formar un círculo de cerca de 2,5 cm de diámetro en un plato de Petri y se cultivaron durante 4 horas antes del bombardeo. Dieciséis a veinte horas después del bombardeo, los tejidos se transfieren de un medio NBO a un medio de NBH50 elegido, asegurándose que la superficie bombardeada se coloque hacia arriba, y se incube en la oscuridad durante 14 a 17 días. El callo recién formado se separa entonces de los explantes bombardeados originales y se coloca cerca en el mismo medio. Después de un periodo adicional de 8 a 12 días, se puede identificar visualmente un callo relativamente compacto y opaco, y se lo transfiere a un pre- medio de regeneración PRH50 durante 7 días en un ámbito de oscuridad. El callo en crecimiento, que se hace más compactos y opaco, se lleva luego a un sub-cultivo en un medio de regeneración RNH50 durante un período de 14-21 días bajo un régimen de foto-período de 16 horas por día. Los brotes regenerados se transfieren a cajas MAGENTA que contenían medio ½ MSH50. Varias plantas se regeneran a partir de un solo explante y se consideran como hermanos y son tratados como una línea de plantas independientes. Una planta se califica como positiva

para el gen *dgt-28* si produce raíces gruesas, blancas y crece vigorosamente en el medio ½ MSH50. Una vez que las plántulas alcanzan la parte superior de las cajas MAGENTA, se transfieren a la tierra en un contenedor de 6 cm por bajo un ámbito de 100% de humedad durante una semana, y luego se mueven a una cámara de crecimiento con un período de luz 14 horas por día a 30° C y en la oscuridad a 21°C durante 2-3 semanas antes del su trasplante a macetas de 13 cm en el invernadero. Las semillas se recogen y se secan a 37° C durante una semana antes de su almacenamiento a 4° C.

[00376] Análisis T_0 de arroz *dgt-28.* Los transformantes del arroz trasplantado obtenidos vía transformación del *Agrobacterium* se trasplantaron a los medios y fueron aclimatación a condiciones de invernadero. Se tomaron muestras de todas las plantas para la detección por PCR de *dgt-28* y los resultados mostraron veintidós eventos PCR positivos para pDAB110827 (TraP8::dgt-28) y un mínimo de dieciséis eventos PCR positivos para pDAB110828 (TraP23::dgt-28). El análisis Southern para dgt-28 de los eventos positivos de PCR demostró eventos simples (1-2 copias) para ambas constructos. La extracción de proteínas de los eventos T_0 seleccionados demostró que la extracción de proteína *dgt-28* se encuentra en rangos que van desde niveles bajos de detección a 130 ng/cm2. Los eventos T_0 eventos seleccionados a partir del constructo pDAB110828 fueron tratados con 2240 g de DMA ae/ha de DURANGO™ tal como se ha descrito previamente y se evaluaron a los 7 y a los 14 días después del tratamiento. Los datos demostraron tolerancia robusta a la tasa de glifosato que se aplicó. Se permitió que todas las plantas que se comprobaron como positivas para PCR produjeran semillas T_1 para una caracterización adicional.

[00377] La heredabilidad de dgt-28 en el arroz. Una prueba de progenie en 100 plantas se llevó a cabo en cuatro líneas T_1 de *dgt-28* del constructo pDAB110827 que contienen el péptido de tránsito al cloroplasto TraP8. Las semillas fueron plantadas en macetas con medios. Todas las plantas se rociaron con 560 g ae/ha DURANGO DMA™ para la selección del gen de *dgt-28* tal como se ha descrito previamente. Después de transcurridos 7 días desde el tratamiento, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Dos de las cuatro líneas puestas a prueba para cada constructo se segregaron como un único locus, el razo mendeliano rasgo dominante (3R:1S) tal como se determina mediante el análisis de Chi cuadrado. *Dgt-28* es un gen hereditario resistente al glifosato en múltiples especies.

[00378] Tolerancia a herbicidas en post-emergencia en arroz T_1 transformado por *dgt-28*. A las plantas T_1 resistentes de cada evento utilizadas en la prueba de progenie se les dio identificadores únicos y se tomaron muestras para análisis de cigosidad del gen *dgt-28*. Los datos de cigosidad se utilizaron para asignar réplicas de 2 hemicigotos y 2 homocigotos para cada tasa de glifosato aplicado permitiendo un total de 4 réplicas por tratamiento. Estas plantas se compararon frente al arroz "wildtype kitaake". Todas las plantas se rociaron con un rociador de carril fijado en un nivel 187 L/ha. Las plantas se rociaron desde un rango de 560-2240 g ae ha con DURANGO DMA™. Todas las aplicaciones se formularon en agua con la adición de 2% de sulfato de amonio (AMS) w/v. Las plantas se evaluaron tanto a los 7 días como a los 14 días después del tratamiento. Se asignó a las plantas una calificación de daño con respecto al retraso del crecimiento global visual, a la clorosis y a la necrosis. La generación T1 se encuentra en segregación, por lo que se espera alguna respuesta variable debido a la diferencia en cigosidad.

[00379] Los resultados del rociado demuestran a 7 DAT (días después del tratamiento) se detecta daño vegetativo mínimo a tasas elevadas de glifosato (no se muestran los datos).

[00380] **Tabla 23**. Los datos de daños que se pueden percibir visualmente a los 14 días después del tratamiento demuestran que menos del 15% de daño promedio que se puede percibir visualmente con niveles de hasta 2240 g ea/ha de glifosato.

TraP8::*dgt-28* Evento 1	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
TraP8::*dgt-28* Evento 2	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	3.8	4.8	0-10
1120 g ae/ha	4	0	0	12.0	3.6	8-15

2240 g ae/ha	4	0	0	15.0	6.0	8-20
Control no transformado	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Promedio	Desv. Estándar	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	81.3	2.5	80-85
1120 g ae/ha	0	0	4	95.0	5.8	90-100
2240 g ae/ha	0	0	4	96.3	4.8	90-100

[00381] Se evaluó la detección de proteína de DGT-28 para las réplicas provenientes de todas las cuatro líneas T_1 de pDAB110827 sometidas a pruebas. Los datos demostraron que la proteína DGT-28 promedio oscila entre 20 a 82 ng/cm^2 y entre 21-209 ng/cm^2 para réplicas de hemicigotos y homocigotos respectivamente. Estos resultados demostraron la extracción estable de la proteína a la generación T_1 y la tolerancia que tiene el arroz *dgt-28* de hasta 2240 g ea/ha al glifosato después de una aplicación de 560 g ae/ha de glifosato usado para la selección.

Ejemplo 20: Transformación de césped con *dgt-28*

[00382] La transformación genética del transgénico *dgt-28* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en "creeping bentgrass" (césped de estación fría) se logra a través del callo embriogénico iniciado a partir de las semillas (cv. Penn-A-4). Véase "Efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated turfgrass (*Agrostis stolonifera* L) transformation" (Luo *et. al.*, 2004).

[00383] Las células de callo se infectan con una cepa *A. tumefaciens* que alberga un vector súper-binario que contiene un transgénico resistente a herbicidas accionado (por ejemplo, *dgt-28, dgt-31, dgt-32,* o *dgt-33*) por un promotor monocotiledóneo específico. La eficiencia global de transformación estable varía en un rango del 18% al 45%. El análisis "Southern blot" y el análisis genético confirman la integración del transgénico en el genoma del bentgrass y la transmisión normal y la expresión estable del transgénico en la generación T_1. Todos los eventos de transformación independientes portan una a tres copias del transgénico, y una mayoría (60-65%) contienen una sola copia del transgénico, sin reordenamientos aparentes.

[00384] Se descascaran las semillas maduras con papel de lija y se esteriliza la superficie en 10% (v/v) de lavandina Clorox™ (6% de hipoclorito de sodio) más 0,2% (v/v) de Tween 20 (Polisorbato 20) mediante agitación vigorosa durante 90 minutos. Después de enjuagar cinco veces en agua destilada estéril, las semillas se colocan sobre medio de inducción de callo (sales basales MS y vitaminas, 30 g/L de sacarosa, 500 mg/l de hidrolizado de caseína, 6,6 mg/l de 3,6-dicloro-o-anísico (dicamba), 0,5 mg/l de 6-bencil amino purina (BAP) y 2 g/l de Phytagel. El pH del medio se ajusta a 5,7 antes de tratamiento en autoclave a 120° C durante 20 minutos).

[00385] Las placas de cultivo que contienen explantes preparados de semillas se mantienen en la oscuridad a temperatura ambiente durante 6 semanas. Los callos embriogénicos se selecciona visualmente y se sub-cultivan en un medio fresco de inducción de callos en la oscuridad, a temperatura ambiente durante 1 semana antes del co-cultivo.

[00386] Un día antes de la infección mediada por *Agrobacterium*, los callos embriogénicos se dividen en piezas de a 2 milímetros y se colocan en un medio de inducción de callo que contiene 100 uM de acetosiringona. Una alícuota de 10 ul de suspensión de *Agrobacterium* (OD = 1,0 a 660 nm) que alberga el transgénico *dgt-28, dgt-31, dgt-32,* o *dgt-33* se aplica luego a cada pieza de los callos, ello es seguido por de 3 días de co-cultivo en la oscuridad a 25° C. Los callos se transfieren y se cultivaron durante 2 semanas en un medio de inducción de callos más 125 mg/l de Cefotaxima y 250 mg/l de Carbenicilina para inhibir el crecimiento bacteriano.

[00387] La selección de plantas transgénicas se produce cuando los callos se trasladan a un medio de inducción de callos que contiene 250 mg/l de cefotaxima y un herbicida. El material de callo se mantiene en este medio durante 8 semanas con un intervalo de selección de sub-cultivo de 3 semanas. El proceso de selección se realiza a temperatura ambiente en la oscuridad.

[00388] Para la regeneración de plantas, los eventos de callos proliferantes resistentes a los herbicidas se trasladan primero a un medio de regeneración (medio basal MS, 30 g/l de sacarosa, 100 mg/l de mioinositol, 1 mg/l de BAP y 2 g/l de Phytagel) suplementado con cefotaxima, y un herbicida para la selección. Estos callos se mantienen en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 semana y luego se trasladan a la luz durante 2-3 semanas para desarrollar brotes.

[00389] Los brotes desarrollados se separan y se transfirieren a un medio de regeneración sin hormonas, que contiene un herbicida y cefotaxima para promover el crecimiento

de la raíz mientras se mantiene la presión de selección y se suprime cualquier célula de *Agrobacterium* que reste. Las plántulas con raíces bien desarrolladas (en 3 a 5 semanas) se transfieren luego a la tierra y se desarrollaron ya sea en el invernadero o en el campo abierto de cultivo.

[00390] Las plantas transgénicas se mantienen al aire libre en un vivero de contención (por 3 a 6 meses) hasta el solsticio de invierno en diciembre. Las plantas que vernalizaron se transfieren al invernadero y se mantienen a 25° C bajo un régimen de 16/8 horas de fotoperiodo y rodeadas por plantas control no transgénicas que físicamente aíslan a las plantas transgénicas de otras fuentes de polen. Las plantas transgénicas comienzan a florecer entre 3 a 4 semanas después de haber sido trasladadas de nuevo al invernadero. Estas plantas se fertilizan de forma cruzada con el polen de las plantas de control circundantes. Las semillas recolectadas de cada planta transgénica individual se hacen germinar en el suelo a 25° C, y las plantas T_1 se cultivan en el invernadero para su posterior análisis.

[00391] Otras tipos de césped se transforman con *dgt-28* de acuerdo con el protocolo descrito, incluyendo los siguientes, annual meadowgrass (pastito de invierno) (*Poa annua*), Bahiagrass,(pasto bahía) Bentgrass (agrostis), Bermudagrass (pasto de Bermudas), Bluegrass (pasto azul), Bluestems, Brachiaria, Bromegrass, Browntop bent (*Agrostis capillaries*), Buffalograss, Canary Grass, Carpetgrass, Centipedegrass, Chewings fescue (*Festuca rubra commutate*), Crabgrass, Creeping bent (*Agrostis stolonifera*), Crested hairgrass (*Koeleria macrantha*), Dallisgrass, Fescue, Festolium, Hard/sheeps fescue (*Festuca ovina*), Gramagrass, Indiangrass, Johnsongrass, Lovegrass, mezclas (Equina, Pastizales, etc.), Native Grasses, Orchardgrass, Perennial ryegrass (*Lolium perenne*), Redtop, Rescuegrass, annual and perennial Ryegrass, Slender creeping red fescue (*Festuca rubra trichophylla*), Smooth-stalked meadowgrass (*Poa pratensis*), St. Augustine, Strong creeping red fescue (*Festuca rubra rubra*), Sudangrass, Switchgrass, Tall fescue (*Festuca arundinacea*), Tufted hairgrass (*Deschampsia caespitosa*), Turfgrasses, Wheatgrass, y Zoysiagrass

Ejemplo 21: Transformación de Brassica spp. con *rasgo DGT*

[00392] El gen *dgt-28, dgt-31, dgt-32,* o *dgt-33* confieren resistencia al glifosato se utiliza para transformar la *Brassica napus* de la variedad. Nexera™ 710 con transformación mediada por *Agrobacterium.*

[00393] Las semillas de *Brassica napus* se esterilizan superficialmente con lavandina comercial al 10% durante 10 minutos y se enjuagan 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas se colocan luego sobre medio basal MS de concentración media (Murashige and Skoog, 1962) y se mantienen bajo régimen de crecimiento que establece una temperatura de 2 º C, y un fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas oscuridad.

[00394] Los segmentos de hipocótilos (de 3 a 5 mm) se extirpan de las plántulas que tiene de 5 a 7 días de edad y se colocan en un medio de inducción de callo K1D1 (medio MS con 1 mg/l de cinetina y 1 mg/ l 2,4-D) durante 3 días como pre-tratamiento. Los segmentos se transfieren después a una placa petri y se tratan con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un constructo que incluye *dgt-28*. El *Agrobacterium tumefaciens* se cultiva durante la noche a 28º C en la oscuridad en un agitador a 150 revoluciones por minuto y, posteriormente, se vuelve a suspender en el medio de cultivo.

[00395] Después de un tratamiento de 30 minutos con *Agrobacterium* de los segmentos de hipocótilos, estos segmentos se colocan de nuevo en el medio de inducción de callos durante 3 días. Después del co-cultivo, los segmentos se colocan en K1D1TC (medio de inducción de callos que contiene 250 mg/l Carbenicilina y 300 mg/l Timentin) durante una semana de recuperación. Alternativamente, los segmentos se colocan directamente en el medio de selección K1D1H1 (por encima del medio con un herbicida). La Carbenicilina y el Timentin son los antibióticos que se utilizan para matar el *Agrobacterium.* El agente de selección permite el crecimiento de las células transformadas.

[00396] Muestras de callos aislados de eventos independientes se ponen a prueba mediante PCR. Las muestras que dan positivo para la presencia de *dgt-28, dgt-31, dgt-32*, o *dgt-33* se confirman y se las avanza a los medios de regeneración. Los segmentos de hipocótilos callosos se colocan, en ese momento, en B3Z1H1 (medio MS, 3 mg/l bencil amino purina, 1 mg/l zeatina, 0,5 g/l de MES [ácido 2-morfolino etano sulfónico], 5 mg/l de nitrato de plata, herbicida para selección, Carbenicilina y Timentin), un medio de regeneración. Después de 3 semanas los brotes comienzan regeneración. Segmentos de hipocótilos, junto con los brotes se transfieren a B3Z1H3 medio (medio MS, 3 mg / l bencilamino purina, 1 mg / l Zeatina, 0,5 g / l de MES [ácido 2-morfolino etano sulfónico], 5 mg/l nitrato de plata, herbicida de selección, Carbenicilina y Timentin) durante otras 3 semanas.

[00397] Los brotes se cortaron de los segmentos de hipocótilos y se transfirieron a un medio para la elongación de brotes MESH10 (MS, 0,5 gm/l de MES, herbicida de selección, Carbenicilina, Timentin) durante 2 a 4 semanas. Los brotes alargados se cultivan para la inducción de raíces en MSI.1 (MS con 0,1 mg/l de ácido indolbutírico). Una vez que las plantas establecen un sistema de raíces, las plantas se trasplantaron a la tierra. Las plantas se aclimatan en condiciones ambientales controladas en un Conviron™ durante 1 a 2 semanas antes de su transferencia al invernadero.

[00398] Las plantas T_0 transformadas se auto-polinizaron en el invernadero para obtener semillas T_1. La progenie de las plantas T_0 y T_1 se rociaron con una gama de concentraciones de herbicida de glifosato para establecer el nivel de protección otorgada por el gen *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, o *dgt-33*.

Ejemplo 22: Transformación de tabaco con *dgt-28*

[00399] Se transforman trozos de hojas de tabaco (cv. Petit Havana) usando *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el transgén *dgt-28*. Se inoculan colonias simples que contienen el plásmido que contiene el transgén *dgt-28* en 4 ml de medio de YEP que contiene espectinomicina (50 µg/ml) y estreptomicina (125 µg/ml), y se incuban durante toda la noche a 28 °C en un agitador a 190 rpm. Los 4 ml de cultivo de semilla luego se usan para inocular un cultivo de 25 ml del mismo medio en un matraz de Erlenmeyer desconcertado. Este cultivo se incuba a 28 °C agitando a 190 rpm hasta que alcanza un OD_{600} de ~1.2. Luego se coloca una suspensión de 10 ml de *Agrobacterium* en platos estériles Petri™ de 60 x 20 mm.

[00400] Se remojan trozos de hojas recién cortados (0.5 cm^2) de plantas cultivadas asépticamente en un medio MS (Phytotechnology Labs, Shawnee Mission, KS) con 30 g/l de sucrosa en bandejas PhytaTrays™ (Sigma, St. Louis, MO) en *Agrobacterium* cultivadas durante toda la noche por algunos minutos, se secan en papel de filtro estéril y luego se colocan en el mismo medio, agregando 1 mg/l de ácido indolacético y 1 mg/l de 6-benzilamino purina. Tres días más tarde, los trozos de hojas cocultivados con *Agrobacterium* que contiene el transgén *dgt-28* se transfieren al mismo medio con 5 mg/l de Basta™ y 250 mg/l de cefotaxima.

[00401] Después de tres semanas, las plántulas individuales T_0 se transfieren al medio MS con 10 mg/l de Basta™ y 250 mg/l de cefotaxima otras tres semanas antes del transplante al suelo y la transferencia al invernadero. Algunas plantas T_0 (identificadas utilizando los

protocolos de análisis molecular antes descritos) se dejan autopolinizar y se recogen las semillas de las cápsulas cuando se han secado por completo. Se analizan las plántulas T_1 para comprobar la cigosidad y la expresión del gen reportero (como se describe a continuación) y se identifican plantas seleccionadas que contienen el transgén *dgt-28.*

[00402] Las plantas luego se trasladaron al invernadero lavando el agar de las raíces, transplantándolas a tierra en macetas cuadradas de 13.75 cm que se colocaron en bolsas Ziploc® (SC Johnson & Son, Inc.), con agua corriente en el fondo de la bolsa. Estas se colocaron en un invernadero de 30 °C con luz solar indirecta durante una semana. Después de 3 a 7 días, se abrió la bolsa; las plantas se fertilizaron y se dejaron crecer en la bolsa abierta hasta que las plantas se aclimataron al invernadero; en ese momento, se retiró la bolsa. Las plantas se cultivaron en condiciones de invernadero cálido normales (27 °C durante el día, 24 °C durante la noche, 16 horas de día, luz mínima natural y suplementaria = 1200 $\mu E/m^2s^1$).

[00403] Antes de la propagación, se tomaron muestras de las plantas T_0 a fin de realizar análisis de DNA para determinar el número de copia de *dgt-28* insertado por medio de PCR en tiempo real. El tejido nuevo se colocó en tubos y se liofilizó a 4 ºC durante dos días. Después de que el tejido se secó por completo, se colocó una perla de tungsteno (Valenite) en el tubo y las muestras se sometieron a molido en seco durante un minuto usando un molinillo Kelco. Luego se siguió el procedimiento DNeasy™ estándar de aislamiento de DNA (Qiagen, DNeasy 69109). Luego se goteó una parte proporcional del DNA extraído con Pico Green (Molecular Probes P7589); se observó la indicación en el fluorómetro (BioTek™) con estándares conocidos para obtener la concentración en ng/µl. Se usaron en total 100 ng de DNA como plantilla. La reacción PCR se llevó a cabo en el termociclador 9700 Geneamp™ (Applied Biosystems), sometiendo las muestras a 94 °C durante 3 minutos minutes y 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 64 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto y 45 segundos, seguidos de 72 °C durante 10 minutos. Los productos del PCR se analizaron por medio de electroforesis con un gel de agarosa al 1 %, goteado con EtBr y confirmado por medio de transferencia Southern.

[00404] Se regeneraron y trasladaron al invernadero entre cinco y nueve eventos positivos de PCR con 1 a 3 copias de gen *dgt-28* de 3 constructos que contenían diferentes secuencias de péptido de tránsito al cloroplasto (TraP4, TraP8 y TraP23).

[00405] Se tomaron muestras de todas las plantas con PCR positivo para cuantificación de la proteína DGT-28 por medio de un ELISA estándar. Se detectó la proteína DGT-28 en todas

las plantas con PCR positivo y se observó una tendencia al aumento en la concentración de proteína con un aumento en el número de copias de *dgt-28.*

[00406] *Heredabilidad de aad-12 (v1) en el tabaco.* Se efectuó una prueba de progenie de 100 plantas en cinco líneas T_1 de *dgt-28* por constructo. Los constructos contenían una de las siguientes secuencias de péptido de tránsito al cloroplasto: TraP4, TraP8 o TraP23. Las semillas se estratificaron, germinaron y transplantaron de modo muy similar al procedimiento con *Arabidopsis* antes descrito, con la excepción de que no se retiraron las plantas nulas por medio de la selección inicial antes del transplante. Todas las plantas luego se pulverizaron con 280 g ae/ha IGNITE 280 SL para la selección del marcador seleccionable *pat* como se describió anteriormente. Tres días después del tratamiento, se contaron las plantas resistentes y sensibles.

[00407] Cuatro de las cinco líneas probadas para cada constructo segregaron como una sola característica dominante Mendeliana de locus único (3R:1S), determinada por un análisis de chi cuadrada. El *dgt-28* es un gen de resistencia al glifosato heredable en varias especies.

[00408] Tolerancia al herbicida post-emergente en tabaco T_1 transformado por dgt-28. Se asignaron identificadores únicos a las plantas T_1 resistentes de cada evento utilizadas en la prueba de progenie, y se hicieron muestras para análisis de cigosidad del gen *dgt-28*. Los datos de cigosidad se usaron para asignar dos réplicas hemicigotas y dos réplicas homocigotas para cada tasa de glifosato aplicada, lo cual permite obtener un total de cuatro réplicas por tratamiento. Estas plantas se compararon con el tabaco Petite Havana de tipo silvestre. Todas las plantas se pulverizaron con un pulverizador de surco ajustado en 187 l/ha. Las plantas luego se pulverizaron con una tasa de 560-4480 g ae/ha con DURANGO DMA™. Todas las aplicaciones incluyeron agua en la fórmula, con la adición de sulfato de amonio al 2,0% m/v (AMS). Las plantas fueron evaluadas 7 y 14 días después del tratamiento. Se asignó a las plantas una categoría de daño respecto del retraso en el crecimiento, clorosis y necrosis generales. La generación T_1 se está segregando, por lo que se espera cierta variación en las respuestas debido a la diferencia en cigosidad.

[00409] Los resultados de las pulverizaciones demuestran que a los 7 días después del tratamiento se detectaron lesiones vegetativas mínimas ante tasas elevadas de glifosato (los datos no se muestran). Tras 14 días después del tratamiento, los datos de lesiones obtenidos visualmente demuestran un aumento de las lesiones con eventos de copia única del constructo

que contiene la secuencia TraP4 en comparación con los eventos de copia única de los constructos con TraP8 y TraP23. **Tabla 24.**

[00410] **Tabla 24**. Con una tasa de 2240 g ae/ha de glifosato, se demostró un daño medio del 37.5 % con el evento que contenía TraP4, mientras que los eventos que contenían TraP8 y TraP23 demostraron un daño medio del 9.3 % y el 9.5 % respectivamente.

TraP4::*dgt-28* (pDAB107543)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	2	2	0	18.0	8.1	10-25
1120 g ae/ha	1	3	0	24.5	4.9	18-30
2240 g ae/ha	0	3	1	37.5	6.5	30-45
4480 g ae/ha	0	2	2	42.5	2.9	40-45
TraP8::*dgt-28* (pDAB107545)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	3.3	3.9	0-8
1120 g ae/ha	4	0	0	6.5	1.7	5-8
2240 g ae/ha	4	0	0	9.3	3.0	5-12
4480 g ae/ha	2	2	0	17.5	6.5	10-25
TraP23::*dgt-28* (pDAB107553)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	10.0	1.6	8-12
1120 g ae/ha	4	0	0	8.8	3.0	5-12

2240 g ae/ha	4	0	0	9.5	4.2	5-15
4480 g ae/ha	4	0	0	15.8	1.5	15-18
Petite havana	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	85.0	4.1	80-90
1120 g ae/ha	0	0	4	91.3	2.5	90-95
2240 g ae/ha	0	0	4	94.5	3.3	90-98
4480 g ae/ha	0	0	4	98.3	2.4	95-100

[00411] Estos resultados demostraron tolerancia del *dgt-28* hasta 4480 g ae/ha de glifosato, así como diferencias en la tolerancia proporcionada por las secuencias de péptido de tránsito al cloroplasto vinculadas con el gen *dgt-28*.

[00412] Protección del *dgt-28* contra tasas de glifosato elevadas en la generación T_2. Se efectuó una prueba de progenie de 25 plantas en dos a tres líneas de T_2 de *dgt-28* por constructo. Se seleccionaron líneas homocigóticas conforme a los análisis de cigosidad efectuados en la generación anterior. Las semillas se estratificaron, cultivaron y transplantaron como se describió anteriormente. Todas las plantas luego se pulverizaron con 280 g ae/ha IGNITE 280 SL para la selección del marcador seleccionable *pat* como se describió anteriormente. Tres días después del tratamiento, se contaron las plantas resistentes y sensibles. Ninguna de las líneas probadas para cada constructo se segregaron, lo que confirma las líneas homogéneas en la generación T_2 y demuestra la herencia mendeliana a través de por lo menos de dos generaciones de *dgt-28* en el tabaco.

[00413] Se aplicaron tasas de DURANGO DMA™ de entre 420 y 3360 g ae/ha de glifosato a 2 a 3 hojas de tabaco como se describió anteriormente. Los datos de daño observados visualmente 14 días después del tratamiento confirmaron los resultados de tolerancia que se demostraron en la generación T1. Los resultados foliares de líneas de dos copias del constructo que contiene TraP4 demostraron una tolerancia similar a aquella de las líneas de copia única con TraP8 y TraP23 (no se muestran los datos).

[00414] Tabla 25. Las líneas de copia única del constructo que contiene TraP4 con *dgt-28* demostraron un aumento de los daños en comparación con las líneas de constructos que contiene TraP8 y TraP23 con *dgt-28.*

TraP4::*dgt-28* (pDAB107543)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	0	4	0	23.8	4.8	20-30
840 g ae/ha	0	4	0	30.0	4.1	25-35
1680 g ae/ha	0	4	0	35.0	5.8	30-40
3360 g ae/ha	0	4	0	31.3	2.5	30-35
TraP8::*dgt-28* (pDAB107545)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha	4	0	0	2.5	2.9	0-5
1680 g ae/ha	4	0	0	9.3	3.4	5-12
3360 g ae/ha	4	0	0	10.5	1.0	10-12
TraP23::*dgt-28* (pDAB107553)	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha	4	0	0	6.3	2.5	5-10
1680 g ae/ha	4	0	0	10.0	0.0	10
3360 g ae/ha	3	1	0	13.8	4.8	10-20

Petite havana	% Daño			% Daño		
Tasa de aplicación	<20%	20-40%	>40%	Media	Desv. Est.	Rango (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	0	0	4	95.0	0.0	95
840 g ae/ha	0	0	4	98.8	1.0	98-100
1680 g ae/ha	0	0	4	99.5	1.0	98-100
3360 g ae/ha	0	0	4	100	0.0	100

[00415] Los datos demuestran una sólida tolerancia del tabaco *dgt-28* hasta 3360 g ae/ha de glifosato a través de dos generaciones en comparación con el control no transformado.

[00416] Se tomaron muestras de las plantas seleccionadas de cada evento antes de las aplicaciones de glifosato para realizar análisis de la proteína DGT-28 por medio del método DGT-28 ELISA estándar. Los datos demuestran la expresión de proteína DGT-28 media de las líneas únicas (1-2 copias) a través de constructos que van desde 72.8 a 114.5 ng/cm^2. Los datos demuestran que el dgt-28 está expresando proteína en la generación T_2 de tabaco transformado, y los datos de tolerancia confirman la funcionalidad de la proteína DGT-28.

[00417] Acumulación de dgt-28 para aumentar el espectro de herbicidas: Se cruzaron recíprocamente plantas homocigotas *dgt-28* (pDAB107543 y pDAB107545) y *aad-12 v1* (pDAB3278) (para esta última, *véase* PCT/US2006/042133 que se incorpora en el presente por referencia en su totalidad) y se recolectaron semillas F_1. Las semillas F_1 de dos cruzamientos recíprocos de cada gen se estratificaron y 6 réplicas tratadas de cada cruzamiento se trataron con 1120 g ae/ha de glifosato (selectivo para el gen *dgt-2*), 1120 g ae/ha 2,4-D (selectivo para el gen *aad-1*), o una mezcla en el tanque de los dos herbicidas a las tasas descritas. Las plantas fueron evaluadas 14 días después del tratamiento. Los resultados de la pulverización se muestran en la **Tabla 26**.

[00418] **Tabla 26**. Respuesta de F_1 *aad-12* y *dgt-28*

	aad-12* x TraP4::*dgt-28	***aad-12* x TraP8::*dgt-28***	***Petite havana***
Tasa de aplicación	**Tolerancia**		

1120 g ae/ha de 2,4-D	++++	++++	-
1120 g ae/ha de glifosato	++	++	-
1120 g ae/ha de 2,4-D + 1120 g ae/ha de glifosato	++	++	-

[00419] Los resultados confirman que *dgt-28* puede ser acumulado exitosamente con *aad-12 (v1)*, incrementando así el espectro de herbicidas que pueden ser aplicados al cultivo en cuestión (glifosato + ácidos fenoxiacéticos para *dgt-28* y *aad-12*, respectivamente). En producción de cultivos donde existen hierbas de hojas anchas difíciles de controlar o biotipos de hierbas resistentes, la acumulación puede usarse como un modo de controlar hierbas y proteger el cultivo en cuestión. También se podrían acumular rasgos genéticos originales o de cultivo con el gen *dgt-28.*

Ejemplo 23: Resistencia al glifosato en el Trigo

[00420] Producción de vectores binarios que codifican DGT-28. Los vectores binarios que contienen la expresión DGT-28 y cartuchos de selección PAT fueron diseñados y armados usando habilidades y técnicas conocidas comúnmente en el oficio. Cada cartucho de expresión DGT-28 contenía el promotor, región no traducida de 5' y el intrón del gen Ubiquitina (*Ubi*) de *Zea mays* (Toki et al Plant Physiology 1992, 100 1503-1507), seguido por una secuencia de codificación que consiste en uno de cuatro péptidos de tránsito (TraP4, TRAP8, TraP23 o TraP5) fusionados al extremo de 5' de una versión sintética del gen de la sintasa 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (DGT-28), que había sido optimizada en codones para expresión en plantas. El cartucho de expresión DGT-28 terminado con una región no traducida (UTR) de 3' que comprende el terminador transcripcional y el sitio de poliadenilación de un gen de lipasa (*Vp1*) de *Z. mays* (Paek et al Mol Cells 1998 30; 8(3) 336-42). El cartucho de selección PAT compuesto del promotor, la región no traducida de 5' y el intrón del gen Actina (*Act1*) de *Oryza sativa* (McElroy et al *The Plant Cell* 1990 2 (2) 163-171), seguido por una versión sintética del gen transferasa acetil fosfinotricina (PAT) aislado de *Streptomyces viridochromogenes*, que había sido

optimizado en codones para expresión en plantas. El gen PAT codifica una proteína que confiere resistencia a los inhibidores de sintetasa de glutamina que incluyen fosfinotricina, glufosinato y bialafos (Wohlleben et al Gene 1988, 70 (1), 25-37). El cartucho de selección fue terminado con la UTR de 3 'que comprende el terminador de transcripcional y sitios de poliadenilación del gen 35s del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Chenault et al 1993 Plant Physiology 101 (4), 1395-1396).

[00421] El cartucho de selección fue sintetizado por un proveedor de síntesis genética comercial (GeneArt, Life Technologies) y clonado en vector binario habilitado como Puerta de Enlace. Los casetes de expresión DGT-28 fueron sub-clonados en pDONR221. El clon de ENTRADA resultante fue utilizado en una reacción LR Clonasa II (Invitrogen, Life Technologies) con el vector binario habilitado para puerta de enlace codificando el cartucho de expresión fosfinotricina acetil transferasa (PAT). Las colonias de todos los plásmidos reunidos fueron cribadas inicialmente por digestión de restricción de ADN purificado utilizando endonucleasas de restricción obtenidas de New England Biolabs (NEB; Ipswich, MA) y Promega (Promega Corporation, WI). Las preparaciones de ADN plásmido se realizaron utilizando el QIAprep *Spin Miniprep* Kit (Qiagen, Hilden) o el Pure Yield Plasmid Maxiprep System (Promega Corporation, WI), siguiendo las instrucciones de los proveedores. El ADN plasmídico de los clones seleccionados fue secuenciado utilizando el protocolo de secuenciación de ciclo ABI Sanger Sequencing y Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies). Los datos de secuencia fueron reunidos y analizados utilizando el software SEQUENCHER™ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

[00422] Los cuatro clones de expresión binarios resultantes: pDAS000122 (TraP4-DGT28), pDAS000123 (TraP8-DGT28), pDAS000124 (TraP23-DGT28) y pDAS000125 (TraP5-DGT28) fueron cada uno transformado en cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

[00423] La producción de eventos de trigo transgénico con constructo de expresión *dgt-28*. Las plantas de trigo transgénicas que expresan uno de los cuatro constructos de expresión DGT-28 se generaron mediante transformación mediada por *Agrobacterium* utilizando la línea de trigo donante Bobwhite MPB26RH, siguiendo un protocolo similar a Wu et al. Transgenic Research 2008, 17:425-436. Eventos transgénicos T0 putativos fueron seleccionados para tolerancia de fosfinotricina (PPT), el fenotipo conferido por el marcador seleccionable PAT, y

transferidos a suelo. Las plantas T0 fueron cultivadas bajo condiciones de contención en invernadero y se produjeron semillas T1. En total, fueron generados aproximadamente 45 eventos T0 independientes para cada constructo de expresión DGT-28.

[00424] Resistencia a glifosato en eventos de trigo T_0 *dgt-28* del trigo. A Eventos T_0 se les permitió aclimatarse en el invernadero y fueron cultivaron hasta que 2 a 4 horas nuevas y de aspecto normal, emergieron de la fronda (*es decir*, las plantas habían transicionado de cultivo de tejido a condiciones de crecimiento en invernadero). Las plantas fueron cultivadas a 25 °C bajo condiciones de 12 horas de iluminación suplementaria en el invernadero hasta su madurez. Se completó una criba inicial de tolerancia al glifosato y análisis Taqman en plantas T_1 cultivadas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Los datos permitidos para la determinación de eventos T_1 heredables serán caracterizados adicionalmente. Seis copias bajas (1-2 copias) y dos eventos T_1 multi-copia fueron replantados bajo condiciones de invernadero y cultivados hasta la etapa de hoja 3. Las plantas T_1 fueron rociadas con una fórmula comercial de glifosato (Durango DMA™) desde un rango de 420 a 3360 g a.e./ha, lo que es capaz de causar daño significativo a líneas de trigo sin transformar. La adición de sulfato de amonio al 2% peso/volumen fue incluida en la aplicación. Una dosis letal se define como la tasa que causa >75% de lesión al control no transformado MPB26RH Bob White. Se aplicó herbicida.

[00425] En este ejemplo, las aplicaciones de glifosato fueron utilizadas tanto determinar la segregación del gen *dgt-28* en la generación T_1, como para demostrar tolerancia a niveles crecientes de glifosato. La respuesta de las plantas se presenta en términos de escala de lesión visual 21 días después del tratamiento (DAT). Los datos se presentan como un histograma de individuos que exhiben menos de 25% de lesión visual (4), 25% -50% de lesión visual (3), 50% - 75% de lesión visual (2) y lesiones mayores al 75% (1). Se presenta una media aritmética y desviación estándar para cada constructo utilizado para transformación de trigo. También se indica en la última columna el rango de clasificación de respuesta individual para cada tasa y transformación. Trigo no transformado de tipo silvestre (c.v. Bob White MPB26RH) sirvió como un control sensible al glifosato. En la generación T_1 habían disponibles plantas hemicigotas y homocigotas para las pruebas de cada evento, y por lo tanto fueron incluidas para cada tasa de glifosato probada. Las plantas hemocigotas contendrán mitad de la dosis del gen que las plantas

homocigotas, por lo tanto, se puede esperar variabilidad de respuesta aL glifosato en la generación T_1.

[00426] Los resultados de las plantas de trigo T_1 *dgt*-28 demostraron que la tolerancia al glifosato se alcanzó a tasas de hasta 3360 g a.e./ha. con los péptidos de tránsito de cloroplasto TraP4, TraP5, TraP8 y TraP23. **Tabla 27**. Los datos son de un evento T_1 de copia baja, pero son representativos de la población para cada constructo.

[00427] **Tabla 27**. Respuesta de eventos de trigo T_1 *dgt-28* de baja copia al glifosato 21 días después del tratamiento.

TraP4::*dgt-28*	% de lesión				% de lesión		
Tasa de aplicación	<25%	25-50%	50-75%	>75%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
420 g a.e./ha	5	0	0	0	4.00	0.00	4
840 g a.e./ha	6	2	0	0	3.75	0.46	3-4
1680 g a.e./ha	4	2	0	0	3.67	0.52	3-4
3360 g a.e./ha	4	2	0	0	3.67	0.52	3-4
TraP8::*dgt-28*	% de lesión				% de lesión		
Tasa de aplicación	<25%	25-50%	50-75%	>75%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
420 g a.e./ha	5	3	0	0	3.63	0.52	3-4
840 g a.e./ha	3	5	0	0	3.38	0.52	3-4
1680 g a.e./ha	4	3	0	0	3.57	0.53	3-4
3360 g a.e./ha	5	5	0	0	3.50	0.53	3-4
TraP23::*dgt-28*	% de lesión				% de lesión		
Tasa de aplicación	<25%	25-50%	50-75%	>75%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
420 g a.e./ha	9	2	0	0	3.82	0.40	3-4
840 g a.e./ha	8	1	0	0	3.89	0.33	3-4
1680 g a.e./ha	7	5	0	0	3.58	0.0	3-4
3360 g a.e./ha	8	2	0	0	3.80	4.8	3-4

TraP5::*dgt-28*	% de lesión				% de lesión		
Tasa de aplicación	<25%	25-50%	50-75%	>75%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
420 g a.e./ha	5	2	0	0	3.71	0.49	3-4
840 g a.e./ha	4	2	0	0	3.67	0.52	3-4
1680 g a.e./ha	7	3	0	0	3.70	0.48	3-4
3360 g a.e./ha	6	0	0	0	4.00	0.00	3-4
Bobwhite MPB26RH	% de lesión				% de lesión		
Tasa de aplicación	<25%	25-50%	50-75%	>75%	Med	Desv. Est.	Rango (%)
420 g a.e./ha	0	1	1	10	1.25	0.62	1-3
840 g a.e./ha	0	0	0	10	1.00	0.00	1
1680 g a.e./ha	0	0	0	12	1.17	0.58	1-3
3360 g a.e./ha	0	0	0	10	1.00	0.00	1

[00428] 21 días después del tratamiento, las plantas resistentes y sensibles se cuentan para determinar el porcentaje de líneas que se segregaron como una sola característica dominante Mendeliana de locus único (3R:1S), determinada por un análisis de chi cuadrado. **Tabla 28**. Estos datos demuestran que *dgt*-28 es hereditario como un gen robusto de resistencia al glifosato en una especie monocotiledónea.

[00429] Tabla 28. Porcentaje de eventos T_1 *dgt-28* por constructo que demuestre heredabilidad de forma mendeliana en base a una selección de glifosato a tasas que van de 420 a 3360 g e.a./ha.

ID de Constructo	CTP:GOI	% de Eventos T_1 probados que segregaron en un solo locus	% de Eventos T_1 probados que segregaron como dos loci	No. de eventos T_1 probados
pDAS000122	TraP4::*dgt-28*	62.5%	37.5%	8

pDAS000123	TraP8::*dgt-28*	87.5%	12.5%	8
pDAS000124	TraP23::*dgt-28*	12.5%	87.5%	8
pDAS000125	TraP5::*dgt-28*	62.5%	0.0%	8

[00430] Confirmación molecular de plantas transgénicas T_0 para la integración de DGT-28 que codifica T-ADNs. Se extrajo ADN genómico de material de material foliar liofilizado de todas las plantas de trigo T0 putativo. El tejido foliar recién cosechado fue congelado rápidamente en nitrógeno líquido y liofilizado durante 24 h en un Labconco Freezone 4.5® (Labconco, Kansas City, MO) a -40°C y 133 x 10^{-3} mBar de presión. El material liofilizado fue sometido a extracción de ADN utilizando el DNeasy® Plant DNA Extraction Mini kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

[00431] ADN de cada planta T_0 fue probado en busca de presencia-ausencia de cepa de *Agrobacterium tumefaciens* transportado y para el número de copias integrada del DGT-28 que codifica T-ADN. La presencia-ausencia de cepa de *A. tumefaciens* fue realizada usando un ensayo Taqman® qPCR dúplex para amplificar el gen ubiquitina endógeno (iniciadores adelantado e inverso y sonda:

5’ GCGAAGATCCAGGACAAGGA 3’ (SEC ID NO:85; Iniciador adelantado)

5’ CTGCTTACCGGCAAAGATGAG 3’ (SEC ID NO:86; Iniciador inverso)

5’ TTCCCCCGGACCAGCAGCGT 3’ (SEC ID NO:87; Sonda)

desde el genoma del trigo, y VirC desde pTiBo542:

5’ CCGACGAGAAAGACCAGCAA 3’ (SEC ID NO:88; Iniciador adelantado)

5’ CTTAAGTTGTCGATCGGGACTGT 3’ (SEC ID NO:89; Iniciador inverso)

5’ TGAGCCTCTCGTCGCCGATCACAT 3’ (SEC ID NO:90; Sonda).

[00432] El número de copias de T-ADN integradas fue estimado usando un ensayo Taqman® qPCR dúplex siguiendo el procedimiento de Livak y Schmittgen (Methods 2001 25:402-8). El ensayo amplificó el gen puroindolina-b endógeno de copia única (*Pin*b) en el genoma D de trigo hexaploide (Gautier et al Plant Science 2000 153, 81-91):

5’ ATTTTCCATTCACTTGGCCC 3’ (SEC ID NO:91; Iniciador adelantado)

5’ TGCTATCTGGCTCAGCTGC 3’ (SEC ID NO:92; Iniciador inverso)

5’ ATGGTGGAAGGGCGGTTGTGA 3’ (SEC ID NO:93; Sonda)

y una región del promotor Actina (*Act*1) presente en el T-ADN:

5’ CTCCCGCGCACCGATCTG 3’ (SEC ID NO:94; Iniciador adelantado)

5’ CCCGCCCCTCTCCTCTTTC 3’ (SEC ID NO:95; Iniciador inverso)

5' AAGCCGCCTCTCGCCCACCCA 3’ (SEC ID NO:96; Sonda).

[00433] Plantas que no amplificaron un producto desde *VirC* y desde las que los productos correctos fueron amplificados con iniciadores a ubiquitina endógena y promotor actina de arroz fueron clasificados como transgénicas. El número de T-ADN integrados fue estimado a partir de 2ΔΔc(T), de acuerdo con Livak y Schmittgen (Methods 2001 25:402-8). En general, aproximadamente 95% de todas las plantas T0 tenían al menos una copia integrada del T-ADN. **Tabla 29**.

[00434] Tabla 29. Número de plantas T_0 independientes generadas y el número estimado de DGT-28 codificando T-ADN integrados.

Vector	# Plantas T0 independientes examinadas	# Eventos T0 independientes positivos para transgén	# Multi-copia (≥4) eventos T-ADN	# Copia baja (≥3) eventos T-ADN
pDAS000122	45	43	15	28
pDAS000123	44	42	11	31
pDAS000124	45	44	21	23
pDAS000125	46	39	15	24

[00435] Desarrollo de ensayos de cigosidad PCR para seguimiento de herencia de transgén. Las secuencias que flanquean los sitios de integración del ADN-T fueron identificadas por digestión de ADN genómico purificado con ocho endonucleasas de restricción, seguidas de la ligadura de adaptadores de doble cadena específicos a los salientes creados por las endonucleasas de restricción. Después de la ligación del adaptador, se realizó un PCR con un iniciador biotinilado en el extremo de 3' o de 5' del DGT-28 de codificación de T-ADN y un iniciador para cada adaptador. Los productos PCR fueron capturados y purificados en perlas Ampure Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI) (Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter

Company). Se ejecutó luego un PCR anidado y los productos de amplificación fueron secuenciados en Sanger utilizando química BigDye® v3.1 (Applied Biosystems) en una plataforma de electroforesis capilar automatizada ABI3730xl®. El análisis de secuencia ejecutado utilizando el software Sequencher (GeneCodes, Ann Arbor, MI) fue utilizado para generar (donde era posible) una secuencia de consenso. La secuencia de consenso y los solitarios resultantes fueron utilizados como consultas BlastN contra cóntigos de secuencia de estudio de genoma reunido para brazos cromosómicos ordenados por flujo de la variedad de trigo Chinese Spring (www.wheatgenome.org) para determinar los cromosomas en los que se había producido integración del T-ADN y para permitir el diseño de iniciadores específicos al sub-genoma para el desarrollo de ensayos de cigosidad PCR.

[00436] Se desarrollaron dos ensayos PCR para cada evento transgénico, para permitir que la herencia del transgén sea seguida en generaciones subsiguientes. El primer ensayo (en lo sucesivo, denominado PCR salida-salida) fue diseñado para amplificar todo el sitio de integración T-ADN. La amplificación específica al sub-genoma en este ensayo se obtuvo utilizando el PCR salida-salida con iniciadores diseñados para situar la base penúltima (que contenía un enlace fosforotioato) sobre la variación de la secuencia de nucleótidos que distingue el locus objetivo de las copias duplicadas (homólogas y parálogas) del locus en otro lugar en el genoma del trigo. El segundo ensayo (denominado en lo sucesivo PCR entrada-salida) fue diseñado para amplificar desde el T-ADN en la secuencia endógena. Este ensayo utilizó uno de los iniciadores del ensayo PCR salida-salida y un iniciador diseñado para el extremo de 3' o 5' del DGT-28 que codifica T-ADNs. Los iniciadores PCR fueron diseñados para tener entre 18 y 27 nucleótidos de longitud y para tener una temperatura de fusión de 60 a 65°C, óptima 63°C. Los ensayos PCR salida-salida y entrada-salida se realizaron en un volumen de reacción de 25μl con 0.2 mM dNTP, solución tampón 1x PCR Phusion (New England Biolabs), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5U polimerasa ADN Hotstart Phusion (New England Biolabs), 25 ng ADN genómico purificado y 0.4μM de cada iniciador. Las condiciones de ciclado PCR eran de 98°C durante 30 seg., luego (98°C durante 10seg., 65°C durante 20 seg, 72 °C durante 60 seg.) para 40 ciclos. La cigosidad de las plantas transgénicas fue asignada según se muestra en la **Tabla 30**.

[00437] Tabla 30. Eventos transgénicos para los que se desarrollaron eventos de cigosidad PCR y secuencias de iniciador usadas para PCR salida-salida y entrada-salida.

PCR Salida-salida				
Constructo	**Código de evento**	**Iniciador 1 (5'-> 3 ')***	**Iniciador 2 (5'-> 3 ')***	**Tamaño (pb)**
pDAS000122	hh08-6678-2-1	GGTTTGTTGAATCCCTCTGTTGG*T (SEC ID NO:97)	GTGGTCATGACAGTATGATAACAG*G (SEC ID NO:98)	303
pDAS000122	hh08-6678-8-1	GGGTCTGCCCAATGAAGCG*A (SEC ID NO:99)	TCTCGCTTCTCTCATAACACATCGT*G (SEC ID NO:100)	217
pDAS000123	hh08-6729-5-1	GACCTCTCTCACCCTCCTCCT*C (SEC ID NO:101)	CCAAATAATAAGTGAGAGAGGGGCA*T (SEC ID NO:102)	286
pDAS000123	mp45-6739-14-1	TAGTTCCCCTGTCGTGTGCAA*A (SEC ID NO:103)	CAACAGCAGCCTCACCAATCA*C (SEC ID NO:104)	555
pDAS000123	mp45-6739-5-1	CAAGAACGGTGCTCCTTTTTTAA*G (SEC ID NO:105)	AGCCCTTCCTCTGCATCCTT*A (SEC ID NO:106)	440
pDAS000124	yl02-6762-8-1	GGCTGTGTTGCACACAAATAGAG*A (SEC ID NO:107)	CAGCAGCACGGTAGGTAGATTG*T (SEC ID NO:108)	473
pDAS000124	gt19-6752-4-1	CCGATAAGACGGCAACTGATTAA*A (SEC ID NO:109)	AGGCTGGCTTCTAGTGGAAGGA*G (SEC ID NO:110)	215
pDAS000124	hh08-6761-1-1	GGGTTTCCGGCTGGAGAC*G (SEC ID NO:111)	CCAAAAGCAATTTTCGTTATAAGATGC*C (SEC ID NO:112)	302
OlipDAS000124	yl02-6762-6-1	CCAGATAATCTGTGGGCTCCT*G (SEC ID NO:113)	GCAGCAGCTTGCCTTAAGC*A (SEC ID NO:114)	161
pDAS000125	hh08-6780-10-1	TGCTTGTTTCTGTTGTCATCATAGGT*T (SEC ID NO:115)	CATTTGTTGGGTTTCCACGTAC*G (SEC ID NO:116)	145
pDAS000125	hh08-6780-8-1	GAGCGCGGCTAAAGGTCAAAA*C (SEC ID NO:117)	CCGATTTACATGGACTTGATGGAG*T (SEC ID NO:118)	241
PCR Entrada-salida				
pDAS000122	hh08-6678-2-1	GGTTTGTTGAATCCCTCTGTTGG*T (SEC ID NO:119)	GCCGCCTCCAGTGAGTGTTGCTGCTTGTGTA*G (SEC ID NO:120)	732
pDAS000122	hh08-6678-8-1	GGGTCTGCCCAATGAAGCG*A (SEC ID NO:121)	GCCGCCTCCATAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAG*G (SEC ID NO:122)	297
pDAS0001	hh08-6729-5-	GCCGCCTCCAGTGAGT	CCAAATAATAAGTGAG	510

23	1	GTTGCTGCTTGTGTA*G (SEC ID NO:123)	AGAGGGGCA*T (SEC ID NO:124)	
pDAS000123	mp45-6739-14-1	GCCGCCTCCATAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAG*G (SEC ID NO:125)	CAACAGCAGCCTCACCAATCA*C (SEC ID NO:126)	510
pDAS000123	mp45-6739-5-1	GCCGCCTCCATAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAG*G (SEC ID NO:127)	AGCCCTTCCTCTGCATCCTT*A (SEC ID NO:128)	580
pDAS000124	yl02-6762-8-1	GCCGCCTCCATAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAG*G (SEC ID NO:129)	CAGCAGCACGGTAGGTAGATTG*T (SEC ID NO:130)	672
pDAS000124	gt19-6752-4-1	GCCGCCTCCAGTGAGTGTTGCTGCTTGTGTA*G (SEC ID NO:131)	AGGCTGGCTTCTAGTGGAAGGA*G (SEC ID NO:132)	594
pDAS000124	hh08-6761-1-1	GCCGCCTCCATAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAG*G (SEC ID NO:133)	CCAAAAGCAATTTTCGTTATAAGATGC*C (SEC ID NO:134)	528
pDAS000124	yl02-6762-6-1	GCCGCCTCCAGTGAGTGTTGCTGCTTGTGTA*G (SEC ID NO:135)	GCAGCAGCTTGCCTTAAGC*A (SEC ID NO:136)	633
pDAS000125	hh08-6780-10-1	GCCGCCTCCATAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAG*G (SEC ID NO:137)	CATTTGTTGGGTTTCCACGTAC*G (SEC ID NO:138)	280
pDAS000125	hh08-6780-8-1	GCCGCCTCCAGTGAGTGTTGCTGCTTGTGTA*G (SEC ID NO:139)	CCGATTTACATGGACTTGATGGAG*T (SEC ID NO:140)	680

* Indica enlace fosforotioato

[00438] Evaluación fenotípica de plantas transgénicas T_1 para tolerancia al glifosato. Para determinar si eventos transgénicos con constructos de expresión DGT-28 mostraron tolerancia al glifosato, plantas T1 derivadas de los eventos individuales fueron evaluadas fenotípicamente en condiciones de contención de invernadero. Se realizaron dos cribados fenotípicos. En primer cribado (preliminar), eventos transgénicos (con suficiente semilla T_1 para ambos cribados fenotípicos) fueron evaluados en su tolerancia al glufosinato y glifosato para confirmar la expresión DGT-28 y establecer el orden de clasificación para la tolerancia a herbicidas entre eventos. En el segundo cribado (detallado), eventos transgénicos seleccionados

fueron evaluados en tolerancia al glifosato a diferentes tasas de dosis de pulverización para determinar el nivel de tolerancia a herbicida conferido dentro de los eventos y entre constructos de expresión DGT-28.

[00439] Doce semillas T1 por evento seleccionado y tres replicados (12 semillas cada uno) de la línea de trigo donante no transformado MPB26RH Bobwhite se sembraron en macetas de 85 mm y se cultivaron hasta la etapa de 2 hojas bajo condiciones de buen riego a 25°C con iluminación suplementaria proporcionando un fotoperiodo de 12 horas. Las macetas se colocaron en un diseño aleatorio para permitir eliminar los efectos medioambientales durante el análisis de datos. Los eventos transgénicos cribados se enumeran en la **Tabla 31**. En la etapa de 2 hojas, todas las plantas T1 y el primer replicado de 12 plantas de trigo donantes no transformadas fueron pulverizados con glufosinato a una tasa de dosis de 420 g ai/ha. Las plantas fueron inspeccionadas visualmente después de cuatro días y plantas representativas que capturaban el rango de respuestas fenotípicas fueron utilizadas para desarrollar una escala de puntuación de 0 a 6. **Tabla 32**.

[00440] **Tabla 31**. Casos transgénicos probados en la pantalla preliminar.

Entrada	Vector	Código del caso	Número estimado de ADN-T integrado codificando DGT-28*
1	pDAS000122	hh08-6678-6-1	Caso pocas copias
2	pDAS000122	mp45-6696-2-1	Caso pocas copias
3	pDAS000122	hh08-6718-2-1	Caso pocas copias
4	pDAS000122	km51-6686-1-1	Caso pocas copias
5	pDAS000122	mp45-6677-5-1	Caso pocas copias
6	pDAS000122	mp45-6696-4-1	Caso pocas copias
7	pDAS000122	mp45-6711-2-1	Caso pocas copias
8	pDAS000122	mp45-6711-4-1	Caso pocas copias
9	pDAS000122	hh08-6678-7-1	Caso pocas copias
10	pDAS000122	mp45-6711-7-1	Caso pocas copias
11	pDAS000122	mp45-6711-3-1	Caso pocas copias
12	pDAS000122	hh08-6678-2-1	Caso pocas copias
13	pDAS000122	mp45-6711-5-1	Caso pocas copias
14	pDAS000122	mp45-6711-6-1	Caso pocas copias
15	pDAS000122	mp45-6696-1-1	Caso pocas copias
16	pDAS000122	hh08-6678-8-1	Caso pocas copias
17	pDAS000122	gt19-6680-3-1	Caso multicopias
18	pDAS000122	mp45-6711-10-1	Caso multicopias
19	pDAS000122	mp45-6711-31-1	Caso multicopias

20	pDAS000122	yl02-6709-1-1	Caso multicopias
21	pDAS000122	mp45-6711-11-1	Caso multicopias
22	pDAS000123	hh08-6729-6-1	Caso pocas copias
23	pDAS000123	mp45-6739-4-1	Caso pocas copias
24	pDAS000123	gt19-6733-7-1	Caso pocas copias
25	pDAS000123	mp45-6739-7-1	Caso pocas copias
26	pDAS000123	gt19-6733-9-1	Caso pocas copias
27	pDAS000123	gt19-6733-2-1	Caso pocas copias
28	pDAS000123	yl02-6735-5-1	Caso pocas copias
29	pDAS000123	yl02-6735-1-1	Caso pocas copias
30	pDAS000123	hh08-6729-8-1	Caso pocas copias
31	pDAS000123	gt19-6733-5-1	Caso pocas copias
32	pDAS000123	mp45-6739-14-1	Caso pocas copias
33	pDAS000123	mp45-6739-2-1	Caso pocas copias
34	pDAS000123	hh08-6729-5-1	Caso pocas copias
35	pDAS000123	mp45-6739-5-1	Caso pocas copias
36	pDAS000123	hh08-6729-7-1	Caso pocas copias
37	pDAS000123	hh08-6729-9-1	Caso pocas copias
38	pDAS000123	gt19-6733-10-1	Caso pocas copias
39	pDAS000123	gt19-6733-8-1	Caso pocas copias
40	pDAS000123	hh08-6729-3-1	Caso multicopias
41	pDAS000123	mp45-6739-16-1	Caso multicopias
42	pDAS000123	gt19-6733-6-1	Caso multicopias
43	pDAS000123	di01-6745-1-1	Caso multicopias
44	pDAS000123	gt19-6733-1-1	Caso multicopias
45	pDAS000123	mp45-6739-1-1	Caso multicopias
46	pDAS000124	mp45-6756-4-1	Caso pocas copias
47	pDAS000124	yl02-6762-3-1	Caso pocas copias
48	pDAS000124	yl02-6762-11-1	Caso pocas copias
49	pDAS000124	gt19-6752-10-1	Caso pocas copias
50	pDAS000124	gt19-6752-14-1	Caso pocas copias
51	pDAS000124	yl02-6762-4-1	Caso pocas copias
52	pDAS000124	mp45-6756-2-1	Caso pocas copias
53	pDAS000124	mp45-6756-1-1	Caso pocas copias
54	pDAS000124	yl02-6762-8-1	Caso pocas copias
55	pDAS000124	yl02-6762-6-1	Caso pocas copias
56	pDAS000124	gt19-6752-4-1	Caso pocas copias
57	pDAS000124	gt19-6752-23-1	Caso pocas copias
58	pDAS000124	hh08-6761-1-1	Caso pocas copias
59	pDAS000124	hh08-6761-3-1	Caso pocas copias
60	pDAS000124	yl02-6762-1-1	Caso pocas copias
61	pDAS000124	yl02-6762-7-1	Caso pocas copias
62	pDAS000124	gt19-6752-7-1	Caso pocas copias
63	pDAS000124	yl02-6762-12-1	Caso multicopias
64	pDAS000124	gt19-6752-6-1	Caso multicopias

65	pDAS000124	gt19-6752-22-1	Caso multicopias
66	pDAS000124	gt19-6752-24-1	Caso multicopias
67	pDAS000124	gt19-6752-18-1	Caso multicopias
68	pDAS000124	yl02-6762-5-1	Caso multicopias
69	pDAS000125	hh08-6780-9-1	Caso pocas copias
70	pDAS000125	yl02-6781-8-1	Caso pocas copias
71	pDAS000125	hh08-6780-1-1	Caso pocas copias
72	pDAS000125	hh08-6785-3-1	Caso pocas copias
73	pDAS000125	hh08-6780-7-1	Caso pocas copias
74	pDAS000125	hh08-6780-4-1	Caso pocas copias
75	pDAS000125	gt19-6777-2-1	Caso pocas copias
76	pDAS000125	hh08-6785-4-1	Caso pocas copias
77	pDAS000125	yl02-6781-4-1	Caso pocas copias
78	pDAS000125	hh08-6780-16-1	Caso pocas copias
79	pDAS000125	hh08-6780-8-1	Caso pocas copias
80	pDAS000125	hh08-6780-10-1	Caso pocas copias
81	pDAS000125	hh08-6780-11-1	Caso pocas copias
82	pDAS000125	hh08-6780-12-1	Caso pocas copias
83	pDAS000125	hh08-6780-6-1	Caso pocas copias
84	pDAS000125	gt19-6777-5-1	Caso pocas copias
85	pDAS000125	hh08-6785-7-1	Caso pocas copias
86	pDAS000125	hh08-6780-13-1	Caso pocas copias
87	pDAS000125	hh08-6785-1-1	Caso pocas copias
88	pDAS000125	hh08-6785-8-1	Caso multicopias
89	pDAS000125	yl02-6781-1-1	Caso multicopias
90	pDAS000125	hh08-6780-3-1	Caso multicopias
91	pDAS000125	yl02-6781-7-1	Caso multicopias
92	pDAS000125	hh08-6780-15-1	Caso multicopias

*Basado en el ensayo dúplex Taqman® qPCR. Pocas copias y multicopias indica =3 y ≥4 T-DNA integrados, respectivamente.

[00441] Tabla 32. Escala de puntuación utilizada para registrar la respuesta fenotípica al glufosinato a los 4 días de la pulverización.

Puntuación	**Descripción**
0	Germinación retrasada o establecimiento pobre de la planta, excluir de análisis subsecuentes
1	>75% hojas necróticas; cloróticas / marchitas / brotes muertos
2	25-75% hojas necróticas; brote/hojas mayormente cloróticas
3	10-25% hojas necróticas; <50% hojas cloróticas; marchitez moderada; brotes cloróticos menores
4	<10% hojas necróticas, marchitez menor, clorosis menor
5	Puntas de hojas necróticas, planta permanece sana

6	Plana sana

[00442] Cada planta del ensayo fue puntada en relación con la escala de puntuación, con el anotador "ciego" con respecto al genotipo de la planta para eliminar influencias en la puntuación. Cinco días después de la puntuación de glufosinato, todas las plantas T1 y las primeras y segundas réplicas de plantas no transformadas de trigo donantes se pulverizaron con glifosato a una tasa de dosis de 420 g ai / ha. La tercera réplica restante de trigo no transformado (un total de 12 plantas) no fue pulverizada. Las plantas fueron inspeccionadas visualmente a los 7, 14 y 21 días tras la pulverización. Una escala de puntuación que captura la variedad de respuestas fenotípicas fue desarrollada para cada momento y se utilizó para anotar todo. En todo momento, el anotador "ciego" con respecto al genotipo de la planta. La escala de puntuación en el día 7 tras la pulverización de 0 a 7 (**Tabla 33**), y de 1 a 4 a los 14 y 21 días tras la pulverización (**Tabla 34**). La longitud de la planta, el número de tallos y las anormalidades morfológicas también se registraron para cada planta a los 14 días después de la pulverización con glifosato. Las plantas con germinación retrasada o establecimiento pobre fueron excluidas de los análisis posteriores.

[00443] **Tabla 33**. Escala de puntuación utilizada para registrar la respuesta fenotípica al glufosinato a los 7 días de la pulverización.

Puntuación	**Descripción**
0	Planta muerta
1	>75% hojas necróticas; cloróticas / marchitas / brotes muertos
2	50-75% hojas necróticas, clorosis y marchitez severa
3	25-50% hojas necróticas; <50% hojas cloróticas, marchitez moderada
4	10-25% hojas necróticas; <25% hojas cloróticas, marchitez menor
5	<10% hojas necróticas, clorosis menor
6	Puntas de hojas necróticas, planta permanece sana
7	Plana sana

[00444] **Tabla 34**. Escala de puntuación utilizada para registrar la respuesta fenotípica al glufosinato a los 14 y 21 días de la pulverización.

Puntuación	**Descripción**
1	Planta muerta
2	50-75% hojas necróticas, clorosis y marchitez severa, planta muriendo
3	<25% hojas necróticas; <25% hojas necróticas, marchitez menor, signos de crecimiento

4	Plana sana

[00445] El análisis de la respuesta al glufosinato no mostró una clara diferencia fenotípica entre plantas de trigo donantes no transformadas que fueron pulverizadas y plantas donantes no transformadas que no fueron pulverizadas (datos no mostrados) Como consecuencia, la tolerancia de los casos transgénicos a glufosinato no pudo ser evaluada de forma fiable. En contraste, en análisis de la respuesta de glifosato a los 21 días de la pulverización, mostró una diferencia clara del fenotipo entre las plantas donantes no transformadas pulverizadas y las no pulverizadas. **Tabla 35**. Por lo tanto, los análisis para la tolerancia de glifosato entre otros transgénicos se basó en la valoración de las respuestas obtenidas a los 21 días de la pulverización. Se consideró que un caso transgénico mostraba tolerancia a glifosato cuando 4 o más plantas 12 T1 tuvieron un resultado mayor o igual a 3. Este criterio se basó en la expectación de que cada caso segregaría 1:2:1 (homocigiosis presente: hemicigoto: homocigoto ausente) para el transgén en la generación T1 y para permitir casos con expresión DGT28 débil a identificar. Los casos transgénicos fueron ordenados por rango de tolerancia a glifosato observada usando un marcador agregado arbitrario calculado a partir de plantas tolerantes individuales. El marcador agregado fue calculado a través de la puntuación de las respuestas en los días 14 y 24 y la longitud de la planta, el número de tallos y las anormalidades morfológicas registradas el día 14 tras la pulverización.

[00446] Tabla 35. La respuesta fenotípica de las plantas de trigo donantes no transformadas al tratamiento herbicida a los 21 días tras la pulverización.

	Glufosinato pulverizado	**Glyfosato pulverizado**	**Tasa de supervivencia**
Réplica 1	Sí	Sí	10 de 12 muertas/muriendo
Réplica 2	No	Sí	10 de 12 muertas/muriendo
Réplica 3	No	No	12 de 12 sanas

[00447] En total, 67 de los 92 casos transgénicos mostraron evidencias de tolerancia al glifosato. **Tabla 36**. Se estimó que seis casos transgénicos tenían =3 copias integradas del transgén y dos casos transgénicos tenían 4 o más transgenes integrado donde se seleccionó para cada vector de expresión DGT-28 para la inclusión en el segundo (detallado) fenotipo.

[00448] Tabla 36. Rango ordenado respuesta fenotípica de casos transgénicos a tratamiento de glifosato.

Construir	Código del caso	Número de copias ADN-T estimadas	% plantas tolerantes al glifosato	Fenotipo	Marcador global estandarizado*	Seleccionado para pantalla detallada
pDAS000122	mp45-6711-7-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	8.0	Sí
pDAS000124	gt19-6752-4-1	Pocas copias	91.7%	Tolerante	7.3	Sí
pDAS000122	gt19-6680-3-1	Multicopia	100.0%	Tolerante	7.2	Sí
pDAS000123	gt19-6733-1-1	Multicopia	50.0%	Tolerante	7.2	No
pDAS000122	mp45-6711-4-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	6.2	Sí
pDAS000125	hh08-6780-8-1	Pocas copias	58.3%	Tolerante	6.1	Sí
pDAS000123	mp45-6739-16-1	Multicopia	75.0%	Tolerante	6.1	Sí
pDAS000125	hh08-6780-10-1	Pocas copias	75.0%	Tolerante	6.1	Sí
pDAS000125	hh08-6785-8-1	Multicopia	50.0%	Tolerante	5.9	Sí
pDAS000125	hh08-6785-7-1	Pocas copias	50.0%	Tolerante	5.8	Sí
pDAS000124	gt19-6752-22-1	Multicopia	91.7%	Tolerante	5.8	Sí
pDAS000123	di01-6745-1-1	Multicopia	100.0%	Tolerante	5.7	Sí
pDAS000122	hh08-6678-2-1	Pocas copias	75.0%	Tolerante	5.5	Sí
pDAS000122	hh08-6678-7-1	Pocas copias	58.3%	Tolerante	5.3	Sí
pDAS000125	hh08-6780-6-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	5.2	Sí
pDAS000123	gt19-6733-6-1	Multicopia	83.3%	Tolerante	5.0	No
pDAS000125	hh08-6780-11-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	5.0	Sí
pDAS000125	hh08-6780-7-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	3.7	Sí
pDAS000124	yl02-6762-8-1	Pocas copias	83.3%	Tolerante	3.5	Sí

pDAS000124	yl02-6762-6-1	Pocas copias	83.3%	Tolerante	3.3	Sí
pDAS000122	mp45-6711-2-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	3.2	Sí
pDAS000122	mp45-6711-11-1	Multicopia	100.0%	Tolerante	3.0	Sí
pDAS000122	mp45-6677-5-1	Pocas copias	33.3%	Tolerante	2.7	No
pDAS000125	hh08-6785-4-1	Pocas copias	58.3%	Tolerante	2.5	No
pDAS000123	yl02-6735-1-1	Pocas copias	83.3%	Tolerante	2.1	Sí
pDAS000122	mp45-6711-3-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	1.7	No
pDAS000125	yl02-6781-1-1	Multicopia	41.7%	Tolerante	1.7	No
pDAS000124	hh08-6761-1-1	Pocas copias	100.0%	Tolerante	1.6	Sí
pDAS000125	hh08-6780-16-1	Pocas copias	91.7%	Tolerante	1.4	No
pDAS000123	hh08-6729-8-1	Pocas copias	83.3%	Tolerante	1.1	Sí
pDAS000125	hh08-6780-1-1	Pocas copias	91.7%	Tolerante	0.9	No
pDAS000123	hh08-6729-5-1	Pocas copias	83.3%	Tolerante	0.7	Sí
pDAS000124	mp45-6756-1-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	0.7	Sí
pDAS000123	mp45-6739-14-1	Pocas copias	91.7%	Tolerante	0.5	Sí
pDAS000125	gt19-6777-2-1	Pocas copias	75.0%	Tolerante	0.3	No
pDAS000124	yl02-6762-5-1	Multicopia	91.7%	Tolerante	0.2	No
pDAS000125	hh08-6780-3-1	Multicopia	66.7%	Tolerante	0.0	Sí
pDAS000122	mp45-6696-1-1	Pocas copias	83.3%	Tolerante	-0.1	No
pDAS000122	hh08-6678-8-1	Pocas copias	58.3%	Tolerante	-0.1	Sí
pDAS000125	hh08-6780-12-1	Pocas copias	75.0%	Tolerante	-0.3	No
pDAS000125	yl02-6781-4-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	-0.4	No
pDAS000124	gt19-6752-6-1	Multicopia	50.0%	Tolerante	-0.9	No

pDAS000122	mp45-6696-4-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	-0.9	No
pDAS000125	hh08-6780-9-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	-1.1	No
pDAS000123	mp45-6739-5-1	Pocas copias	83.3%	Tolerante	-1.1	Sí
pDAS000124	yl02-6762-1-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	-1.1	No
pDAS000123	yl02-6735-5-1	Pocas copias	83.3%	Tolerante	-1.3	No
pDAS000124	yl02-6762-7-1	Pocas copias	91.7%	Tolerante	-1.6	Sí
pDAS000124	gt19-6752-24-1	Multicopia	50.0%	Tolerante	-1.6	No
pDAS000123	mp45-6739-7-1	Pocas copias	41.7%	Tolerante	-1.7	No
pDAS000124	gt19-6752-18-1	Multicopia	100.0%	Tolerante	-1.7	Sí
pDAS000123	gt19-6733-2-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	-1.8	No
pDAS000124	gt19-6752-10-1	Pocas copias	33.3%	Tolerante	-2.0	No
pDAS000123	mp45-6739-4-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	-2.0	Sí
pDAS000125	gt19-6777-5-1	Pocas copias	50.0%	Tolerante	-2.4	No
pDAS000124	gt19-6752-14-1	Pocas copias	58.3%	Tolerante	-2.5	No
pDAS000122	yl02-6709-1-1	Multicopia	50.0%	Tolerante	-2.5	No
pDAS000125	yl02-6781-8-1	Pocas copias	58.3%	Tolerante	-2.7	No
pDAS000124	gt19-6752-23-1	Pocas copias	83.3%	Tolerante	-2.7	No
pDAS000124	mp45-6756-2-1	Pocas copias	75.0%	Tolerante	-2.7	No
pDAS000124	yl02-6762-3-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	-3.4	No
pDAS000123	gt19-6733-8-1	Pocas copias	41.7%	Tolerante	-3.4	No
pDAS000123	hh08-6729-7-1	Pocas copias	50.0%	Tolerante	-3.6	No
pDAS000125	hh08-6785-3-1	Pocas copias	66.7%	Tolerante	-4.2	No
pDAS000123	mp45-	Multicopia	33.3%	Tolerante	-4.4	No

	6739-1-1					
pDAS000122	mp45-6711-31-1	Multicopia	41.7%	Tolerante	-4.5	No
pDAS000125	hh08-6780-15-1	Multicopia	66.7%	Tolerante	-4.8	No
pDAS000123	gt19-6733-10-1	Pocas copias	33.3%	Tolerante	-5.1	No
pDAS000125	hh08-6780-13-1	Pocas copias	100.0%	Tolerante	-5.5	No
pDAS000122	mp45-6711-5-1	Pocas copias	75.0%	Tolerante	-5.7	No
pDAS000122	mp45-6711-10-1	Multicopia	58.3%	Tolerante	-10.4	No
pDAS000123	gt19-6733-5-1	Pocas copias	0.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000124	gt19-6752-7-1	Pocas copias	0.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000122	hh08-6718-2-1	Pocas copias	0.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000123	hh08-6729-9-1	Pocas copias	0.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000124	hh08-6761-3-1	Pocas copias	0.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000125	hh08-6785-1-1	Pocas copias	0.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000122	mp45-6696-2-1	Pocas copias	0.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000123	mp45-6739-2-1	Pocas copias	0.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000122	km51-6686-1-1	Pocas copias	8.3%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000122	mp45-6711-6-1	Pocas copias	8.3%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000124	yl02-6762-12-1	Multicopia	8.3%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000123	gt19-6733-7-1	Pocas copias	16.7%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000123	hh08-6729-3-1	Multicopia	16.7%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000124	mp45-6756-4-1	Pocas copias	16.7%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000125	hh08-6780-4-1	Pocas copias	16.7%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000122	hh08-	Pocas	25.0%	Susceptible	no aplicable	No

	6678-6-1	copias				
pDAS000123	gt19-6733-9-1	Pocas copias	25.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000123	hh08-6729-6-1	Pocas copias	25.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000124	yl02-6762-11-1	Pocas copias	25.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000124	yl02-6762-4-1	Pocas copias	25.0%	Susceptible	no aplicable	No
pDAS000125	yl02-6781-7-1	Multicopia	25.0%	Susceptible	no aplicable	No

*Una puntuación positiva indica mayor tolerancia al glifosato. La puntuación agregada estandarizada para la planta de trigo donante no transformada fue 12,2.

[00449] Pantalla fenotípica detallada. Cuatro réplicas de 12 semillas T1 seleccionadas y ocho réplicas (12 semillas cada una) de trigo donante no transformado MPB26RH Bobwhite se sembraron en macetas de 85 mm y se cultivaron hasta la fase de 2 hojas bajo condiciones de buen riego a 25 ° C con iluminación complementaria proporcionando un fotoperíodo de 12 horas. Las macetas fueron situadas en un diseño al azar para permitir la eliminación efectos ambientales durante el análisis de datos. Las pantallas de transgénicos están enumerados en la **Tabla 37**. En la etapa de 2 hojas, se registraron la longitud de la planta y el número de hojas de cada planta antes de pulverizar con glifosato. La primera, segunda, tercera y cuarta réplica de las plantas T1 para cada caso y el trigo donante no transformado fueron pulverizados con una dosis de 420, 840 ,1680 y 3360 g ai/ha, respectivamente. La quinta, sexta, séptima y octava réplica del trigo donante no transformado (total de 48 plantas) no fueron pulverizadas. A los 7, 14 y 21 días de la pulverización, se registró el tamaño de la planta, el número de hojas y la respuesta fenotípica al glifosato usando la escala de valoración de la **Tabla 34**. También se registraron las anormalidades morfológicas. Para la puntuación, el anotador fue "ciego" con respecto al genotipo de la planta y la tasa de dosis de pulverización para evitar el sesgo de puntuación. Las plantas con germinación retrasada y establecimiento pobre (criterio: longitud de planta <6 cm) en la puntuación previa a la pulverización fueron excluidas de análisis posteriores.

[00450] **Tabla 37**. Casos transgénicos probados en la pantalla fenotípica detallada.

Entrada	Vector	Código del caso	Número estimado de ADN-T integrado codificando DGT-28*
1	pDAS000122	mp45-6677-5-1	Caso pocas copias
2	pDAS000122	mp45-6711-7-1	Caso pocas copias

3	pDAS000122	mp45-6711-4-1	Caso pocas copias
4	pDAS000122	hh08-6678-2-1	Caso pocas copias
5	pDAS000122	hh08-6678-7-1	Caso pocas copias
6	pDAS000122	hh08-6678-8-1	Caso pocas copias
7	pDAS000122	mp45-6711-2-1	Caso pocas copias
8	pDAS000122	gt19-6680-3-1	Caso multicopias
9	pDAS000122	mp45-6711-11-1	Caso multicopias
10	pDAS000123	yl02-6735-1-1	Caso pocas copias
11	pDAS000123	hh08-6729-8-1	Caso pocas copias
12	pDAS000123	hh08-6729-5-1	Caso pocas copias
13	pDAS000123	mp45-6739-14-1	Caso pocas copias
14	pDAS000123	mp45-6739-5-1	Caso pocas copias
15	pDAS000123	mp45-6739-7-1	Caso pocas copias
16	pDAS000123	mp45-6739-4-1	Caso pocas copias
17	pDAS000123	mp45-6739-16-1	Caso multicopias
18	pDAS000123	di01-6745-1-1	Caso multicopias
19	pDAS000124	gt19-6752-4-1	Caso pocas copias
20	pDAS000124	yl02-6762-8-1	Caso pocas copias
21	pDAS000124	yl02-6762-6-1	Caso pocas copias
22	pDAS000124	hh08-6761-1-1	Caso pocas copias
23	pDAS000124	mp45-6756-1-1	Caso pocas copias
24	pDAS000124	yl02-6762-7-1	Caso pocas copias
25	pDAS000124	gt19-6752-22-1	Caso multicopias
26	pDAS000124	gt19-6752-18-1	Caso multicopias
27	pDAS000125	hh08-6780-8-1	Caso pocas copias
28	pDAS000125	hh08-6780-10-1	Caso pocas copias
29	pDAS000125	hh08-6785-7-1	Caso pocas copias
30	pDAS000125	hh08-6780-6-1	Caso pocas copias
31	pDAS000125	hh08-6780-11-1	Caso pocas copias
32	pDAS000125	hh08-6780-7-1	Caso pocas copias

*Basado en el ensayo dúplex Taqman® qPCR. Pocas copias y multicopias indica =3 y ≥4 T-DNA integrados, respectivamente.

[00451] Análisis de la respuesta de glifosato a 7, 14 y 21 días después del rociado reveló una diferencia fenotípica clara entre las plantas no trasformadas donantes de trigo rociadas y las sin rociar. Esta diferenciación es máxima a los 21 días y se observó en todas las tasas de dosis de glifosato. **Tabla 38**. Para evaluar la tolerancia de los eventos transgénicos a glifosato según cada tasa de dosis de rociado, las plantas T_1 nulas (es decir, plantas que no portan el transgénico) se excluyeron de los análisis posteriores. Las plantas T_1 con una puntuación de la respuesta de menos de tres a los 21 días después del rociado se consideran com que tienen el genotipo nulo. El análisis de la varianza (ANOVA) con base en los fenotipos tolerantes reveló un efecto significativo para el constructo de extracción DGT-28, el suceso transgénico y la dosis de

glifosato de rociado. **Tabla 39**. Sin embargo, pruebas de comparación múltiple no dieron a conocer una interpretación biológica significativa para el origen de estas diferencias debido a la gama limitada de las puntuaciones de respuesta (es decir, 1 a 4; **Tabla 37**) utilizada para registrar el fenotipo de las plantas individuales. En general, los ocho eventos transgénicos independientes analizados para cada constructo de extracción de DGT-28 mostraron una tolerancia similar al glifosato a cada tasa de dosis de rociado, lo que indica que los cuatro transgénicos 28-DGT confieren un fenotipo dominante y que una única copia fue suficiente para conferir tolerancia al glifosato. Cada una de los constructos DGT-28 reveló la tolerancia eficaz de al menos 3360 g de ai / ha de glifosato.

[00452] Tabla 38. Respuesta fenotípica de las plantas no transformadas donantes de trigo a diferentes tratamientos de glifosato a los 21 días después del rociado.

	Tasa de la dosis (g ai/ha)	**No. plantas en la calificación pre-rociado**	**No. de plantas sobrevivientes a 14 días después del rociado**	**No. de plantas sobrevivientes a 21 días después del rociado**
Réplica 1	420	10	0	0
Réplica 2	840	10	3	0
Réplica 3	1680	11	0	0
Réplica 4	3360	10	1	0
Réplica 5	0	9	8	8
Réplica 6	0	8	8	8
Réplica 7	0	12	12	12
Réplica 8	0	12	12	12

[00453] Tabla 39. Análisis de la varianza (ANOVA) sobre la base de las plantas tolerantes a glifosato.

	Df[1]	**Suma de cuadrados**	**Cuadrado medio**	**Valor-F**	**Pr(>F)[2]**
Réplica	11	1.29	0.12	0.728	0.71181
Vector	4	139.54	34.88	216.025	2.00E-16***
Código de evento	29	178.52	6.16	38.122	2.00E-16***
Dosis de rociado	3	2.14	0.71	4.417	0.00427**

[1]Grados de libertad; [2]Significancia estadística at 0.001 (***) y 0.01 (**), respectivamente.

[00454] Confirmación molecular de ADN-T presente en las plantas T1 tolerantes a glifosato. Los ensayos de PCR para cigosidad desarrollados en el Ejemplo 2 se utilizaron para confirmar la presencia de ADN-T que codifica el DGT-28 en las plantas T1 tolerantes al glifosato mantenidas para la producción de semillas T2 (Véase el Ejemplo 6). En general, las pruebas de PCR de cigosidad se realizaron para 104 plantas T1, de los cuales se confirmó que el 89% contenían al menos una copia del transgénico. **Tabla 40.** Estos resultados confirmaron que la tolerancia al glifosato observada fue conferida por la presencia de ADN-T que codifica el DGT-28.

[00455] **Tabla 40**. Segregación del transgénico observada entre plantas T1.

Construct o	**Código de evento**	**Homocigotos para la presencia del transgénico**	**Hemicigotos para la presencia del transgénico**	**Homocigotos para la ausencia del transgénico**	**Plantas Escape observadas**
pDAS000122	hh08-6678-2-1	0	7	2	Sí
pDAS000122	hh08-6678-8-1	2	7	0	No
pDAS000123	hh08-6729-5-1	7	4	0	No
pDAS000123	mp45-6739-14-1	1	8	0	No
pDAS000123	mp45-6739-5-1	0	9	0	No
pDAS000124	gt19-6752-4-1	5 (homo o hemi)		3	Sí
pDAS000124	hh08-6761-1-1	3	2	3	Sí
pDAS000124	yl02-6762-6-1	7 (homo o hemi)		2	Yes
pDAS000124	yl02-6762-8-1	3	6	0	No
pDAS000125	hh08-6780-10-1	6	4	0	No
pDAS000125	hh08-6780-8-1	2	7	1	Sí

[00456] Generación de semillas s T2 para eventos transgénica tolerantes al glifosato. Alrededor de ocho plantas tolerantes al glifosato T1 se salvaron de las revisiones fenotípicas de los 32 eventos transgénicos que fueron seleccionados para su inclusión en la revisión fenotípica

detallada (**Tabla 37**). Las plantas se transfirieron a macetas de 200 mm y se cultivaron bajo condiciones de buen riego a 25° C con iluminación suplementaria proporcionando el foto período de 12 horas. Las espigas en cada planta fueron embolsadas individualmente antes de la antesis para evitar cruzamiento.

[00457] Mientras que los aspectos de esta invención se han descrito en ciertas partes, puede que se modifiquen adicionalmente dentro del espíritu y alcance de esta divulgación. Esta aplicación está destinada a cubrir cualesquier variación, uso o adaptación de las realizaciones de la invención usando sus principios generales. Además, esta solicitud está destinada a cubrir dichas desviaciones de la presente divulgación que entran dentro de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que pertenecen dichas realizaciones y que están dentro de los límites de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Una molécula aislada de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con otro ácido nucleico que tiene la SEC ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 bajo condiciones de alta astringencia.

2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia sintética que ha sido diseñado para la extracción en una planta.

3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.

4. El vector de la reivindicación 3, que comprende además un ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.

5. El vector de la reivindicación 3, en el que el ácido nucleico está unido operativamente a un promotor.

6. Una célula huésped que contiene la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 como un ácido nucleico heterólogo unido operativamente a un promotor.

7. El vector de la reivindicación 5, en el que el promotor es el promotor AtUbi10.

8. La célula huésped de la reivindicación 6, en el que la célula huésped es una célula vegetal.

9. Una planta transgénica, parte de la planta, órgano de planta, semilla de planta, o célula vegetal que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1.

10. La planta transgénica, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta, o célula de planta de la reivindicación 9, en donde la planta, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta, y / o célula de planta es tolerante al glifosato, cuando se compara con un tipo de planta silvestre (“wild”) de la misma especie.

11. La planta transgénica, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta, o célula de planta de la reivindicación 9, en el que el ácido nucleico no codifica LGNAAT (SEQ ID NO: 141) y no codifica ALLMXAPLT, en la que X se selecciona del grupo que consiste de alanina, serina, y treonina (SEQ ID NO: 142).

12. La planta, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta, o célula de planta de la reivindicación 9, en la que el ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene identidad de al menos el 90% de la secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que cuando se alinean con la SEQ ID NO: 1, comprende una alanina en la posición correspondiente a la posición 84 de la SEQ ID NO: 1 y/o una treonina en la posición correspondiente a la posición 172 de la SEQ ID NO: 1.

13. Un cultivo de tejido de células regenerables producido a partir de la planta, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta, y/ o célula de planta de la reivindicación 9.

14. Los proplastos producidos a partir de la planta transgénica, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta, o célula de planta de la reivindicación 9.

15. El cultivo de tejido de la reivindicación 13, en el que las células regenerables se producen a partir de un tipo de tejido seleccionado del grupo que consiste en hojas, polen, embriones, cotiledones, hipocótilos, células meristemáticas, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, tallos y vainas.

16. Una planta regenerada a partir del cultivo de tejido de la reivindicación 13, dentro del cual la planta es resistente a glifosato.

17. La célula de planta, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta, o célula de la planta de la reivindicación 9, en la que el genoma comprende una molécula de ácido nucleico que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3.

18. Un método de generación de célula de una planta, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta, o célula de una planta resistente al glifosato, el método se constituye por: la transformación de la planta, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta, o célula de planta con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1; y la extracción de un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1.

19. El método según la reivindicación 18, en el que la planta transformada, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta, o célula de planta es resistente al glifosato.

20. El método según la reivindicación 18, donde el polipéptido no incluye a LGNAAT (SEQ ID NO: 141) y/o no incluye ALLMXAPLT, en la que X se selecciona del grupo que consiste de alanina, serina, y treonina (SEQ ID NO: 142).

21. El método según la reivindicación 18, en el que el polipéptido, cuando se alinean con la SEQ ID NO: 1, incluye una alanina en la posición correspondiente a la posición 84 de la SEQ ID NO: 1 y / o una treonina en la posición correspondiente a la posición 172 de la SEC ID N º: 1.

22. El método según la reivindicación 18, en el que la molécula de ácido nucleico tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

23. El método según la reivindicación 18, en el que la molécula de ácido nucleico que comprende la SEC ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

24. Un método para controlar malas hierbas en una superficie de cultivo que contiene las plantas resistentes a los herbicidas, el método incluye: plantar una planta o una semilla de planta que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 en la superficie de cultivo; y aplicar a la superficie de cultivo una cantidad suficiente de herbicida para controlar las malas hierbas en la superficie de cultivo sin afectar significativamente a la planta o semilla de la planta.

25. El método según la reivindicación 24, en el que el herbicida es el glifosato.

26. El método según la reivindicación 24, en el que la planta o semilla de planta que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 comprende un segundo ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.

27. El método según la reivindicación 24, en el que el segundo ácido nucleico incluye *aad-1* o *aad-12.*

28. Un método para conferir resistencia a un herbicida en una planta, el método incluye: la transformación de la planta con un constructo de ADN, dicho constructo incluye un promotor vinculado operativamente a la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1; la regeneración una planta transformada; y la extracción de la molécula de ácido nucleico para producir un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1.

29. El método según la reivindicación 28, en el que el herbicida es el glifosato.

30. El método según la reivindicación 28, en el que el constructo de ADN incluye una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo extraíble en la planta.

31. El método según la reivindicación 30, en el que el polipéptido heterólogo incluye aad-*1* o *aad-12*.

32. Una planta que tiene integrada de manera estable en su genoma el ácido nucleico de la reivindicación 1 como un ácido nucleico heterólogo, en el que el ácido nucleico está vinculado operativamente a un promotor.

33. La planta de la reivindicación 32, en donde la planta es una planta de soja.

34. La planta de la reivindicación 32, en donde la planta es una planta de maíz.

35. La planta de la reivindicación 32, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste en trigo, maíz, soja, tabaco, brachiaria, arroz, mijo, cebada, tomate, manzana, pera, fresa, naranja, alfalfa, algodón, zanahoria, patata, remolacha, batata, lechuga, espinaca, petunia, rosa, crisantemo, césped, pinos, abetos, piceas, plantas que acumulan metales pesados, girasol, cártamo, colza, y *Arabidopsis*.

36. La planta de la reivindicación 32, en donde la planta es una especie seleccionada del grupo que consiste en los géneros de *Asparagus, Avena, Brachiaria, Brassica, Citrus, Citrullus, Capsicum, Cucurbita, Daucus, Erigeron, Glycine, Gossypium, Hordeum, Helianthus, Lactuca, Lolium, Lycopersicon, Malus, Manihot, Nicotiana, Orychophragmus, Oryza, Persea, Phaseolus, Pisum, Pyrus, Prunus, Raphanus, Secale, Solanum, Sorgo, Triticum, Vitis, Vigna, y Zea.*

37. La célula huésped de la reivindicación 8, en la que la célula de la planta no es regenerable para producir una planta.

38. La célula huésped de la reivindicación 9, en la que la célula de la planta no es regenerable para producir una planta.

39. La reivindicación del método 18, en la que la célula de la planta que no es regenerable para producir se transforma.

10153-1PC

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

VIII-2-1	**Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent** Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application DOW AGROSCIENCES LLC is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(iv)		an assignment from LIRA, Justin M. to DOW AGROSCIENCES LLC, dated 02 March 2012 (02.03.2012)
VIII-2-1(iv)		an assignment from CICCHILLO, Robert M. to DOW AGROSCIENCES LLC, dated 02 March 2012 (02.03.2012)
VIII-2-1(iv)		an assignment from YERKES, Carla to DOW AGROSCIENCES LLC, dated 02 March 2012 (02.03.2012)
VIII-2-1(iv)		an assignment from ROBINSON, Andrew E. to DOW AGROSCIENCES LLC, dated 02 March 2012 (02.03.2012)

10975
6228

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª Nº 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

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

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

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER OF ATTORNEY

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

Dow AgroSciences LLC

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

por el presente ratificamos la

presentada por

como agente oficioso ante

en

el

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

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

hereby ratify the

filed without a Power of Attorney by

before

in

on

and do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

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

A la vuelta →

Over →

© CAVELIER ABOGADOS

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

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

Given and signed this/Dado y firmado hoy February 6, 1998

in/en Indianapolis, Indiana 46268
United States or America

Kenneth L. Loertscher
Signature Firma

Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary
& General Patent Counsel



Consulado General de Colombia

500 NORTH MICHIGAN AVENUE, SUITE 2040
CHICAGO, ILLINOIS 60611

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

No. 254 Chicago, FEB 20 1998

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

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

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

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

CARLOS ALFONSO NEGRET MOSQUERA
Cónsul General

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

Carlos
321220
Negret

ESTA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1998 MAR 11 A 11:55

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 653 Minjusticia 1991

UNITED STATES OF AMERICA

CERTIFICATE OF OFFICE

STATE OF INDIANA

I, Sue Anne Gilroy, Secretary of State of Indiana, DO HEREBY CERTIFY: That, according to records on file in my office, Lydia S. Owens was duly elected or appointed to the office of Notary Public in and for Hendricks County and that the term of said office included the date of February 6, 1998: that to all his/her official acts as said official, full faith and credit ought to be given in all Courts of Justice and elsewhere. In testimony whereof, I have here unto set my hand and affixed the Great Seal of the State of Indiana, at Indianapolis, this Tenth day of February, 19.98



Sue Anne Gilroy

Secretary of State

CHICAGO

by: Mary Reuver

Deputy

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 6 días del mes de FEBRERO de 19 98

ante mí, Notario Público de ESTADO DE INDIANA

compareció(eron) personalmente KENNETH L. LOERTSCHER

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

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 6th day of February 1998

before me, a Notary Public of State of Indiana

personally appeared Kenneth L. Loertscher

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

Notario Público — Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 6 de FEBRERO de 19 98

compareció(eron) ante mí

KENNETH L. LOERTSCHER

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

denominada Dow AgroSciences LLC

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

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

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Dow AgroSciences LLC

es una Sociedad/Compañía legalmente constituída y existente

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

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

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

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) KENNETH L. LOERTSCHER

SECRETARIO ASSISTENTE y ASESOR LEGAL PATENTES

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

Ciudad INDIANAPOLIS

Estado INDIANA

Hoy 6 FEB. de 19 98

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 6th day of February 1998

appeared before me

Kenneth L. Loertscher

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

I Certify:

1. That I have seen the following documents:*

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

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Dow AgroSciences LLC

is a ~~Corporation/~~Limited Liability Company legally constituted and in existence

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

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

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

2.4. That Mr.(Messrs.) Kenneth L. Loertscher

Assistant Secretary and General Patent Counsel

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Indianapolis

State Indiana

This 6th day of Feb. 1998

Lydia S. Owens

Notario Público — Notary Public

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

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

* Documents must be identified with date and origin.

Dow AgroSciences LLC

CERTIFICACION NOTARIAL Y AUTENTICACION CONSULAR

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

1.1. Que la compañía está legalmente constituída y actualmente existente.

1.2. Su domicilio.

1.3. Que el propósito del poder está incluído en el objeto social de la compañía.

1.4. Que el poderdante está autorizado para dar el poder en nombre de la compañía.

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

2.1. Respecto a los puntos 1.1, 1.2 y 1.3 sugerimos referirse a los artículos de constitución con fecha y lugar de otorgamiento; y

2.2. Para el punto 1.4 sugerimos mencionar la resolución de la Junta Directiva o los estatutos, según los cuales la persona que otorga el poder está autorizada para ello.

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

NOTARIAL CERTIFICATION AND CONSULAR AUTENTIFICATION

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

1.1. That the company is legally constituted and presently existent.

1.2. Its place of business.

1.3. That the purpose of the Power-of-Attorney is included in the activities of the company.

1.4. That the grantor is empowered to give the Power of Attorney in the name of the company he represents.

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

2.1. In connection with points 1.1., 1.2. and 1.3 we suggest referring to the articles of incorporation with date and place of execution.

2.2. For point 1.4 we suggest to mention the resolution of the Board of Directors and/or the by-laws whereby the person who grants the Power of Attorney has been authorized to give it.

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

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

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

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

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

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

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

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

(Firmado), Lydia S. Owens, Notario Público

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

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

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

ESTADO UNIDOS DE AMERICA

CERTIFICADO DEL CARGO

ESTADO DE INDIANA

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

(Firma facsimilar), Sue Ann Gilroy

Secretario de Estado

(Firmado), Por: Mary Reever

Suplente

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

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

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

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

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

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

Bogotá, 17 de marzo de 1998

COLO 6641-801-001-3

BRM.137

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

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

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 17 MAR 1998

REPUBLICA DE COLOMBIA
NOTARIA SEXTA
SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

98 MAR 18 AM 10 56

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

022686

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

CAVELIER
ABOGADOS

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

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

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

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : **DOW AGROSCIENCES LLC**

Poder conferido el : 06/02/1998

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

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

EMILIO FERRERO
T.P.A. N° 31.929
C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. N° 23.555
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
Bogotá, D.C.
Ante mi AMPARO QUINTERO ARTURO 23 OCT 2009
NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C.
Compareció(eron) Emilio Ferrero Williamson y Luz Clemencia Suarez de Perez
Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.
CC 2408019 TP 31929
CC 35453644 TP 23555
Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Ferrero
Luz Clemencia Suarez

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Amparo Quintero Arturo
NOTARIA
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

Con formato: Izquierda: 2,65 cm, Derecha: 2,65 cm, Ancho: 21,59 cm, Alto: 27,94 cm

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Dow Agrosciences
Lira, Justin
Yerkes, Carla
Robinson, Andrew
Cicchillo, Robert

<120> PLANTAS RESISTENTES A GLIFOSATO Y MËTODOS ASOCIADOS

<130> 2971-P10153.1US (68831)

<160> 145

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 415
<212> PRT
<213> Streptomyces sviceus

<400> 1

```
Met Arg Gly Met Pro Ala Leu Ser Leu Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr
1               5                  10                  15


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


Val Arg Pro Leu Arg Ser Asp Asp Thr Glu Gly Phe Ala Glu Gly Leu
        35                  40                  45


Val Arg Leu Gly Tyr Arg Val Gly Arg Thr Pro Asp Thr Trp Gln Val
    50                  55                  60


Asp Gly Arg Pro Gln Gly Pro Ala Val Ala Glu Ala Asp Val Tyr Cys
65                  70                  75                  80


Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro Thr Leu Ala Ala Ala
                85                  90                  95


Gly His Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser Pro Gln Met Arg Arg Arg
            100                 105                 110


Pro Leu Leu Pro Leu Ser Arg Ala Leu Arg Asp Leu Gly Val Asp Leu
        115                 120                 125
```

```
Arg His Glu Glu Ala Glu Gly His His Pro Leu Thr Val Arg Ala Ala
    130                 135                 140

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

Tyr Leu Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Pro Leu Thr Arg Gln Gly Leu
                165                 170                 175

Arg Ile Arg Val Thr Asp Leu Val Ser Ala Pro Tyr Val Glu Ile Thr
            180                 185                 190

Leu Ala Met Met Arg Ala Phe Gly Val Glu Val Ala Arg Glu Gly Asp
        195                 200                 205

Val Phe Val Val Pro Pro Gly Gly Tyr Arg Ala Thr Thr Tyr Ala Ile
    210                 215                 220

Glu Pro Asp Ala Ser Thr Ala Ser Tyr Phe Phe Ala Ala Ala Ala Leu
225                 230                 235                 240

Thr Pro Gly Ala Glu Val Thr Val Pro Gly Leu Gly Thr Gly Ala Leu
                245                 250                 255

Gln Gly Asp Leu Gly Phe Val Asp Val Leu Arg Arg Met Gly Ala Glu
            260                 265                 270

Val Ser Val Gly Ala Asp Ala Thr Thr Val Arg Gly Thr Gly Glu Leu
        275                 280                 285

Arg Gly Leu Thr Ala Asn Met Arg Asp Ile Ser Asp Thr Met Pro Thr
    290                 295                 300

Leu Ala Ala Ile Ala Pro Phe Ala Ser Ala Pro Val Arg Ile Glu Asp
305                 310                 315                 320

Val Ala Asn Thr Arg Val Lys Glu Cys Asp Arg Leu Glu Ala Cys Ala
                325                 330                 335

Glu Asn Leu Arg Arg Leu Gly Val Arg Val Ala Thr Gly Pro Asp Trp
```

```
            340                 345                 350

Ile Glu Ile His Pro Gly Pro Ala Thr Gly Ala Gln Val Thr Ser Tyr
        355                 360                 365

Gly Asp His Arg Ile Val Met Ser Phe Ala Val Thr Gly Leu Arg Val
    370                 375                 380

Pro Gly Ile Ser Phe Asp Asp Pro Gly Cys Val Arg Lys Thr Phe Pro
385                 390                 395                 400

Gly Phe His Glu Ala Phe Ala Glu Leu Arg Arg Gly Ile Gly Ser
                405                 410                 415
```

<210> 2
<211> 1248
<212> ADN
<213> Streptomyces sviceus

<400> 2
atgagaggga tgccagcctt gtctttacct ggatcaaaga gtatcacagc tagggcactc
60

tttcttgctg ctgctgctga tggggttact actttggtga ggccattgag aagtgacgac
120

acagaaggat tcgctgaggg gttagttcgt ttaggctatc gtgtagggag gacacccgat
180

acttggcaag tcgatggcag accacaagga ccagcagtgg ctgaggctga cgtctactgt
240

agagacggag caaccaccgc tagattcttg ccaaccttag cagctgctgg tcacggaaca
300

tacagatttg atgcttcacc acagatgagg agacgtcctc ttttgccctt aagcagagcc
360

ttgagggatt tgggtgtcga tcttagacac gaagaagctg aaggtcatca ccctctgact
420

gtccgtgctg ctggggttga aggaggagag gttactttgg atgctggtca gtcaagtcag
480

tatctcactg ccttgttgct ccttggtccc cttacaagac aaggactgag gataagggtt
540

actgatttgg tgtcagcacc atacgtggag attacgcttg caatgatgag ggctttcgga
600

gttgaagtgg caagggaggg agatgtgttc gttgttccac ctggtggata tcgtgcaact
660

acgtatgcta tagaacccga cgcaagtact gcttcttact tcttcgcagc tgctgctttg
720

actcctggag ctgaagtgac tgtacctggg ttaggcacgg gagcacttca aggagatttg
780

ggatttgtag atgtcttaag gagaatggga gccgaggtgt ccgtaggagc tgatgcaacc
840

actgttagag gaactggtga attgcgtggc cttacagcca acatgagaga cataagtgat
900

acgatgccga ccctcgctgc aatagcaccc tttgctagtg ctccagttag aatcgaggat
960

gttgccaaca ctcgtgtcaa agaatgtgac agacttgagg cttgtgcaga gaaccttagg
1020

aggttgggag taagggttgc aacgggtccg gactggattg agatacaccc tggtccagct
1080

actggtgctc aagtcacaag ctatggtgat cacagaattg tgatgtcatt tgcagtgact
1140

ggacttcgtg tgcctgggat cagcttcgac gaccctggct gtgttcgtaa gacttttcct
1200

gggtttcacg aggctttcgc agaattgagg cgtggcattg ggagctga
1248

<210> 3
<211> 1251
<212> ADN
<213> Streptomyces sviceus

<400> 3
atggcaagag ggatgccagc cttgtcgctg cctggctcaa agtcgatcac ggctagagca
60

ctctttctcg cagcagcagc cgacggagtc accacgcttg tgagaccgct gcggtcagac
120

gacaccgagg gttttgcgga aggcctcgtc agactgggct atcgggttgg gaggactccc
180

gacacgtggc aagtggacgg aaggccacaa ggtccagcag ttgccgaggc tgatgtgtat
240

tgtagagacg gtgcaacaac ggctaggttc ctccccacac tcgcagctgc tggacacggg
300

acctacagat ttgatgcctc tccccagatg aggagaaggc cactgctgcc tctttctagg
360

gctttgaggg accttggcgt tgatcttcgc cacgaggaag cggaagggca ccacccctg
420

accgtgagag ctgctggagt cgagggaggt gaggttacac tcgatgctgg acagtcctct
480

cagtacttga cggcactgct gctgctcggt ccgctcacac gccaagggct gcggattcgc
540

gtcactgatc tggttagcgc tccgtacgtg gagattacac ttgcgatgat gagagctttt
600

ggggtcgagg ttgcacgcga aggcgacgtt ttcgtggtgc ctcctggtgg ctacagagcg
660

actacgtacg cgattgagcc agatgccagc accgcaagct acttctttgc agctgctgcg
720

ttgacacctg gagccgaggt cacagtgcct ggactcggga ccggagcgct tcaaggggat
780

ctcggcttcg tggacgtgct gcggaggatg ggtgccgagg tcagcgtggg agcagacgct
840

acgactgtta gaggcacggg tgagcttaga ggccttacag caaacatgag ggacatatcc
900

gacacgatgc cgacgcttgc tgccatcgct ccgttcgctt cagcacccgt cagaattgaa
960

gatgtggcga acactcgcgt caaagagtgc gacagacttg aagcgtgtgc cgagaacttg
1020

aggaggttgg gagtgagagt cgcaactggt ccagactgga tcgagatcca ccctggtcca
1080

gctactggag cgcaagtcac aagctatggc gaccatagga ttgttatgtc attcgcagtg
1140

accggactca gagttcctgg gatctctttc gacgaccctg gttgcgtgcg gaaaacgttc
1200

cctggcttcc acgaggcatt tgcggagctg cggagaggaa ttggttcctg a
1251

<210> 4
<211> 1248

<212> ADN
<213> Streptomyces sviceus

<400> 4
atgcgtggta tgcctgcact gagcctgcct ggtagcaaaa gcattaccgc acgtgcactg
60

tttctggctg cagcagcaga tggtgttacc accctggttc gtcctctgcg ttctgatgat
120

accgaaggtt ttgcagaagg tctggttcgt ctgggttatc gtgttggtcg tacaccggat
180

acctggcaag ttgatggtcg tccgcagggt ccggcagttg ccgaagcaga tgtttattgc
240

cgtgatggtg caaccaccgc acgttttctg ccgaccctgg cagcagccgg tcatggcacc
300

tatcgttttg atgcatctcc gcagatgcgt cgtcgtccgc tgctgccgct gtctcgtgca
360

ctgcgtgatc tgggtgttga tctgcgtcat gaagaagcag aaggtcatca tccgctgacc
420

gttcgtgcag ccggtgttga aggtggtgaa gtgaccctgg atgccggtca gagcagccag
480

tatctgaccg cactgctgct gctgggtccg ctgacacgtc agggtctgcg tattcgtgtt
540

accgatctgg ttagcgcacc gtatgtggaa attaccctgg caatgatgcg tgcatttggt
600

gttgaagttg cacgtgaagg tgatgttttt gttgttccgc ctggtggtta tcgcgcaacc
660

acctatgcaa ttgaaccgga tgcaagcacc gcaagctatt tttttgcagc agcagccctg
720

acaccgggtg cagaagttac cgttcctggt ctgggcacag gtgcactgca gggtgatctg
780

ggatttgttg atgttctgcg tcgtatgggt gccgaagtta gcgttggtgc agatgccacc
840

accgttcgtg gtacaggtga actgcgtggt ctgaccgcaa atatgcgtga tattagcgat
900

accatgccga cactggctgc aattgcaccg tttgcaagcg caccggttcg tattgaagat
960

gttgccaaca cccgtgttaa agaatgtgat cgtctggaag catgtgcaga aaatctgcgt
1020

cgtctgggcg ttcgtgttgc aaccggtccg gattggattg aaattcatcc gggtccggca
1080

accggtgcac aggttaccag ctatggtgat catcgtatcg ttatgagctt tgcagttacc
1140

ggtctgcgtg ttccgggtat tagctttgat gatccgggtt gtgttcgtaa aacctttccg
1200

ggttttcatg aagcttttgc agaactgcgt cgtggtattg gtagctaa
1248

<210> 5
<211> 1599
<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 5
atggctcaag tctcccgtgt tcacaatctt gctcagtcaa cccaaatctt tggacattca
60

agcaactcaa acaaactgaa gtctgtgaat tctgtctcac ttcgcccacg cctttgggga
120

gcatccaaga gtcgcatacc aatgcacaag aatgggagtt tcatgggcaa cttcaatgtt
180

gggaaaggca attctggtgt cttcaaagtt tcagcttctg ttgcagccgc agagaaaccc
240

agcacttccc ctgagattgt tcttgaaccc attaaggact tcagtggaac aatcactctg
300

cctggatcaa agagtctttc aaacagaata cttctcttgg cagctctgag tgaaggaacc
360

actgtagttg acaacctttt gtactctgaa gatattcatt acatgttggg tgctctcaga
420

actcttgggt tgagagttga agatgacaag accacaaaac aagccatagt tgaaggatgt
480

ggtgggttgt ttccaacaag caaagaatcc aaagatgaga tcaacttgtt tcttggcaat
540

gctggaattg caatgagaag cctcactgct gcagtagttg cagctggtgg gaatgcaagt
600

tatgtccttg atggtgtccc cagaatgagg gaaaggccca tcggtgacct tgtggctggc
660

ctgaaacagc ttggagcaga tgttgattgc ttcttgggca caaactgccc tccagtgaga
720

gtgaatggga agggaggttt gcctggtgga aaggtcaaac tgagtggatc agtctcttcc
780

cagtatctga ctgccttgct catggctgcc cctctggctt tgggtgatgt ggagattgaa
840

atagtggaca agttgatttc tgttccatat gtggaaatga ccctcaaact catggagagg
900

tttggagttt ctgttgaaca ttctggcaac tgggatcgtt tccttgtaca tggaggtcag
960

aagtacaaaa gccctggcaa tgcctttgtt gaaggggatg caagctctgc ttcctatctc
1020

ttggctgggg ctgccatcac tggtgggacc atcactgtga atggctgtgg cacctcatcc
1080

cttcaaggtg atgtaaagtt tgcagaggtc ttggagaaaa tgggtgccaa ggtcacctgg
1140

tctgagaaca gtgtaactgt gtctggacct cccagagact tcagtggcag aaaggttctc
1200

cgtggaattg atgtgaacat gaacaagatg ccagatgtgg ccatgaccct cgctgttgta
1260

gccctgtttg caaatggacc aactgcaatc cgtgatgttg cttcatggag ggtgaaggag
1320

acagagagga tgattgccat ttgcacagaa ctccgcaaac ttggtgcaac agttgaagag
1380

ggaccagatt actgtgtgat aaccccacct gagaagctca atgtgacagc cattgacacc
1440

tatgatgacc acagaatggc aatggctttc tcccttgctg cctgtggtga tgtgcctgtg
1500

actatcaaag accctgggtg cacaaggaag acatttccag actactttga agttttggag
1560

aggttgacaa agcactgagt agttagctta atcacctag
1599

<210> 6
<211> 1551
<212> ADN
<213> Brassica napus

<400> 6
atggctcaat cttcaaggat ttgccacggt gttcagaacc cttgtgtgat catatccaat
60

ctcagtaaga gcaatcagaa caaatcaccc ttctctgtct ccctcaaaac tcatcaacca
120

cgtgcatcta gttggggatt gaagaaaagt gggacaatgc tgaacggatc agtcattagg
180

cctgtaaagg ttacagcctc tgtgtccacg agtgaaaagg caagcgagat cgtcttacaa
240

ccgattagag aaatctctgg gcttatcaag ttgcctggct ccaaatcact ctccaatagg
300

atacttcttt tggctgcact gagtgaaggc acaactgttg tggacaactt gctcaactcc
360

gatgatatca actacatgct tgacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat
420

agcgttaaca atcgtgctgt cgtagaagga tgtggtggca tctttcctgc atctctggat
480

tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgctgcaa cagccatgag accgttaact
540

gctgctgtta ccgcagctgg aggaaatgct agttatgtgc ttgatggtgt tccaagaatg
600

agggaaaggc caatagggga tttggtcgtc ggactgaaac agctcggtgc tgacgttgaa
660

tgtactttag gcacaaactg tcctcccgtg cgtgttaacg caaatggtgg actgcctggt
720

ggaaaggtca agttgtctgg ctccatttcc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct
780

gcaccacttg ccttaggtga tgtggagatt gagatcattg acaagctcat atctgttccg
840

tacgtggaaa tgacacttaa gctgatggaa agattcggag tttcagccga acattccgat
900

agctgggatc gtttctttgt aaagggtggg cagaagtaca agtctcctgg caatgcttat
960

gtggaaggtg acgcttcttc agctagttac ttcttggctg gtgcagccat aactggcgag
1020

acagttaccg tggaaggatg cggaactacc agcctccaag gtgatgtcaa gttcgcagag
1080

gtgttggaaa agatggggtg caaagtttcc tggacagaga actcagttac tgtaacggga
1140

cctagtaggg atgcttttgg gatgcgtcac cttagggcag ttgacgtgaa catgaacaag
1200

atgccagatg tcgctatgac tttagcagtt gtggcactgt ttgccgatgg tcctacaacg
1260

attagggacg tagcttcttg gagagtcaaa gaaactgaga ggatgatcgc catttgtact
1320

gagcttcgta agttgggtgc cacagttgaa gaagggtccg attactgcgt gattactcct
1380

ccagctaaag ttaagcctgc tgagattgat acctatgatg accacagaat ggctatggcc
1440

tttagcctcg ctgcatgtgc cgatgttcca gtcacgatca aggaccctgg ctgtactaga
1500

aagacatttc ccgactactt tcaagtgctt gagtcaatca cgaaacactg a
1551

<210> 7
<211> 1551
<212> ADN
<213> Brassica napus

<400> 7
atggctcaat cttcaaggat ttgccacggt gttcagaacc cttgtgtgat catatccaat
60

ctcagtaaga gcaatcagaa caaatcaccc ttctctgtct ccctcaaaac tcatcaacca
120

cgtgcatcta gttggggatt gaagaaaagc ggaacaatgc tgaacggatc agtcattagg
180

cctgtaaagg ttactgcatc tgtgtccacg agtgaaaagg caagcgagat cgtcttacaa
240

ccgattagag aaatctctgg gcttatcaag ttgcctggct ccaaatcact ctccaatagg
300

atacttcttt tggctgcact gagtgaaggc acaactgttg tggacaactt gctcaactcc
360

gatgatatca actacatgct tgacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat
420

agcgttaaca atcgtgctgt cgtagaagga tgtggtggaa tctttcctgc atctctggat
480

tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgctgcaa cagccatgag atccttaact
540

gctgctgtta ccgcagctgg tggaaatgct agttatgtgc ttgatggtgt tccaagaatg
600

agggaaaggc caatagggga tttggtcgtc ggactcaaac agctcggtgc tgacgttgaa
660

tgtactttag gcacaaactg tcctcccgtg cgtgttaacg caaatggtgg actgcctggt
720

ggaaaagtca agttgtctgg ctccatttcc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct
780

gcaccacttg ccttaggtga tgtggagatt gagatcattg acaagctcat atctgttccg
840

tacgtggaaa tgacacttaa gctgatggaa agattcggag tttcagccga acattccgat
900

agctgggatc gtttctttgt aaagggaggg cagaagtaca agtctcctgg aaacgcatac
960

gtggaaggtg acgcttcttc agctagttac ttcttggctg gtgcagccat aactggcgag
1020

acagttaccg tggaaggatg cggaactacc agcctccaag gtgatgtcaa gttcgcagag
1080

gtgttggaaa agatggggtg caaagtttcc tggacagaga actcagttac tgtaacggga
1140

cctagtaggg atgcttttgg gatgcgtcac cttagagccg ttgacgtgaa catgaacaag
1200

atgccagatg tcgctatgac cttagctgtg gttgcactgt ttgccgatgg tcctacaacg
1260

attagggacg tagcctcttg gagagtcaaa gaaaccgaga ggatgatcgc catttgtact
1320

gagcttcgta agttgggtgc cacagttgaa gaagggtccg attactgcgt gattactcct
1380

ccagctaaag ttaagccagc agagattgat acctatgatg accacagaat ggctatggct
1440

ttcagcctcg ctgcatgtgc cgatgttcca gtcacgatca aggaccctgg ctgtactaga
1500

aagacatttc ccgactactt tcaagtgctt gagtcaatca cgaaacactg a
1551

<210> 8
<211> 1551
<212> ADN
<213> Brassica napus

<400> 8
atggctcaat cttcaaggat ttgccacggt gttcagaacc cttgtgtgat catatccaat
60

ctcagtaaga gcaatcagaa caaatcaccc ttctctgtct ccctgaaaac tcatcaacca
120

cgtgcatcta gttggggatt gaagaaaagt ggcacaatgc tgaacggatc agtcattagg
180

cctgtaaagg ttacagcctc tgtgtccacg agtgaaaagg caagcgagat cgtcttacaa
240

ccgattagag aaatctctgg gcttatcaag ttgcctggct ccaaatcact ctccaatagg
300

atacttcttt tggctgcact gagtgaaggg acaactgttg tggacaactt gctcaactcc
360

gatgatatca actacatgct tgacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat
420

agcgttaaca atcgtgctgt cgtagaagga tgtggtggaa tctttcctgc atctctggat
480

tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgctggca tcgccatgag atccttaact
540

gctgctgtta ccgcagctgg tggaaatgct agttatgtgc ttgatggtgt tccaagaatg
600

agggaaaggc caatagggga tttggttgtc ggactcaaac agctcggtgc tgacgttgaa
660

tgtactttag gcacaaactg tcctcccgtg cgtgttaacg caaatggtgg actgcctggt
720

ggaaaggtca agttgtctgg ctccatttcc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct
780

gcaccacttg ccttaggtga tgtggagatt gagatcattg acaagctcat atctgttccg
840

tacgtggaaa tgacacttaa gctgatggaa agattcggag tttcagccga acattccgat
900

agctgggatc gtttcttcgt aaagggaggg cagaagtaca agtctcctgg gaacgcatac
960

gtggaaggtg acgcttcttc agctagttac ttcttggctg gtgcagccat aactggcgag
1020

acagttaccg tggaaggatg cggaactacc agccttcaag gtgatgtcaa gttcgcagag
1080

gtgttggaaa agatggggtg caaagtttcc tggacagaga actcagttac tgtaacggga
1140

cctagtaggg atgcttttgg aatgagacac cttagggcag ttgacgtgaa catgaacaag
1200

atgccagatg tcgctatgac tttagctgta gtggcactgt tcgcagatgg tcctacaacg
1260

ataagggacg tagcctcttg gagagtcaaa gaaaccgaga ggatgatcgc catttgtact
1320

gagcttcgta agttgggtgc cacagttgaa gaagggtccg attactgcgt gattactcct
1380

ccagctaaag ttaagccagc agagattgat acctatgatg accacagaat ggctatggcc
1440

tttagcctcg ctgcatgtgc cgatgttcca gtcacgatca aggaccctgg ctgtactaga
1500

aagacatttc ccgactactt tcaagtgctt gagtcaatca cgaaacactg a
1551

<210> 9
<211> 1533
<212> ADN
<213> Triticum aestivum

<400> 9
atggcaatgg ctgctgctgc tactatggct gcaagcgctt cctcttccgc tgtgagctta
60

gacagagcag ctccagcacc atctaggcgt ctgccaatgc cagcagctag accagctagg
120

agaggtgcag tccgtttgtg gggaccaagg ggagcagctg cacgtgctac aagtgtcgca
180

gcaccagcag caccgagtgg agctgaggaa gtcgtgcttc aacctatcag agagatcagc
240

ggtgccgtcc agctccctgg gtcaaagtca cttagcaaca gaatacttct tttgagcgca
300

ttgtcagagg gcacgacagt ggtggataac cttctgaact ctgaagatgt tcactacatg
360

cttgaggctt tggaggcatt aggtctttct gttgaagccg ataaggttgc taagcgtgct
420

gtggtggttg gttgcggagg gagattccca gttgagaaag atgctcaaga ggaagttaag
480

ctgtttctgg gaaatgctgg gattgcaatg aggagcttga ctgctgctgt ggttgctgct
540

ggtggaaatg ccacatacgt ccttgatgga gtgcctagaa tgagagagag accgattggg
600

gatctggtgg ttggccttca gcaacttgga gcagacgctg actgctttct tggaacaaac
660

tgtccacccg ttaggatcaa cgggaaagga ggtctccctg gtgggaaggt taagttgtct
720

ggatcaatct ctagtcagta tctgtcatca cttctcatgg ctgcacctct tgcacttgaa
780

gatgttgaga ttgaaatcat agacaaactc atatcagttc catacgtgga aatgacgctg
840

aagctgatgg agaggttcgg agtgacagca gagcactcag attcttggga taggttctac
900

atcaagggag gtcagaagta caaatcacct gggaacgctt acgtggaagg tgatgcctct
960

tctgcttcct acttcctcgc tggagcagca atcaccggag gaactgttac tgtcgaaggt
1020

tgcggaacta cttccttgca aggggacgtc aagttcgcag aagtcttaga aatgatggga
1080

gctaaagtta cttggaccga tacaagtgtt acagtgactg gtcctccacg tcaacccttt
1140

ggaaggaagc acctcaaagc cgttgatgtt aacatgaaca agatgccaga tgtcgccatg
1200

acgcttgccg ttgtggctct gttcgcagat ggtcccacag ccattagaga cgtggccagc
1260

tggagggtga aagaaactga aaggatggtc gccattagaa cagagttaac caaacttgga
1320

gctactgtgg aagagggacc cgactattgc atcattacac ctcccgagaa gctgaacata
1380

accgctattg acacttatga tgatcatcgt atggctatgg ccttttcatt agcagcttgc
1440

gctgaggtgc cagtaaccat tagagatcct gggtgtacta ggaaaacttt ccctaactac
1500

ttcgatgtcc tttcaacatt cgtgaagaat tga
1533

<210> 10
<211> 1281
<212> ADN
<213> Streptomyces roseosporus

<400> 10
atgacggtga tagagatacc tgggtctaag tctgttacag ccagagcact gttcttggca
60

gctgctgccg atgggacgac tactcttctt agaccattgc gtagcgatga cactgagggc
120

ttcgcagaag gactgaggaa tctgggctat gctgtggaac aagaggctga taggtggcgt
180

gtccaaggca gaccagctgg accagcagcc acggaagcag atgtctattg cagagatggt
240

gccaccaccg ctaggttcct tccgacactg gcagcagcag ctgcttccgg aacctacaga
300

ttcgacgctt cagcacagat gcgtcgtcgt ccccttgctc cattgacaag ggcacttaca
360

gccttgggtg tggatcttag acacgaagga gcagacggac atcatccgct caccgttcgt
420

gcagctggca tcgaaggagg agaattgacg ctcgacgctg gcgagtccag ccaatacttg
480

acagcactgc tcatgctcgg acctcttaca acaaagggac ttcgcatcga agttacagaa
540

ctcgtctctg caccctacgt ggaaatcacc ctcgctatga tgagagactt tggtgtggag
600

gttgagaggg aggggaatac cttcaccgtt ccaagcccat cttcaagact taggtccaat
660

agaggtggac ccataggagg ctatagagct actacgtatg ctgtcgagcc agatgcctca
720

actgcctctt acttctttgc agctgctgcc ctcactggtc gcgaggtcac agtgcctgga
780

ttggggactg gagctttgca aggtgatttg cgtttcgtgg atgtgctgag agaaatgggt
840

gccgaggtgt ctgttggtcc ggacgccaca actgtgcgct caactggcag attgagggga
900

atcactgtga acatgagaga tatctcagac acgatgccta cactcgcagc tattgcacct
960

tatgccgatg gtccagtggt gattgaagat gttgccaaca cccgtgtgaa ggagtgtgac
1020

cgtctggagg cttgtgctga gaatctgagg gcaatgggaa tcaccgtcca tacgggtccg
1080

gataggatag aaatccatcc tggaacacct aaaccgactg ggatcgccac ccacggagat
1140

caccgcatag tcatgtcatt tgccgtcgct ggccttcgca ctcctggcct cacttacgac
1200

gaccctggct gcgtgcgtaa gaccttccct agatttcacg aggtgtttgc cgacttcgct
1260

cacgaccttg agggaaggtg a
1281

<210> 11
<211> 1248
<212> ADN
<213> Streptomyces griseus

<400> 11
atgggtgcag tgacagtcat cgacattcct ggaagcaaga gcgtgacagc aagggcactc
60

ttcttggcag cagcagccga tggaacgaca acactgcttc gtcctctgag gtcagacgac
120

acggaggggt ttgccgaggg tcttaagaat ctcggttatg ccgttgagca agaggctgac
180

cgttggaggg tcgaaggcag accggatggt ccagctgctc cggatgcaga tgtctactgc
240

cgtgatggtg caacgactgc acgctttctt ccaaccctcg tcgcagcagc agcttctgga
300

acgtatcgtt tcgacgcctc agcacagatg aggagacgtc ccttggctcc actcactagg
360

gcactgacag ctcttggcgt ggatttgaga catggtggag aggagggtca tcatccactg
420

actgtcagag ctgctggcat agaaggtggc gatgttgtcc ttgacgctgg tgaatcttct
480

cagtatctca cagcccttct tatgttgggt ccgttgactg ccaaaggtct tagaatcgaa
540

gtcactgatc tcgtgagcgc tccttacgtt gaaatcactc tggccatgat gagagatttc
600

ggagttgatg ttagcagaga aggaaacact ttcaccgtgc cgtccggagg ctatagagct
660

acagcctacg ctgtggagcc agacgcaagc acggcttctt acttctttgc agcagctgcc
720

ctcactggac gcgaggtgac ggtccctggg ctgggaattg gtgctcttca aggagacctt
780

cgttttgtgg acgtgctgcg tgatatggga gcagaggtgt ctgttggacc agatgccacg
840

acagtgcgct caactggcag actccgtggc attacagtta ctatgagaga catttcagac
900

acgatgccaa cactcgctgc tattgcacct cacgctgatg gacccgtccg tattgaggac
960

gtggcaaaca ctcgtgtcaa ggaatgtgat aggcttgagg catgtgctca aaaccttaga
1020

gctatgggaa tcacggtgca tactgggcac gattggattg agattctccc tgggactcca
1080

aagccaacgg gaatagctac gcacggagat cacagaatcg ttatgtcctt cgcagtggct
1140

ggtttgttga cccctgggct gacatacgat gatcctggct gcgtccgcaa gacttttcca
1200

aggttccacg aagttttcgc tgactttgct gcatcacccc aagcctga
1248

<210> 12
<211> 1368
<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 12
atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaaattgt tctggaaccg
60

attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggtagca aaagcctgag caatcgtatt
120

ctgctgctgg cagcactgag cgaaggcacc accgttgttg ataatctgct gtatagcgaa
180

gatattcatt atatgctggg tgcactgcgt accctgggtc tgcgtgttga agatgataaa
240

accaccaaac aggccattgt tgaaggttgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc
300

aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcaggcaccg caatgcgtcc gctgaccgca
360

gcagttgttg cagccggtgg taatgcaagc tatgttctgg atggtgttcc gcgtatgcgt
420

gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggt ctgaaacagc tgggtgcaga tgttgattgt
480

tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggta aaggtggtct gccgggtggt
540

aaagttaaac tgagcggtag cgttagcagc cagtatctga ccgcactgct gatggcagct
600

ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat
660

gttgaaatga ccctgaaact gatggaacgt tttggtgtta gcgttgaaca tagcggtaat
720

tgggatcgtt ttctggttca tggtggccag aaatataaat ctccgggtaa tgcctttgtt
780

gaaggtgatg caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cggtggtaca
840

attaccgtta atggttgtgg caccagcagc ctgcagggcg atgttaaatt tgccgaagtg
900

ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcggtccg
960

ccgcgtgatt ttagcggtcg taaagttctg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg
1020

ccggatgttg ccatgaccct ggcagttgtt gccctgtttg caaatggtcc gaccgcaatt
1080

cgtgatgttg caagctggcg tgttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa
1140

ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg
1200

gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgtatggc aatggcattt
1260

agcctggcag catgtggtga tgttccggtg accattaaag atccgggttg tacacgtaaa
1320

acctttccag attattttga agttctggaa cgcctgacca aacattaa
1368

<210> 13
<211> 1368
<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 13
atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaaattgt tctggaaccg
60

attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggtagca aaagcctgag caatcgtatt
120

ctgctgctgg cagcactgag cgaaggcacc accgttgttg ataatctgct gtatagcgaa
180

gatattcatt atatgctggg tgcactgcgt accctgggtc tgcgtgttga agatgataaa
240

accaccaaac aggccattgt tgaaggttgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc
300

aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcagcaaccg caatgcgtcc gctgaccgca
360

gcagttgttg cagccggtgg taatgcaagc tatgttctgg atggtgttcc gcgtatgcgt
420

gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggt ctgaaacagc tgggtgcaga tgttgattgt
480

tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggta aaggtggtct gccgggtggt
540

aaagttaaac tgagcggtag cgttagcagc cagtatctga ccgcactgct gatggcagct
600

ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat
660

gttgaaatga ccctgaaact gatggaacgt tttggtgtta gcgttgaaca tagcggtaat
720

tgggatcgtt ttctggttca tggtggccag aaatataaat ctccgggtaa tgcctttgtt
780

gaaggtgatg caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cggtggtaca
840

attaccgtta atggttgtgg caccagcagc ctgcagggcg atgttaaatt tgccgaagtg
900

ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcggtccg
960

ccgcgtgatt ttagcggtcg taaagttctg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg
1020

ccggatgttg ccatgaccct ggcagttgtt gccctgtttg caaatggtcc gaccgcaatt
1080

cgtgatgttg caagctggcg tgttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa
1140

ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg
1200

gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgtatggc aatggcattt
1260

agcctggcag catgtggtga tgttccggtg accattaaag atccgggttg tacacgtaaa
1320

acctttccag attattttga agttctggaa cgcctgacca aacattaa
1368

<210> 14
<211> 1368
<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 14
atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaaattgt tctggaaccg
60

attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggtagca aaagcctgag caatcgtatt
120

ctgctgctgg cagcactgag cgaaggcacc accgttgttg ataatctgct gtatagcgaa
180

gatattcatt atatgctggg tgcactgcgt accctgggtc tgcgtgttga agatgataaa
240

accaccaaac aggccattgt tgaaggttgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc
300

aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcagcaaccg caatgcgtag cctgaccgca
360

gcagttgttg cagccggtgg taatgcaagc tatgttctgg atggtgttcc gcgtatgcgt
420

gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggt ctgaaacagc tgggtgcaga tgttgattgt
480

tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggta aaggtggtct gccgggtggt
540

aaagttaaac tgagcggtag cgttagcagc cagtatctga ccgcactgct gatggcagct
600

ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat
660

gttgaaatga ccctgaaact gatggaacgt tttggtgtta gcgttgaaca tagcggtaat
720

tgggatcgtt ttctggttca tggtggccag aaatataaat ctccgggtaa tgcctttgtt
780

gaaggtgatg caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cggtggtaca
840

attaccgtta atggttgtgg caccagcagc ctgcagggcg atgttaaatt tgccgaagtg
900

ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcggtccg
960

ccgcgtgatt ttagcggtcg taaagttctg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg
1020

ccggatgttg ccatgaccct ggcagttgtt gccctgtttg caaatggtcc gaccgcaatt
1080

cgtgatgttg caagctggcg tgttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa
1140

ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg
1200

gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgtatggc aatggcattt
1260

agcctggcag catgtggtga tgttccggtg accattaaag atccgggttg tacacgtaaa
1320

acctttccag attattttga agttctggaa cgcctgacca aacattaa
1368

<210> 15
<211> 1368
<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 15
atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaaattgt tctggaaccg
60

attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggtagca aaagcctgag caatcgtatt
120

ctgctgctgg cagcactgag cgaaggcacc accgttgttg ataatctgct gtatagcgaa
180

gatattcatt atatgctggg tgcactgcgt accctgggtc tgcgtgttga agatgataaa
240

accaccaaac aggccattgt tgaaggttgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc
300

aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcaggcatcg caatgcgtag cctgaccgca
360

gcagttgttg cagccggtgg taatgcaagc tatgttctgg atggtgttcc gcgtatgcgt
420

gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggt ctgaaacagc tgggtgcaga tgttgattgt
480

tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggta aaggtggtct gccgggtggt
540

aaagttaaac tgagcggtag cgttagcagc cagtatctga ccgcactgct gatggcagct
600

ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat
660

gttgaaatga ccctgaaact gatggaacgt tttggtgtta gcgttgaaca tagcggtaat
720

tgggatcgtt ttctggttca tggtggccag aaatataaat ctccgggtaa tgcctttgtt
780

gaaggtgatg caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cggtggtaca
840

attaccgtta atggttgtgg caccagcagc ctgcagggcg atgttaaatt tgccgaagtg
900

ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcggtccg
960

ccgcgtgatt ttagcggtcg taaagttctg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg
1020

ccggatgttg ccatgaccct ggcagttgtt gccctgtttg caaatggtcc gaccgcaatt
1080

cgtgatgttg caagctggcg tgttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa
1140

ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg
1200

gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgtatggc aatggcattt
1260

agcctggcag catgtggtga tgttccggtg accattaaag atccgggttg tacacgtaaa
1320

acctttccag attattttga agttctggaa cgcctgacca aacattaa
1368

<210> 16
<211> 1350
<212> ADN
<213> Brassica napus

<400> 16
atgaccagcg aaaaagccag cgaaattgtt ctgcagccga ttcgtgaaat tagcggtctg
60

attaaactgc ctggtagcaa aagcctgagc aatcgtattc tgctgctggc agcactgagc
120

gaaggcacca ccgttgttga taatctgctg aacagcgacg atattaacta tatgctggat
180

gccctgaaaa aactgggtct gaatgttgaa cgtgatagcg ttaataatcg tgccgttgtt
240

gaaggttgtg gtggcatttt tccggcaagc ctggatagca aatccgatat cgaactgtat
300

ctgggtaatg cagccaccgc aatgcgtccg ctgaccgcag cagttaccgc agccggtggt
360

aatgcaagct atgttctgga tggtgttccg cgtatgcgtg aacgtccgat tggtgatctg
420

gttgttggtc tgaaacagct gggtgcagat gttgaatgta ccctgggcac caattgtccg
480

cctgttcgtg ttaatgcaaa tggtggtctg cctggtggta aagttaaact gagcggtagc
540

attagcagcc agtatctgac cgcactgctg atggcagctc cgctggcact gggtgatgtt
600

gaaatcgaga ttattgataa actgatcagc gttccgtatg ttgaaatgac cctgaaactg
660

atggaacgtt ttggtgttag cgcagaacat agcgatagct gggatcgctt ttttgttaaa
720

ggtggccaga aatataaatc tccgggtaac gcctatgttg aaggtgatgc aagcagcgca
780

tcttattttc tggcaggcgc agcaattacc ggtgaaaccg ttaccgttga aggttgcggt
840

acaaccagcc tgcagggtga tgttaaattt gccgaagtgc tggaaaaaat gggttgtaaa
900

gtgagctgga ccgaaaatag cgttaccgtt accggtccga gccgtgatgc atttggtatg
960

cgtcatctgc gtgcagttga tgtgaacatg aacaaaatgc cggatgttgc catgaccctg
1020

gcagttgttg cactgtttgc agatggtccg accaccattc gtgatgttgc aagctggcgt
1080

gttaaagaaa ccgaacgcat gattgcaatt tgtaccgaac tgcgtaaact gggtgcaacc
1140

gttgaagaag gtagcgatta ttgcgttatt acccctccgg caaaagttaa accggcagaa
1200

atcgatacct atgatgatca tcgtatggca atggcattta gcctggcagc atgtgcagat
1260

gttccggtga ccattaaaga tccgggttgt acacgtaaaa cctttccgga ttattttcag
1320

gtgctggaaa gcatcaccaa acactaataa
1350

<210> 17

<211> 1347
<212> ADN
<213> Brassica napus

<400> 17
atgaccagcg aaaaagccag cgaaattgtt ctgcagccga ttcgtgaaat tagcggtctg
60

attaaactgc ctggtagcaa aagcctgagc aatcgtattc tgctgctggc agcactgagc
120

gaaggcacca ccgttgttga taatctgctg aacagcgacg atattaacta tatgctggat
180

gccctgaaaa aactgggtct gaatgttgaa cgtgatagcg ttaataatcg tgccgttgtt
240

gaaggttgtg gtggcatttt tccggcaagc ctggatagca aatccgatat cgaactgtat
300

ctgggtaatg cagccaccgc aatgcgtagc ctgaccgcag cagttaccgc agccggtggt
360

aatgcaagct atgttctgga tggtgttccg cgtatgcgtg aacgtccgat tggtgatctg
420

gttgttggtc tgaaacagct gggtgcagat gttgaatgta ccctgggcac caattgtccg
480

cctgttcgtg ttaatgcaaa tggtggtctg cctggtggta aagttaaact gagcggtagc
540

attagcagcc agtatctgac cgcactgctg atggcagctc cgctggcact gggtgatgtt
600

gaaatcgaga ttattgataa actgatcagc gttccgtatg ttgaaatgac cctgaaactg
660

atggaacgtt ttggtgttag cgcagaacat agcgatagct gggatcgctt ttttgttaaa
720

ggtggccaga aatataaatc tccgggtaac gcctatgttg aaggtgatgc aagcagcgca
780

tcttattttc tggcaggcgc agcaattacc ggtgaaaccg ttaccgttga aggttgcggt
840

acaaccagcc tgcagggtga tgttaaattt gccgaagtgc tggaaaaaat gggttgtaaa
900

gtgagctgga ccgaaaatag cgttaccgtt accggtccga gccgtgatgc atttggtatg
960

cgtcatctgc gtgcagttga tgtgaacatg aacaaaatgc cggatgttgc catgaccctg
1020

gcagttgttg cactgtttgc agatggtccg accaccattc gtgatgttgc aagctggcgt
1080

gttaaagaaa ccgaacgcat gattgcaatt tgtaccgaac tgcgtaaact gggtgcaacc
1140

gttgaagaag gtagcgatta ttgcgttatt acccctccgg caaaagttaa accggcagaa
1200

atcgatacct atgatgatca tcgtatggca atggcattta gcctggcagc atgtgcagat
1260

gttccggtga ccattaaaga tccgggttgt acacgtaaaa cctttccgga ttattttcag
1320

gtgctggaaa gcatcaccaa acactaa
1347

<210> 18
<211> 1350
<212> ADN
<213> Brassica napus

<400> 18
atgaccagcg aaaaagccag cgaaattgtt ctgcagccga ttcgtgaaat tagcggtctg
60

attaaactgc ctggtagcaa aagcctgagc aatcgtattc tgctgctggc agcactgagc
120

gaaggcacca ccgttgttga taatctgctg aacagcgacg atattaacta tatgctggat
180

gccctgaaaa aactgggtct gaatgttgaa cgtgatagcg ttaataatcg tgccgttgtt
240

gaaggttgtg gtggcatttt tccggcaagc ctggatagca aatccgatat cgaactgtat
300

ctgggtaatg caggtattgc aatgcgtagc ctgaccgcag cagttaccgc agccggtggt
360

aatgcaagct atgttctgga tggtgttccg cgtatgcgtg aacgtccgat tggtgatctg
420

gttgttggtc tgaaacagct gggtgcagat gttgaatgta ccctgggcac caattgtccg
480

cctgttcgtg ttaatgcaaa tggtggtctg cctggtggta aagttaaact gagcggtagc
540

attagcagcc agtatctgac cgcactgctg atggcagctc cgctggcact gggtgatgtt
600

gaaatcgaga ttattgataa actgatcagc gttccgtatg ttgaaatgac cctgaaactg
660

atggaacgtt ttggtgttag cgcagaacat agcgatagct gggatcgctt ttttgttaaa
720

ggtggccaga aatataaatc tccgggtaac gcctatgttg aaggtgatgc aagcagcgca
780

tcttattttc tggcaggcgc agcaattacc ggtgaaaccg ttaccgttga aggttgcggt
840

acaaccagcc tgcagggtga tgttaaattt gccgaagtgc tggaaaaaat gggttgtaaa
900

gtgagctgga ccgaaaatag cgttaccgtt accggtccga gccgtgatgc atttggtatg
960

cgtcatctgc gtgcagttga tgtgaacatg aacaaaatgc cggatgttgc catgaccctg
1020

gcagttgttg cactgtttgc agatggtccg accaccattc gtgatgttgc aagctggcgt
1080

gttaaagaaa ccgaacgcat gattgcaatt tgtaccgaac tgcgtaaact gggtgcaacc
1140

gttgaagaag gtagcgatta ttgcgttatt acccctccgg caaaagttaa accggcagaa
1200

atcgatacct atgatgatca tcgtatggca atggcattta gcctggcagc atgtgcagat
1260

gttccggtga ccattaaaga tccgggttgt acacgtaaaa cctttccgga ttattttcag
1320

gtgctggaaa gcatcaccaa acactaataa
1350

<210> 19
<211> 1371
<212> ADN
<213> Triticum aestivum

<400> 19
atggcaacca gcgttgcagc accggcagct ccgtctggtg ccgaagaagt tgttctgcag
60

ccgattcgtg aaattagcgg tgcagttcag ctgcctggta gcaaaagcct gagcaatcgt
120

attctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc
180

gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat
240

aaagttgcaa aacgtgccgt tgttgttggt tgtggtggtc gttttccggt tgaaaaagat
300

gcacaggaag aagttaaact gtttctgggt aatgccggta ccgcaatgcg tccgctgacc
360

gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatggtgt tccgcgtatg
420

cgtgaacgtc cgattggtga tctggttgtt ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat
480

tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gtaaaggtgg tctgccgggt
540

ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca
600

gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg
660

tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttggtg ttaccgcaga acatagcgat
720

agctgggatc gcttttatat taaaggtggc cagaaatata aatctccggg taatgcctat
780

gttgaaggtg atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc
840

accgttaccg ttgaaggttg tggtacaacc agcctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa
900

gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt
960

ccgccgcgtc agccgtttgg tcgtaaacat ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa
1020

atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca
1080

attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgttaaa gaaaccgaac gtatggttgc aattcgtacc
1140

gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaaggtccgg attattgcat tattacaccg
1200

ccggaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca
1260

tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt
1320

aaaacctttc cgaattattt tgatgttctg agcacctttg tgaaaaatta a
1371

<210> 20
<211> 1371
<212> ADN
<213> Triticum aestivum

<400> 20
atggcaacca gcgttgcagc accggcagct ccgtctggtg ccgaagaagt tgttctgcag
60

ccgattcgtg aaattagcgg tgcagttcag ctgcctggta gcaaaagcct gagcaatcgt
120

attctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc
180

gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat
240

aaagttgcaa aacgtgccgt tgttgttggt tgtggtggtc gttttccggt tgaaaaagat
300

gcacaggaag aagttaaact gtttctgggt aatgccgcaa ccgcaatgcg tccgctgacc
360

gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatggtgt tccgcgtatg
420

cgtgaacgtc cgattggtga tctggttgtt ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat
480

tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gtaaaggtgg tctgccgggt
540

ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca
600

gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg
660

tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttggtg ttaccgcaga acatagcgat
720

agctgggatc gcttttatat taaaggtggc cagaaatata aatctccggg taatgcctat
780

gttgaaggtg atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc
840

accgttaccg ttgaaggttg tggtacaacc agcctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa
900

gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt
960

ccgccgcgtc agccgtttgg tcgtaaacat ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa
1020

atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca
1080

attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgttaaa gaaaccgaac gtatggttgc aattcgtacc
1140

gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaaggtccgg attattgcat tattacaccg
1200

ccggaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca
1260

tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt
1320

aaaaacctttc cgaattattt tgatgttctg agcacctttg tgaaaaatta a
1371

<210> 21
<211> 1371
<212> ADN
<213> Triticum aestivum

<400> 21
atggcaacca gcgttgcagc accggcagct ccgtctggtg ccgaagaagt tgttctgcag
60

ccgattcgtg aaattagcgg tgcagttcag ctgcctggta gcaaaagcct gagcaatcgt
120

attctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc
180

gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat
240

aaagttgcaa aacgtgccgt tgttgttggt tgtggtggtc gttttccggt tgaaaaagat
300

gcacaggaag aagttaaact gtttctgggt aatgccgcaa ccgcaatgcg tagcctgacc
360

gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatggtgt tccgcgtatg
420

cgtgaacgtc cgattggtga tctggttgtt ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat
480

tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gtaaaggtgg tctgccgggt
540

ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca
600

gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg
660

tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttggtg ttaccgcaga acatagcgat
720

agctgggatc gcttttatat taaaggtggc cagaaatata aatctccggg taatgcctat
780

gttgaaggtg atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc
840

accgttaccg ttgaaggttg tggtacaacc agcctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa
900

gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt
960

ccgccgcgtc agccgtttgg tcgtaaacat ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa
1020

atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca
1080

attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgttaaa gaaaccgaac gtatggttgc aattcgtacc
1140

gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaaggtccgg attattgcat tattacaccg
1200

ccggaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca
1260

tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt
1320

aaaacctttc cgaattattt tgatgttctg agcacctttg tgaaaaatta a
1371

<210> 22
<211> 1371
<212> ADN
<213> Triticum aestivum

<400> 22
atggcaacca gcgttgcagc accggcagct ccgtctggtg ccgaagaagt tgttctgcag
60

ccgattcgtg aaattagcgg tgcagttcag ctgcctggta gcaaaagcct gagcaatcgt
120

attctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc
180

gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat
240

aaagttgcaa aacgtgccgt tgttgttggt tgtggtggtc gttttccggt tgaaaaagat
300

gcacaggaag aagttaaact gtttctgggt aatgccggta ttgcaatgcg tagcctgacc
360

gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatggtgt tccgcgtatg
420

cgtgaacgtc cgattggtga tctggttgtt ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat
480

tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gtaaaggtgg tctgccgggt
540

ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca
600

gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg
660

tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttggtg ttaccgcaga acatagcgat
720

agctgggatc gcttttatat taaaggtggc cagaaatata aatctccggg taatgcctat
780

gttgaaggtg atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc
840

accgttaccg ttgaaggttg tggtacaacc agcctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa
900

gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt
960

ccgccgcgtc agccgtttgg tcgtaaacat ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa
1020

atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca
1080

attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgttaaa gaaaccgaac gtatggttgc aattcgtacc
1140

gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaaggtccgg attattgcat tattacaccg
1200

ccggaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca
1260

tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt
1320

aaaaacctttc cgaattattt tgatgttctg agcacctttg tgaaaaatta a
1371

<210> 23
<211> 1281
<212> ADN
<213> Streptomyces roseosporus

<400> 23
atgaccgtta ttgaaattcc gggtagcaaa agcgttaccg cacgtgcact gtttctggca
60

gcagcagcag atggcaccac caccctgctg cgtccgctgc gtagtgatga taccgaaggt
120

tttgcagaag gtctgcgtaa tctgggttat gcagttgaac aggaagcaga tcgttggcgc
180

gttcagggtc gtccggcagg tccggctgca accgaagcag atgtttattg tcgtgatggt
240

gcaaccaccg cacgttttct gcctaccctg gcagccgcag ccgcaagcgg cacctatcgt
300

tttgatgcaa gcgcacagat gcgtcgtcgt ccgctggcac cgctgacccg tgcactgacc
360

gcactgggtg ttgatctgcg tcatgaaggt gcagatggtc atcatccgct gaccgttcgt
420

gcagcaggta ttgaaggtgg tgaactgacc ctggatgccg gtgaaagcag ccagtatctg
480

accgctctgc tgatgctggg tcctctgacc accaaaggtc tgcgcattga agttaccgaa
540

ctggttagcg caccgtatgt ggaaattacc ctggcaatga tgcgcgattt tggtgttgaa
600

gttgaacgtg aaggcaatac ctttaccgtt ccgagcccga gcagccgtct gcgtagcaat
660

cgtggtggtc cgattggtgg ttatcgtgca accacctatg ccgttgaacc ggatgcaagc
720

accgcaagct atttttttgc agcagcagcc ctgaccggtc gtgaagttac cgttccgggt
780

ctgggcacag gtgcactgca gggtgatctg cgttttgttg atgttctgcg tgaaatgggt
840

gcagaagtta gcgttggtcc ggatgccacc accgttcgta gcaccggtcg tctgcgtggt
900

attaccgtta atatgcgtga tattagcgat accatgccga cactggctgc aattgcaccg
960

tatgcagatg gtccggttgt tattgaagat gttgcaaata cccgtgtgaa agaatgtgat
1020

cgtctggaag catgtgcaga aaatctgcgt gccatgggta ttaccgtgca taccggtccg
1080

gatcgtattg aaattcatcc gggtacaccg aaaccgaccg gtattgcaac ccatggtgat
1140

catcgtattg ttatgagctt tgcagttgca ggtctgcgta caccgggtct gacctatgat
1200

gatccgggtt gtgttcgtaa aacctttccg cgttttcatg aagtgtttgc agattttgcc
1260

catgatctgg aaggtcgtta a
1281

<210> 24
<211> 1248
<212> ADN
<213> Streptomyces griseus

<400> 24
atgggtgcag ttaccgttat tgatattccg ggtagcaaaa gcgttaccgc acgtgcactg
60

tttctggcag cagcagcaga tggcaccacc accctgctgc gtccgctgcg tagtgatgat
120

accgaaggtt ttgcagaagg tctgaaaaat ctgggttatg cagttgaaca ggaagcagat
180

cgttggcgcg ttgaaggtcg tccggatggt ccggcagcac cggatgcaga tgtttattgt
240

cgtgatggtg caaccaccgc acgttttctg ccgaccctgg ttgcagcagc agccagcggc
300

acctatcgtt ttgatgcaag cgcacagatg cgtcgtcgtc cgctggcacc gctgacccgt
360

gcactgaccg cactgggtgt tgatctgcgt catggtggtg aagaaggtca tcatccgctg
420

accgttcgtg cagcaggtat tgaaggtggt gatgttgttc tggatgccgg tgaaagcagc
480

cagtatctga ccgctctgct gatgctgggt cctctgaccg caaaaggtct gcgtattgaa
540

gttaccgatc tggttagcgc accgtatgtg gaaattaccc tggcaatgat gcgcgatttt
600

ggtgttgatg ttagccgtga aggtaatacc tttaccgttc cgagcggtgg ttatcgtgca
660

accgcctatg ccgttgaacc ggatgcaagc accgcaagct atttttttgc agcagccgca
720

ctgaccggtc gtgaagttac cgttccgggt ctgggtattg gtgcactgca gggtgatctg
780

cgttttgttg atgttctgcg tgatatgggt gccgaagtta gcgttggtcc ggatgccacc
840

accgttcgta gcaccggtcg tctgcgtggt attaccgtta ccatgcgtga tattagtgat
900

accatgccga cactggcagc aattgcaccg catgccgatg gtccggttcg tattgaagat
960

gttgcaaata cccgtgtgaa agaatgtgat cgtctggaag catgtgcaca gaatctgcgt
1020

gcaatgggta ttaccgtgca taccggtcat gattggattg aaattctgcc tggtacaccg
1080

aaaccgaccg gtattgcaac ccatggtgat catcgtattg ttatgagctt tgcagttgca
1140

ggtctgctga caccgggtct gacctatgat gatccgggtt gtgttcgtaa aacctttccg
1200

cgttttcatg aagtgtttgc agattttgca gcaagtccgc aggcataa
1248

<210> 25
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 25
gatgtttatt gccgtgatgg tggaaccacc gcacgttttc
40

<210> 26
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 26
gaaaacgtgc ggtggttcca ccatcacggc aataaacatc
40

<210> 27
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora
<400> 27
gggtccgctg gcacgtcagg gtctgcgtat tcg
33

<210> 28
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 28
cgaatacgca gaccctgacg tgccagcgga cccagcagc
39

<210> 29
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 29
catatgaccg ttattgaaat tccggg
26

<210> 30
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 30
gatatcctat tattaacgac cttccag
27

<210> 31
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 31
catatgggtg cagttaccgt tattga
26

<210> 32
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 32

gatatcctat tattatgcct gcggac
26

<210> 33
<211> 213
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de tránsito del cloroplasto

<400> 33
atgcttgcta gacaaggtgg aagtctgaga gcttctcaat gcaacgctgg acttgctaga
60

agagttgaag ttggtgctct tgttgttcct agacctatct ctgttaacga cgttgttcct
120

cacgtttact ctgctccact ttctgttgct agaaggtctt gctctaagtc ctccattagg
180

tccactagaa ggcttcaaac tactgtgtgc tct
213

<210> 34
<211> 186
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de tránsito del cloroplasto

<400> 34
atgcaactcc tgaatcagag gcaagccctg cgtcttggtc gttcatctgc ttcaaagaac
60

cagcaagttg ctccactggc ctctaggcct gcttcttcct tgagcgtcag cgcatccagc
120

gtcgcacctg cacctgcttg ctcagctcct gctggagctg gaaggcgtgc tgttgtcgtg
180

agagca
186

<210> 35
<211> 198
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de tránsito del cloroplasto

<400> 35
atggctcaat ctagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttccaat
60

ctctccaaat ccaaccagaa caaatctcct ttctcagtca gcctcaagac tcaccagcag
120

cagcgtcgtg cttaccagat atctagctgg ggattgaaga agtcaaacaa cgggtccgtg
180

attcgtccgg ttaaggca
198

<210> 36
<211> 198
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de tránsito del cloroplasto

<400> 36
atggcacaag ccagccgtat ctgccagaat ccatgtgtga tatccaatct ccccaaaagc
60

aaccaccgta agtccccttt ctctgtctca ctcaagacgc atcagcctag agcctcttca
120

tggggactta agaagtctgg caccatgctg aacggttcag tgattagacc cgtcaaggtg
180

acagcttctg tttccgca
198

<210> 37
<211> 225
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de tránsito del cloroplasto

<400> 37
atggcacaat ctagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttcaaat
60

ctctcaaagt ccaatcagaa caaatcacct ttctccgtct ccctcaagac acaccagcat
120

ccaagggcat acccgataag cagctcatgg ggactcaaga agagcggaat gactctgatt
180

ggctctgagc ttcgtcctct taaggttatg tcctctgttt ccgca
225

<210> 38
<211> 207
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de tránsito del cloroplasto

<400> 38
atggcacaag ttagcagaat ctgtaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc
60

tcaaagtcca gccaacgtaa gtctcccctc agcgtgtctc tgaaaactca gcagcccaga
120

gcttcttcat ggggtttgaa gaaatctgga acgatgctta acggctcagt cattcgtccg
180

gttaaggtga cagcctccgt ctccgct
207

<210> 39
<211> 186
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de tránsito del cloroplasto

<400> 39
atgatacttg gatctagccc aactctgcca cacgcatcac atccagccag acctggtcct
60

gccagaccga tttcagtgaa cgacgtcgtt ccccatgtct actccgctcc tctctccgtg
120

gctaggcgtt cttgtagcaa gtccagcatt aggtctacgc gtagattgca gaccacagtc
180

tgctca
186

<210> 40
<211> 186
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de tránsito del cloroplasto

<400> 40
atggcacaga tcaacaagtc tgctaatggg gttaggaacg cttcactgat aagcaacttc
60

tccaataccc gtcaagccaa atccccctttc tccctctcat gcggaacaag actgaagaac
120

agcagcagag gtttgaagaa ggtggcagtt aggctcattg gctcccgtgt caaagtgtct
180

gcctca
186

<210> 41
<211> 207
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de tránsito del cloroplasto

<400> 41
atgcaactgc tcaaccagag acaagccttg aggctcggga ggtcctctgc ctctaagaat
60

cagcaagtgg caccgcttgc cagccgtccc atttctgtga acgacgtcgt gccacacgtc
120

tacagcgcac ctctgtccgt tgctagacgc tcctgctcta agtcatcaat ccgcagcact
180

agaaggcttc agacgaccgt ttgttca
207

<210> 42
<211> 1467
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fusión en marco de dgt-32 v3 y TraP14 v2

<400> 42
atgatacttg gatctagccc aactctgcca cacgcatcac atccagccag acctggtcct
60

gccagaccga tttcagtgaa cgacgtcgtt ccccatgtct actccgctcc tctctccgtg
120

gctaggcgtt cttgtagcaa gtccagcatt aggtctacgc gtagattgca gaccacagtc
180

tgctcaatga cggtgataga gatacctggg tctaagtctg ttacagccag agcactgttc
240

ttggcagctg ctgccgatgg gacgactact cttcttagac cattgcgtag cgatgacact
300

gagggcttcg cagaaggact gaggaatctg ggctatgctg tggaacaaga ggctgatagg
360

tggcgtgtcc aaggcagacc agctggacca gcagccacgg aagcagatgt ctattgcaga
420

gatggtgcca ccaccgctag gttccttccg acactggcag cagcagctgc ttccggaacc
480

tacagattcg acgcttcagc acagatgcgt cgtcgtcccc ttgctccatt gacaagggca
540

cttacagcct tgggtgtgga tcttagacac gaaggagcag acggacatca tccgctcacc
600

gttcgtgcag ctggcatcga aggaggagaa ttgacgctcg acgctggcga gtccagccaa
660

tacttgacag cactgctcat gctcggacct cttacaacaa agggacttcg catcgaagtt
720

acagaactcg tctctgcacc ctacgtggaa atcaccctcg ctatgatgag agactttggt
780

gtggaggttg agagggaggg gaataccttc accgttccaa gcccatcttc aagacttagg
840

tccaatagag gtggacccat aggaggctat agagctacta cgtatgctgt cgagccagat
900

gcctcaactg cctcttactt ctttgcagct gctgccctca ctggtcgcga ggtcacagtg
960

cctggattgg ggactggagc tttgcaaggt gatttgcgtt tcgtggatgt gctgagagaa
1020

atgggtgccg aggtgtctgt tggtccggac gccacaactg tgcgctcaac tggcagattg
1080

aggggaatca ctgtgaacat gagagatatc tcagacacga tgcctacact cgcagctatt
1140

gcaccttatg ccgatggtcc agtggtgatt gaagatgttg ccaacacccg tgtgaaggag
1200

tgtgaccgtc tggaggcttg tgctgagaat ctgagggcaa tgggaatcac cgtccatacg
1260

ggtccggata ggatagaaat ccatcctgga acacctaaac cgactgggat cgccacccac
1320

ggagatcacc gcatagtcat gtcatttgcc gtcgctggcc ttcgcactcc tggcctcact
1380

tacgacgacc ctggctgcgt gcgtaagacc ttccctagat ttcacgaggt gtttgccgac
1440

ttcgctcacg accttgaggg aaggtga
1467

<210> 43
<211> 1455
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Esta secuencia codificadora es una fusión en marco de dgt-33 v3 y TraP24 v2

<400> 43
atgcaactgc tcaaccagag acaagccttg aggctcggga ggtcctctgc ctctaagaat
60

cagcaagtgg caccgcttgc cagccgtccc atttctgtga acgacgtcgt gccacacgtc
120

tacagcgcac ctctgtccgt tgctagacgc tcctgctcta agtcatcaat ccgcagcact
180

agaaggcttc agacgaccgt ttgttcaatg ggtgcagtga cagtcatcga cattcctgga
240

agcaagagcg tgacagcaag ggcactcttc ttggcagcag cagccgatgg aacgacaaca
300

ctgcttcgtc ctctgaggtc agacgacacg gaggggtttg ccgagggtct taagaatctc
360

ggttatgccg ttgagcaaga ggctgaccgt tggagggtcg aaggcagacc ggatggtcca
420

gctgctccgg atgcagatgt ctactgccgt gatggtgcaa cgactgcacg ctttcttcca
480

accctcgtcg cagcagcagc ttctggaacg tatcgtttcg acgcctcagc acagatgagg
540

agacgtccct tggctccact cactagggca ctgacagctc ttggcgtgga tttgagacat
600

ggtggagagg agggtcatca tccactgact gtcagagctg ctggcataga aggtggcgat
660

gttgtccttg acgctggtga atcttctcag tatctcacag cccttcttat gttgggtccg
720

ttgactgcca aaggtcttag aatcgaagtc actgatctcg tgagcgctcc ttacgttgaa
780

atcactctgg ccatgatgag agatttcgga gttgatgtta gcagagaagg aaacactttc
840

accgtgccgt ccggaggcta tagagctaca gcctacgctg tggagccaga cgcaagcacg
900

gcttcttact tctttgcagc agctgccctc actggacgcg aggtgacggt ccctgggctg
960

ggaattggtg ctcttcaagg agaccttcgt tttgtggacg tgctgcgtga tatgggagca
1020

gaggtgtctg ttggaccaga tgccacgaca gtgcgctcaa ctggcagact ccgtggcatt
1080

acagttacta tgagagacat ttcagacacg atgccaacac tcgctgctat tgcacctcac
1140

gctgatggac ccgtccgtat tgaggacgtg gcaaacactc gtgtcaagga atgtgatagg
1200

cttgaggcat gtgctcaaaa ccttagagct atgggaatca cggtgcatac tgggcacgat
1260

tggattgaga ttctccctgg gactccaaag ccaacgggaa tagctacgca cggagatcac
1320

agaatcgtta tgtccttcgc agtggctggt ttgttgaccc ctgggctgac atacgatgat
1380

cctggctgcg tccgcaagac ttttccaagg ttccacgaag ttttcgctga ctttgctgca
1440

tcaccccaag cctga
1455

<210> 44
<211> 19

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 44
agccacatcc cagtaacga
19

<210> 45
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 45
cctccctctt tgacgcc
17

<210> 46
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos sonda

<400> 46
cagcccaatg aggcatcagc
20

<210> 47
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 47
cttcaaggag atttgggatt tgt
23

<210> 48
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 48
gagggtcggc atcgtat
17

<210> 49
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos sonda

<400> 49
agagaagttt cgacggattt cgggc
25

<210> 50
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 50
gaggattagg gtttcaacgg ag
22

<210> 51
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 51
gagaattgag ctgagacgag g
21

<210> 52
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 52
ctgcaggtca acggatcagg atat
24

<210> 53
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 53
tgggctgaat tgaagacatg ctcc
24

<210> 54
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 54
cgtccacaaa gctgaatgtg
20

<210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 55
cgaagtcatg gaagccactt
20

<210> 56
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 56
cttcaaggag atttgggatt tgt
23

<210> 57
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 57
gagggtcggc atcgtat
17

<210> 58
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 58
tgttcggttc cctctaccaa
20

<210> 59
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos sonda

<400> 59
cacagaaccg tcgcttcagc aaca
24

<210> 60
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 60

caacatccat caccttgact ga
22
Ol

<210> 61
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos sonda

<400> 61
cgagcagacc gccgtgtact tctacc
26

<210> 62
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 62
tggcggacga cgacttgt
18

<210> 63
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 63
aaagtttgga ggctgccgt
19

<210> 64
<211> 18
<212> ADNOligi
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 64
ttcagcaccc gtcagaat
18

<210> 65
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos sonda

<400> 65
tgccgagaac ttgaggaggt
20

<210> 66
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 66
tggtcgccat agcttgt
17

<210> 67
<211> 72
<212> PRT
<213> Streptomyces griseus

<400> 67

Asp Arg Trp Arg Val Glu Gly Arg Pro Asp Gly Pro Ala Ala Pro Asp
1 5 10 15

Ala Asp Val Tyr Cys Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro
20 25 30

Thr Leu Val Ala Ala Ala Ala Ser Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser
35 40 45

Ala Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu Ala Pro Leu Thr Arg Ala Leu Thr
50 55 60

Ala Leu Gly Val Asp Leu Arg His
65 70

<210> 68
<211> 72
<212> PRT
<213> Streptomyces roseosporus

<400> 68

Asp Arg Trp Arg Val Gln Gly Arg Pro Ala Gly Pro Ala Ala Thr Glu
1   5   10   15

Ala Asp Val Tyr Cys Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro
            20   25   30

Thr Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser
        35   40   45

Ala Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu Ala Pro Leu Thr Arg Ala Leu Thr
    50   55   60

Ala Leu Gly Val Asp Leu Arg His
65   70

<210> 69
<211> 71
<212> PRT
<213> Streptomyces sviceus

<400> 69

Asp Thr Trp Gln Val Asp Gly Arg Pro Gln Gly Pro Ala Val Ala Glu
1   5   10   15

Ala Asp Val Tyr Cys Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro
            20   25   30

Thr Leu Ala Ala Ala Gly His Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser Pro
        35   40   45

Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu Leu Pro Leu Ser Arg Ala Leu Arg Asp
    50   55   60

Leu Gly Val Asp Leu Arg His
65   70

<210> 70
<211> 70
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> origen desconocido, descripto como SEQ ID NO:29 en PAT US N° 7834249

<400> 70

Asp Asp Trp Val Val Glu Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala
1 5 10 15

Asp Ile Trp Cys Glu Asp Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro
20 25 30

Phe Val Ala Ala Gly Gln Gly Lys Phe Thr Phe Asp Gly Ser Glu Gln
35 40 45

Leu Arg Arg Arg Pro Leu Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu
50 55 60

Gly Ala Arg Val Ser Ser
65 70

<210> 71
<211> 72
<212> PRT
<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 71

Asp Thr Trp Ile Ile Asp Gly Val Gly Asn Gly Gly Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

Glu Ala Pro Leu Asp Phe Gly Asn Ala Ala Thr Gly Cys Arg Leu Thr
20 25 30

Met Gly Leu Val Gly Val Tyr Asp Phe Asp Ser Thr Phe Ile Gly Asp
35 40 45

Ala Ser Leu Thr Lys Arg Pro Met Gly Arg Val Leu Asn Pro Leu Arg
50 55 60

```
Glu Met Gly Val Gln Val Lys Ser
65                  70
```

<210> 72
<211> 80
<212> PRT
<213> Brassica napus

<400> 72

```
Val Asn Asn Arg Ala Val Val Glu Gly Cys Gly Gly Ile Phe Pro Ala
1               5                   10                  15

Ser Leu Asp Ser Lys Ser Asp Ile Glu Leu Tyr Leu Gly Asn Ala Gly
            20                  25                  30

Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn
        35                  40                  45

Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile
    50                  55                  60

Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Glu Cys
65                  70                  75                  80
```

<210> 73
<211> 80
<212> PRT
<213> Glycine max

<400> 73

```
Thr Thr Lys Gln Ala Ile Val Glu Gly Cys Gly Gly Leu Phe Pro Thr
1               5                   10                  15

Ser Lys Glu Ser Lys Asp Glu Ile Asn Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly
            20                  25                  30

Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Gly Asn
        35                  40                  45

Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile
    50                  55                  60
```

```
Gly Asp Leu Val Ala Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys
65                  70                  75                  80


<210>  74
<211>  80
<212>  PRT
<213>  Triticum aestivum

<400>  74

Val Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys Gly Gly Arg Phe Pro Val
1               5                   10                  15


Glu Lys Asp Ala Gln Glu Glu Val Lys Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly
            20                  25                  30


Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Gly Asn
        35                  40                  45


Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile
    50                  55                  60


Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Gln Gln Leu Gly Ala Asp Ala Asp Cys
65                  70                  75                  80


<210>  75
<211>  74
<212>  PRT
<213>  Escherichia coli

<400>  75

Asp Arg Thr Arg Cys Glu Ile Ile Gly Asn Gly Gly Pro Leu His Ala
1               5                   10                  15


Asp Gly Ala Leu Glu Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg
            20                  25                  30


Pro Leu Ala Ala Ala Leu Cys Leu Gly Ser Asn Asp Ile Val Leu Thr
        35                  40                  45


Gly Glu Pro Arg Met Lys Glu Arg Pro Ile Gly His Leu Val Asp Ala
    50                  55                  60
```

```
Leu Arg Leu Gly Gly Ala Lys Ile Thr Tyr
65                  70
```

<210> 76
<211> 516
<212> PRT
<213> Brassica napus

<400> 76

```
Met Ala Gln Ser Ser Arg Ile Cys His Gly Val Gln Asn Pro Cys Val
1               5                   10                  15

Ile Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Asn Gln Asn Lys Ser Pro Phe Ser
            20                  25                  30

Val Ser Leu Lys Thr His Gln Pro Arg Ala Ser Ser Trp Gly Leu Lys
        35                  40                  45

Lys Ser Gly Thr Met Leu Asn Gly Ser Val Ile Arg Pro Val Lys Val
    50                  55                  60

Thr Ala Ser Val Ser Thr Ser Glu Lys Ala Ser Glu Ile Val Leu Gln
65                  70                  75                  80

Pro Ile Arg Glu Ile Ser Gly Leu Ile Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser
                85                  90                  95

Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr
            100                 105                 110

Val Val Asp Asn Leu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Asn Tyr Met Leu Asp
        115                 120                 125

Ala Leu Lys Lys Leu Gly Leu Asn Val Glu Arg Asp Ser Val Asn Asn
    130                 135                 140

Arg Ala Val Val Glu Gly Cys Gly Gly Ile Phe Pro Ala Ser Leu Asp
145                 150                 155                 160

Ser Lys Ser Asp Ile Glu Leu Tyr Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met
                165                 170                 175
```

```
Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Ser Tyr
            180                 185                 190

Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu
        195                 200                 205

Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Glu Cys Thr Leu Gly
    210                 215                 220

Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg Val Asn Ala Asn Gly Gly Leu Pro Gly
225                 230                 235                 240

Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Thr Ala
                245                 250                 255

Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile
            260                 265                 270

Ile Asp Lys Leu Ile Ser Val Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Lys Leu
        275                 280                 285

Met Glu Arg Phe Gly Val Ser Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg
    290                 295                 300

Phe Phe Val Lys Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Gly Asn Ala Tyr
305                 310                 315                 320

Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala
                325                 330                 335

Ile Thr Gly Glu Thr Val Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu
            340                 345                 350

Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Lys Met Gly Cys Lys
        355                 360                 365

Val Ser Trp Thr Glu Asn Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Ser Arg Asp
    370                 375                 380
```

```
Ala Phe Gly Met Arg His Leu Arg Ala Val Asp Val Asn Met Asn Lys
385                 390                 395                 400


Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp
                405                 410                 415


Gly Pro Thr Thr Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr
            420                 425                 430


Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys Thr Glu Leu Arg Lys Leu Gly Ala Thr
        435                 440                 445


Val Glu Glu Gly Ser Asp Tyr Cys Val Ile Thr Pro Pro Ala Lys Val
    450                 455                 460


Lys Pro Ala Glu Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala
465                 470                 475                 480


Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Asp Val Pro Val Thr Ile Lys Asp Pro
                485                 490                 495


Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asp Tyr Phe Gln Val Leu Glu Ser
            500                 505                 510


Ile Thr Lys His
        515


<210>  77
<211>  455
<212>  PRT
<213>  Glycine max

<400>  77

Met Ala Ser Val Ala Ala Ala Glu Lys Pro Ser Thr Ser Pro Glu Ile
1               5                   10                  15


Val Leu Glu Pro Ile Lys Asp Phe Ser Gly Thr Ile Thr Leu Pro Gly
            20                  25                  30


Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu
        35                  40                  45
```

```
Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Tyr Ser Glu Asp Ile His Tyr
    50                  55                  60

Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Val Glu Asp Asp Lys
65                  70                  75                  80

Thr Thr Lys Gln Ala Ile Val Glu Gly Cys Gly Gly Leu Phe Pro Thr
                85                  90                  95

Ser Lys Glu Ser Lys Asp Glu Ile Asn Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly
            100                 105                 110

Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Gly Asn
        115                 120                 125

Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile
    130                 135                 140

Gly Asp Leu Val Ala Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys
145                 150                 155                 160

Phe Leu Gly Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg Val Asn Gly Lys Gly Gly
                165                 170                 175

Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser Val Ser Ser Gln Tyr
            180                 185                 190

Leu Thr Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu
        195                 200                 205

Ile Glu Ile Val Asp Lys Leu Ile Ser Val Pro Tyr Val Glu Met Thr
    210                 215                 220

Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Ser Val Glu His Ser Gly Asn
225                 230                 235                 240

Trp Asp Arg Phe Leu Val His Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Gly
                245                 250                 255

Asn Ala Phe Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Leu Leu Ala
```

```
            260                 265                 270

Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Ile Thr Val Asn Gly Cys Gly Thr
        275                 280                 285

Ser Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Lys Met
    290                 295                 300

Gly Ala Lys Val Thr Trp Ser Glu Asn Ser Val Thr Val Ser Gly Pro
305                 310                 315                 320

Pro Arg Asp Phe Ser Gly Arg Lys Val Leu Arg Gly Ile Asp Val Asn
                325                 330                 335

Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala Leu
            340                 345                 350

Phe Ala Asn Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg Val
        355                 360                 365

Lys Glu Thr Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys Thr Glu Leu Arg Lys Leu
    370                 375                 380

Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys Val Ile Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg Met
                405                 410                 415

Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Gly Asp Val Pro Val Thr Ile
            420                 425                 430

Lys Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asp Tyr Phe Glu Val
        435                 440                 445

Leu Glu Arg Leu Thr Lys His
    450                 455
```

<210> 78
<211> 456
<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 78

```
Met Ala Thr Ser Val Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ser Gly Ala Glu Glu
1               5                  10                  15

Val Val Leu Gln Pro Ile Arg Glu Ile Ser Gly Ala Val Gln Leu Pro
            20                  25                  30

Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu Leu Ser Ala Leu Ser
        35                  40                  45

Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn Ser Glu Asp Val His
    50                  55                  60

Tyr Met Leu Glu Ala Leu Glu Ala Leu Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp
65                  70                  75                  80

Lys Val Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys Gly Gly Arg Phe Pro
                85                  90                  95

Val Glu Lys Asp Ala Gln Glu Glu Val Lys Leu Phe Leu Gly Asn Ala
            100                 105                 110

Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Gly
        115                 120                 125

Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro
    130                 135                 140

Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Gln Gln Leu Gly Ala Asp Ala Asp
145                 150                 155                 160

Cys Phe Leu Gly Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg Ile Asn Gly Lys Gly
                165                 170                 175

Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser Ile Ser Ser Gln
            180                 185                 190

Tyr Leu Ser Ser Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala Leu Glu Asp Val
        195                 200                 205
```

```
Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Val Pro Tyr Val Glu Met
    210                 215                 220

Thr Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Thr Ala Glu His Ser Asp
225                 230                 235                 240

Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro
                245                 250                 255

Gly Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe Leu
            260                 265                 270

Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val Glu Gly Cys Gly
        275                 280                 285

Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Met
    290                 295                 300

Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Asp Thr Ser Val Thr Val Thr Gly
305                 310                 315                 320

Pro Pro Arg Gln Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys Ala Val Asp Val
                325                 330                 335

Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala
            340                 345                 350

Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg
        355                 360                 365

Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr Glu Leu Thr Lys
    370                 375                 380

Leu Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys Ile Ile Thr Pro
385                 390                 395                 400

Pro Glu Lys Leu Asn Ile Thr Ala Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg
                405                 410                 415
```

Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu Val Pro Val Thr
            420   425   430

Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asn Tyr Phe Asp
        435   440   445

Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
    450   455

<210> 79
<211> 1464
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fusión en marco de dgt-28 v5 y TraP4 v2

<400> 79
atgcttgcta gacaaggtgg aagtctgaga gcttctcaat gcaacgctgg acttgctaga
60

agagttgaag ttggtgctct tgttgttcct agacctatct ctgttaacga cgttgttcct
120

cacgtttact ctgctccact ttctgttgct agaaggtctt gctctaagtc ctccattagg
180

tccactagaa ggcttcaaac tactgtgtgc tctgctgcaa gagggatgcc agccttgtct
240

ttacctggat caaagagtat cacagctagg gcactctttc ttgctgctgc tgctgatggg
300

gttactactt tggtgaggcc attgagaagt gacgacacag aaggattcgc tgaggggtta
360

gttcgtttag gctatcgtgt agggaggaca cccgatactt ggcaagtcga tggcagacca
420

caaggaccag cagtggctga ggctgacgtc tactgtagag acggagcaac caccgctaga
480

ttcttgccaa ccttagcagc tgctggtcac ggaacataca gatttgatgc ttcaccacag
540

atgaggagac gtcctctttt gcccttaagc agagccttga gggatttggg tgtcgatctt
600

agacacgaag aagctgaagg tcatcaccct ctgactgtcc gtgctgctgg ggttgaagga
660

ggagaggtta ctttggatgc tggtcagtca agtcagtatc tcactgcctt gttgctcctt
720

ggtcccctta caagacaagg actgaggata agggttactg atttggtgtc agcaccatac
780

gtggagatta cgcttgcaat gatgagggct ttcggagttg aagtggcaag ggagggagat
840

gtgttcgttg ttccacctgg tggatatcgt gcaactacgt atgctataga acccgacgca
900

agtactgctt cttacttctt cgcagctgct gctttgactc ctggagctga agtgactgta
960

cctgggttag gcacgggagc acttcaagga gatttgggat ttgtagatgt cttaaggaga
1020

atgggagccg aggtgtccgt aggagctgat gcaaccactg ttagaggaac tggtgaattg
1080

cgtggcctta cagccaacat gagagacata agtgatacga tgccgaccct cgctgcaata
1140

gcacccttg ctagtgctcc agttagaatc gaggatgttg ccaacactcg tgtcaaagaa
1200

tgtgacagac ttgaggcttg tgcagagaac cttaggaggt tgggagtaag ggttgcaacg
1260

ggtccggact ggattgagat acaccctggt ccagctactg gtgctcaagt cacaagctat
1320

ggtgatcaca gaattgtgat gtcatttgca gtgactggac ttcgtgtgcc tgggatcagc
1380

ttcgacgacc ctggctgtgt tcgtaagact tttcctgggt ttcacgaggc tttcgcagaa
1440

ttgaggcgtg gcattgggag ctga
1464

<210> 80
<211> 1434
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fusión en marco de dgt-28 v5 y TraP5 v2

<400> 80
atgcaactcc tgaatcagag gcaagccctg cgtcttggtc gttcatctgc ttcaaagaac
60

cagcaagttg ctccactggc ctctaggcct gcttcttcct tgagcgtcag cgcatccagc
120

gtcgcacctg cacctgcttg ctcagctcct gctggagctg gaaggcgtgc tgttgtcgtg
180

agagcagcaa gagggatgcc agccttgtct ttacctggat caaagagtat cacagctagg
240

gcactctttc ttgctgctgc tgctgatggg gttactactt tggtgaggcc attgagaagt
300

gacgacacag aaggattcgc tgaggggtta gttcgtttag gctatcgtgt agggaggaca
360

cccgatactt ggcaagtcga tggcagacca caaggaccag cagtggctga ggctgacgtc
420

tactgtagag acggagcaac caccgctaga ttcttgccaa ccttagcagc tgctggtcac
480

ggaacataca gatttgatgc ttcaccacag atgaggagac gtcctctttt gcccttaagc
540

agagccttga gggatttggg tgtcgatctt agacacgaag aagctgaagg tcatcaccct
600

ctgactgtcc gtgctgctgg ggttgaagga ggagaggtta ctttggatgc tggtcagtca
660

agtcagtatc tcactgcctt gttgctcctt ggtcccctta caagacaagg actgaggata
720

agggttactg atttggtgtc agcaccatac gtggagatta cgcttgcaat gatgagggct
780

ttcggagttg aagtggcaag ggagggagat gtgttcgttg ttccacctgg tggatatcgt
840

gcaactacgt atgctataga acccgacgca agtactgctt cttacttctt cgcagctgct
900

gctttgactc ctggagctga agtgactgta cctgggttag gcacgggagc acttcaagga
960

gatttgggat ttgtagatgt cttaaggaga atgggagccg aggtgtccgt aggagctgat
1020

gcaaccactg ttagaggaac tggtgaattg cgtggcctta cagccaacat gagagacata
1080

agtgatacga tgccgaccct cgctgcaata gcacccttg ctagtgctcc agttagaatc
1140

gaggatgttg ccaacactcg tgtcaaagaa tgtgacagac ttgaggcttg tgcagagaac
1200

cttaggaggt tgggagtaag ggttgcaacg ggtccggact ggattgagat acaccctggt
1260

ccagctactg gtgctcaagt cacaagctat ggtgatcaca gaattgtgat gtcatttgca
1320

gtgactggac ttcgtgtgcc tgggatcagc ttcgacgacc ctggctgtgt tcgtaagact
1380

tttcctgggt ttcacgaggc tttcgcagaa ttgaggcgtg gcattgggag ctga
1434

<210> 81
<211> 1446
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fusión en marco de dgt-28 v5 y TraP8 v2

<400> 81
atggctcaat ctagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttccaat
60

ctctccaaat ccaaccagaa caaatctcct ttctcagtca gcctcaagac tcaccagcag
120

cagcgtcgtg cttaccagat atctagctgg ggattgaaga agtcaaacaa cgggtccgtg
180

attcgtccgg ttaaggcagc aagagggatg ccagccttgt ctttacctgg atcaaagagt
240

atcacagcta gggcactctt tcttgctgct gctgctgatg gggttactac tttggtgagg
300

ccattgagaa gtgacgacac agaaggattc gctgaggggt tagttcgttt aggctatcgt
360

gtagggagga cacccgatac ttggcaagtc gatggcagac cacaaggacc agcagtggct
420

gaggctgacg tctactgtag agacggagca accaccgcta gattcttgcc aaccttagca
480

gctgctggtc acggaacata cagatttgat gcttcaccac agatgaggag acgtcctctt
540

ttgcccttaa gcagagcctt gagggatttg ggtgtcgatc ttagacacga agaagctgaa
600

ggtcatcacc ctctgactgt ccgtgctgct ggggttgaag gaggagaggt tactttggat
660

gctggtcagt caagtcagta tctcactgcc ttgttgctcc ttggtcccct tacaagacaa
720

ggactgagga taagggttac tgatttggtg tcagcaccat acgtggagat tacgcttgca
780

atgatgaggg ctttcggagt tgaagtggca agggagggag atgtgttcgt tgttccacct
840

ggtggatatc gtgcaactac gtatgctata gaacccgacg caagtactgc ttcttacttc
900

ttcgcagctg ctgctttgac tcctggagct gaagtgactg tacctgggtt aggcacggga
960

gcacttcaag gagatttggg atttgtagat gtcttaagga gaatgggagc cgaggtgtcc
1020

gtaggagctg atgcaaccac tgttagagga actggtgaat tgcgtggcct tacagccaac
1080

atgagagaca taagtgatac gatgccgacc ctcgctgcaa tagcaccctt tgctagtgct
1140

ccagttagaa tcgaggatgt tgccaacact cgtgtcaaag aatgtgacag acttgaggct
1200

tgtgcagaga accttaggag gttgggagta agggttgcaa cgggtccgga ctggattgag
1260

atacaccctg gtccagctac tggtgctcaa gtcacaagct atggtgatca cagaattgtg
1320

atgtcatttg cagtgactgg acttcgtgtg cctgggatca gcttcgacga ccctggctgt
1380

gttcgtaaga cttttcctgg gtttcacgag gctttcgcag aattgaggcg tggcattggg
1440

agctga
1446

<210> 82
<211> 1446
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fusión en marco de dgt-28 v5 y TraP9 v2

<400> 82
atggcacaag ccagccgtat ctgccagaat ccatgtgtga tatccaatct ccccaaaagc
60

aaccaccgta agtccccttt ctctgtctca ctcaagacgc atcagcctag agcctcttca
120

tggggactta agaagtctgg caccatgctg aacggttcag tgattagacc cgtcaaggtg
180

acagcttctg tttccgcagc aagagggatg ccagccttgt ctttacctgg atcaaagagt
240

atcacagcta gggcactctt tcttgctgct gctgctgatg gggttactac tttggtgagg
300

ccattgagaa gtgacgacac agaaggattc gctgaggggt tagttcgttt aggctatcgt
360

gtagggagga cacccgatac ttggcaagtc gatggcagac cacaaggacc agcagtggct
420

gaggctgacg tctactgtag agacggagca accaccgcta gattcttgcc aaccttagca
480

gctgctggtc acggaacata cagatttgat gcttcaccac agatgaggag acgtcctctt
540

ttgcccttaa gcagagcctt gagggatttg ggtgtcgatc ttagacacga agaagctgaa
600

ggtcatcacc ctctgactgt ccgtgctgct ggggttgaag gaggagaggt tactttggat
660

gctggtcagt caagtcagta tctcactgcc ttgttgctcc ttggtcccct tacaagacaa
720

ggactgagga taagggttac tgatttggtg tcagcaccat acgtggagat tacgcttgca
780

atgatgaggg ctttcggagt tgaagtggca agggagggag atgtgttcgt tgttccacct
840

ggtggatatc gtgcaactac gtatgctata gaacccgacg caagtactgc ttcttacttc
900

ttcgcagctg ctgctttgac tcctggagct gaagtgactg tacctgggtt aggcacggga
960

gcacttcaag gagatttggg atttgtagat gtcttaagga gaatgggagc cgaggtgtcc
1020

gtaggagctg atgcaaccac tgttagagga actggtgaat tgcgtggcct tacagccaac
1080

atgagagaca taagtgatac gatgccgacc ctcgctgcaa tagcaccctt tgctagtgct
1140

ccagttagaa tcgaggatgt tgccaacact cgtgtcaaag aatgtgacag acttgaggct
1200

tgtgcagaga accttaggag gttgggagta agggttgcaa cgggtccgga ctggattgag
1260

atacaccctg gtccagctac tggtgctcaa gtcacaagct atggtgatca cagaattgtg
1320

atgtcatttg cagtgactgg acttcgtgtg cctgggatca gcttcgacga ccctggctgt
1380

gttcgtaaga cttttcctgg gtttcacgag gctttcgcag aattgaggcg tggcattggg
1440

agctga
1446

<210> 83
<211> 1473
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fusión en marco de dgt-28 v5 y TraP12 v2

<400> 83
atggcacaat ctagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttcaaat
60

ctctcaaagt ccaatcagaa caaatcacct ttctccgtct ccctcaagac acaccagcat
120

ccaagggcat acccgataag cagctcatgg ggactcaaga agagcggaat gactctgatt
180

ggctctgagc ttcgtcctct taaggttatg tcctctgttt ccgcagcaag agggatgcca
240

gccttgtctt tacctggatc aaagagtatc acagctaggg cactctttct tgctgctgct
300

gctgatgggg ttactacttt ggtgaggcca ttgagaagtg acgacacaga aggattcgct
360

gaggggttag ttcgtttagg ctatcgtgta gggaggacac ccgatacttg gcaagtcgat
420

ggcagaccac aaggaccagc agtggctgag gctgacgtct actgtagaga cggagcaacc
480

accgctagat tcttgccaac cttagcagct gctggtcacg gaacatacag atttgatgct
540

tcaccacaga tgaggagacg tcctcttttg cccttaagca gagccttgag ggatttgggt
600

gtcgatctta gacacgaaga agctgaaggt catcaccctc tgactgtccg tgctgctggg
660

gttgaaggag gagaggttac tttggatgct ggtcagtcaa gtcagtatct cactgccttg
720

ttgctccttg gtccccttac aagacaagga ctgaggataa gggttactga tttggtgtca
780

gcaccatacg tggagattac gcttgcaatg atgagggctt tcggagttga agtggcaagg
840

gagggagatg tgttcgttgt tccacctggt ggatatcgtg caactacgta tgctatagaa
900

cccgacgcaa gtactgcttc ttacttcttc gcagctgctg ctttgactcc tggagctgaa
960

gtgactgtac ctgggttagg cacgggagca cttcaaggag atttgggatt tgtagatgtc
1020

ttaaggagaa tgggagccga ggtgtccgta ggagctgatg caaccactgt tagaggaact
1080

ggtgaattgc gtggccttac agccaacatg agagacataa gtgatacgat gccgaccctc
1140

gctgcaatag cacccttgc tagtgctcca gttagaatcg aggatgttgc caacactcgt
1200

gtcaaagaat gtgacagact tgaggcttgt gcagagaacc ttaggaggtt gggagtaagg
1260

gttgcaacgg gtccggactg gattgagata caccctggtc cagctactgg tgctcaagtc
1320

acaagctatg gtgatcacag aattgtgatg tcatttgcag tgactggact tcgtgtgcct
1380

gggatcagct tcgacgaccc tggctgtgtt cgtaagactt ttcctgggtt tcacgaggct
1440

ttcgcagaat tgaggcgtgg cattgggagc tga
1473

<210> 84
<211> 1455
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fusión en marco de dgt-28 v5 y TraP13 v2

<400> 84
atggcacaag ttagcagaat ctgtaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc
60

tcaaagtcca gccaacgtaa gtctcccctc agcgtgtctc tgaaaactca gcagcccaga
120

gcttcttcat ggggtttgaa gaaatctgga acgatgctta acggctcagt cattcgtccg
180

gttaaggtga cagcctccgt ctccgctgct agagggatgc cagccttgtc tttacctgga
240

tcaaagagta tcacagctag ggcactcttt cttgctgctg ctgctgatgg ggttactact
300

ttggtgaggc cattgagaag tgacgacaca gaaggattcg ctgaggggtt agttcgttta
360

ggctatcgtg tagggaggac acccgatact tggcaagtcg atggcagacc acaaggacca
420

gcagtggctg aggctgacgt ctactgtaga gacggagcaa ccaccgctag attcttgcca
480

accttagcag ctgctggtca cggaacatac agatttgatg cttcaccaca gatgaggaga
540

cgtcctcttt tgcccttaag cagagccttg agggatttgg gtgtcgatct tagacacgaa
600

gaagctgaag gtcatcaccc tctgactgtc cgtgctgctg gggttgaagg aggagaggtt
660

actttggatg ctggtcagtc aagtcagtat ctcactgcct tgttgctcct tggtcccctt
720

acaagacaag gactgaggat aagggttact gatttggtgt cagcaccata cgtggagatt
780

acgcttgcaa tgatgagggc tttcggagtt gaagtggcaa gggagggaga tgtgttcgtt
840

gttccacctg gtggatatcg tgcaactacg tatgctatag aacccgacgc aagtactgct
900

tcttacttct tcgcagctgc tgctttgact cctggagctg aagtgactgt acctgggtta
960

ggcacgggag cacttcaagg agatttggga tttgtagatg tcttaaggag aatgggagcc
1020

gaggtgtccg taggagctga tgcaaccact gttagaggaa ctggtgaatt gcgtggcctt
1080

acagccaaca tgagagacat aagtgatacg atgccgaccc tcgctgcaat agcacccttt
1140

gctagtgctc cagttagaat cgaggatgtt gccaacactc gtgtcaaaga atgtgacaga
1200

cttgaggctt gtgcagagaa ccttaggagg ttgggagtaa gggttgcaac gggtccggac
1260

tggattgaga tacaccctgg tccagctact ggtgctcaag tcacaagcta tggtgatcac
1320

agaattgtga tgtcatttgc agtgactgga cttcgtgtgc ctgggatcag cttcgacgac
1380

cctggctgtg ttcgtaagac ttttcctggg tttcacgagg ctttcgcaga attgaggcgt
1440

ggcattggga gctga
1455

<210> 85
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 85
gcgaagatcc aggacaagga
20

<210> 86
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 86
ctgcttaccg gcaaagatga g
21

<210> 87
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 87
ttcccccgga ccagcagcgt
20

<210> 88
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 88
ccgacgagaa agaccagcaa
20

<210> 89
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 89
ttaagttgtc gatcgggact gt
22

<210> 90
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos sonda

<400> 90
tgagcctctc gtcgccgatc acat
24

<210> 91
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 91
attttccatt cacttggccc
20

<210> 92
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 92
tgctatctgg ctcagctgc
19

<210> 93
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos sonda

<400> 93
atggtggaag ggcggttgtg a
21

<210> 94
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 94

ctcccgcgca ccgatctg
18

<210> 95
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 95
cccgcccctc tcctctttc
19

<210> 96
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos sonda

<400> 96
aagccgcctc tcgcccaccc a
21

<210> 97
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 97
ggtttgttga atccctctgt tggt
24

<210> 98
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 98
gtggtcatga cagtatgata acagg
25

<210> 99
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 99
gggtctgccc aatgaagcga
20

<210> 100
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 100
tctcgcttct ctcataacac atcgtg
26

<210> 101
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 101
gacctctctc accctcctcc tc
22

<210> 102
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 102
ccaaataata agtgagagag gggcat
26

<210> 103
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 103
tagttcccct gtcgtgtgca aa
22

<210> 104
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 104
caacagcagc ctcaccaatc ac
22

<210> 105
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 105
caagaacggt gctccttttt taag
24

<210> 106
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 106
agcccttcct ctgcatcctt a
21

<210> 107
<211> 24

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 107
ggctgtgttg cacacaaata gaga
24

<210> 108
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 108
cagcagcacg gtaggtagat tgt
23

<210> 109
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 109
ccgataagac ggcaactgat taaa
24

<210> 110
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 110
aggctggctt ctagtggaag gag
23

<210> 111
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 111
gggtttccgg ctggagacg
19

<210> 112
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 112
ccaaaagcaa ttttcgttat aagatgcc
28

<210> 113
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 113
ccagataatc tgtgggctcc tg
22

<210> 114
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 114
gcagcagctt gccttaagca
20

<210> 115
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 115
tgcttgtttc tgttgtcatc ataggtt
27

<210> 116
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 116
catttgttgg gtttccacgt acg
23

<210> 117
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 117
gagcgcggct aaaggtcaaa ac
22

<210> 118
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 118
ccgatttaca tggacttgat ggagt
25

<210> 119
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 119
ggtttgttga atccctctgt tggt
24

<210> 120
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 120
gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag
32

<210> 121
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 121
gggtctgccc aatgaagcga
20

<210> 122
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 122
gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg
37

<210> 123
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 123

gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag
32

<210> 124
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 124
ccaaataata agtgagagag gggcat
26

<210> 125
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 125
gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg
37

<210> 126
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 126
caacagcagc ctcaccaatc ac
22

<210> 127
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 127
gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg
37

<210> 128
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 128
agcccttcct ctgcatcctt a
21

<210> 129
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 129
gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg
37

<210> 130
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 130
cagcagcacg gtaggtagat tgt
23

<210> 131
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 131
gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag
32

<210> 132
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 132
aggctggctt ctagtggaag gag
23

<210> 133
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 133
gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg
37

<210> 134
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 134
ccaaaagcaa ttttcgttat aagatgcc
28

<210> 135
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 135
gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag
32

<210> 136
<211> 20

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 136
gcagcagctt gccttaagca
20

<210> 137
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 137
gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg
37

<210> 138
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 138
catttgttgg gtttccacgt acg
23

<210> 139
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 139
gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag
32

<210> 140
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de oligonucleótidos cebadora

<400> 140
ccgatttaca tggacttgat ggagt
25

<210> 141
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia polipeptídica

<400> 141

Leu Gly Asn Ala Ala Thr
1   5

<210> 142
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia polipeptídica

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa can be Ala, Ser, or Thr

<400> 142

Ala Leu Leu Met Xaa Ala Pro Leu Thr
1   5

<210> 143
<211> 1431
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constructo DGT-31 y TRAP23

<400> 143
atggcacaga tcaacaagtc tgctaatggg gttaggaacg cttcactgat aagcaacttc
60

tccaataccc gtcaagccaa atccccttc tccctctcat gcggaacaag actgaagaac
120

agcagcagag gtttgaagaa ggtggcagtt aggctcattg gctcccgtgt caaagtgtct
180

gcctcaatga ctgtgattga catccctggc tcaaagtcag ttactgccag agcattgttc
240

ctcgcagcag ctgctgatgg cactacaact cttttgagac ctcttcacag cgatgacacg
300

gaaggcttca ctgagggtct cactcgtttg ggatacgcag tggttagaga acccgatagg
360

tggcacatag aaggacgtcc ctccggtcca gcagcagcag atgcagaagt tcactgtagg
420

gacggtgcta caactgctcg ctttcttcca acccttgcag ctgctgctgc ctccggaacg
480

tatcgtttcg acgcatcagc tcagatgagg cgtagacccc tcgctcccct cacggaagct
540

cttagaacac ttggagtgga ccttaggcat gatggagctg aaggccacca ccccttgaca
600

attcaagcct ctggtgttaa gggtggagga cttacgctcg acgctggtga gtcatctcag
660

tacttgacag ctctgctcat gcttggtcct ctgaccgcag agggactgag aatagaagtt
720

acggagcttg tctctgctcc ttatgtggag atcacccttg caatgatgag aggctttggt
780

gtggaggttg ttagggaggg gaatactttc actgtgcctc ctggaggtta cagagctaca
840

acttatgcca tagaaccgga cgcaagcaca gcttcctact tctttgcagc agcagccctc
900

actgggaggg aagtgacggt gcctggcttg ggcactggag cacttcaagg tgatcttagg
960

ttcacggagg tcctcagaag gatggacgct gatgttcgca caacgtccga ctctacaaca
1020

gtgcgctcag atggtcgcct tgctgggttg actgtcaaca tgagggacat aagcgacaca
1080

atgccaacac tggcagctat agctccgtac gcaagctcac cagttaggat cgaggatgtc
1140

gcaaacaccc gtgtgaagga atgtgatagg ctggaggctt gcgctcagaa tctccgctca
1200

atgggcatca ccgttcgcac tggaccagat tggattgaga tccatcctgg gactcctaga
1260

ccgaccgaga tagccacaca cggtgatcat agaatcgtca tgtcatttgc cgtggctgga
1320

cttagaaccc ctgggatgtc ttacgatgac cctggctgcg ttcgcaagac ttttcctcgt
1380

tttcatgaag agtttgcagc cttcgtggag cgctcatccg ctggagagtg a
1431

<210> 144
<211> 1245
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nucleótido DGT-31 v3

<400> 144
atgactgtga ttgacatccc tggctcaaag tcagttactg ccagagcatt gttcctcgca
60

gcagctgctg atggcactac aactcttttg agacctcttc acagcgatga cacggaaggc
120

ttcactgagg gtctcactcg tttgggatac gcagtggtta gagaacccga taggtggcac
180

atagaaggac gtccctccgg tccagcagca gcagatgcag aagttcactg tagggacggt
240

gctacaactg ctcgctttct tccaaccctt gcagctgctg ctgcctccgg aacgtatcgt
300

ttcgacgcat cagctcagat gaggcgtaga cccctcgctc ccctcacgga agctcttaga
360

acacttggag tggaccttag gcatgatgga gctgaaggcc accacccctt gacaattcaa
420

gcctctggtg ttaagggtgg aggacttacg ctcgacgctg gtgagtcatc tcagtacttg
480

acagctctgc tcatgcttgg tcctctgacc gcagagggac tgagaataga agttacggag
540

cttgtctctg ctccttatgt ggagatcacc cttgcaatga tgagaggctt tggtgtggag
600

gttgttaggg aggggaatac tttcactgtg cctcctggag gttacagagc tacaacttat
660

gccatagaac cggacgcaag cacagcttcc tacttctttg cagcagcagc cctcactggg
720

agggaagtga cggtgcctgg cttgggcact ggagcacttc aaggtgatct taggttcacg
780

gaggtcctca gaaggatgga cgctgatgtt cgcacaacgt ccgactctac aacagtgcgc
840

tcagatggtc gccttgctgg gttgactgtc aacatgaggg acataagcga cacaatgcca
900

acactggcag ctatagctcc gtacgcaagc tcaccagtta ggatcgagga tgtcgcaaac
960

acccgtgtga aggaatgtga taggctggag gcttgcgctc agaatctccg ctcaatgggc
1020

atcaccgttc gcactggacc agattggatt gagatccatc ctgggactcc tagaccgacc
1080

gagatagcca cacacggtga tcatagaatc gtcatgtcat ttgccgtggc tggacttaga
1140

acccctggga tgtcttacga tgaccctggc tgcgttcgca agacttttcc tcgttttcat
1200

gaagagtttg cagccttcgt ggagcgctca tccgctggag agtga
1245

<210> 145
<211> 414
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína DGT-31

<400> 145

Met Thr Val Ile Asp Ile Pro Gly Ser Lys Ser Val Thr Ala Arg Ala
1   5   10   15

Leu Phe Leu Ala Ala Ala Ala Asp Gly Thr Thr Thr Leu Leu Arg Pro
            20   25   30

Leu His Ser Asp Asp Thr Glu Gly Phe Thr Glu Gly Leu Thr Arg Leu

```
        35                  40                  45

Gly Tyr Ala Val Val Arg Glu Pro Asp Arg Trp His Ile Glu Gly Arg
    50                  55                  60

Pro Ser Gly Pro Ala Ala Ala Asp Ala Glu Val His Cys Arg Asp Gly
65                  70                  75                  80

Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro Thr Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ser
                85                  90                  95

Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser Ala Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu
            100                 105                 110

Ala Pro Leu Thr Glu Ala Leu Arg Thr Leu Gly Val Asp Leu Arg His
        115                 120                 125

Asp Gly Ala Glu Gly His His Pro Leu Thr Ile Gln Ala Ser Gly Val
    130                 135                 140

Lys Gly Gly Gly Leu Thr Leu Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Tyr Leu
145                 150                 155                 160

Thr Ala Leu Leu Met Leu Gly Pro Leu Thr Ala Glu Gly Leu Arg Ile
                165                 170                 175

Glu Val Thr Glu Leu Val Ser Ala Pro Tyr Val Glu Ile Thr Leu Ala
            180                 185                 190

Met Met Arg Gly Phe Gly Val Glu Val Val Arg Glu Gly Asn Thr Phe
        195                 200                 205

Thr Val Pro Pro Gly Gly Tyr Arg Ala Thr Thr Tyr Ala Ile Glu Pro
    210                 215                 220

Asp Ala Ser Thr Ala Ser Tyr Phe Phe Ala Ala Ala Ala Leu Thr Gly
225                 230                 235                 240

Arg Glu Val Thr Val Pro Gly Leu Gly Thr Gly Ala Leu Gln Gly Asp
                245                 250                 255
```

```
Leu Arg Phe Thr Glu Val Leu Arg Arg Met Asp Ala Asp Val Arg Thr
            260                 265                 270

Thr Ser Asp Ser Thr Thr Val Arg Ser Asp Gly Arg Leu Ala Gly Leu
        275                 280                 285

Thr Val Asn Met Arg Asp Ile Ser Asp Thr Met Pro Thr Leu Ala Ala
    290                 295                 300

Ile Ala Pro Tyr Ala Ser Ser Pro Val Arg Ile Glu Asp Val Ala Asn
305                 310                 315                 320

Thr Arg Val Lys Glu Cys Asp Arg Leu Glu Ala Cys Ala Gln Asn Leu
                325                 330                 335

Arg Ser Met Gly Ile Thr Val Arg Thr Gly Pro Asp Trp Ile Glu Ile
            340                 345                 350

His Pro Gly Thr Pro Arg Pro Thr Glu Ile Ala Thr His Gly Asp His
        355                 360                 365

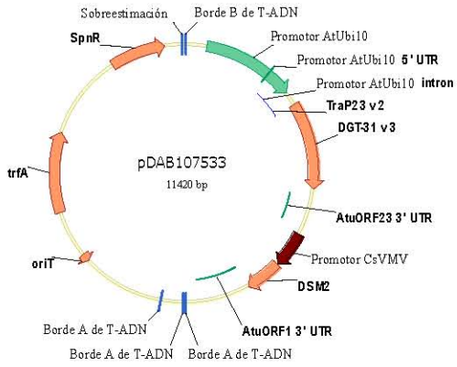
Arg Ile Val Met Ser Phe Ala Val Ala Gly Leu Arg Thr Pro Gly Met
    370                 375                 380

Ser Tyr Asp Asp Pro Gly Cys Val Arg Lys Thr Phe Pro Arg Phe His
385                 390                 395                 400

Glu Glu Phe Ala Ala Phe Val Glu Arg Ser Ser Ala Gly Glu
                405                 410
```

RESUMEN

La presente divulgación se refiere a ciertos polipéptidos derivados de enzimas DGT procariotas y ácidos nucleicos útiles en la codificación de los mismos


Sobreestimación
Borde B de T-ADN
SpnR
Promotor AtUbi10
Promotor AtUbi10 5' UTR
Promotor AtUbi10 intron
TraP23 v2
DGT-31 v3
pDAB107533
11420 bp
trfA
AtuORF23 3' UTR
Promotor CsVMV
oriT
DSM2
Borde A de T-ADN
AtuORF1 3' UTR
Borde A de T-ADN
Borde A de T-ADN

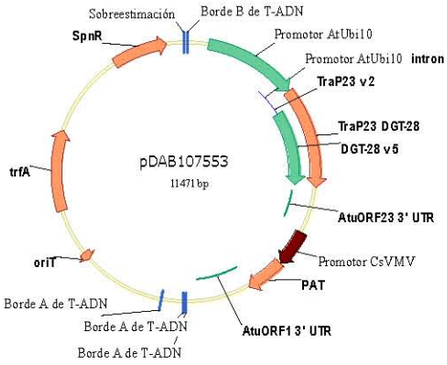


Fig. 52

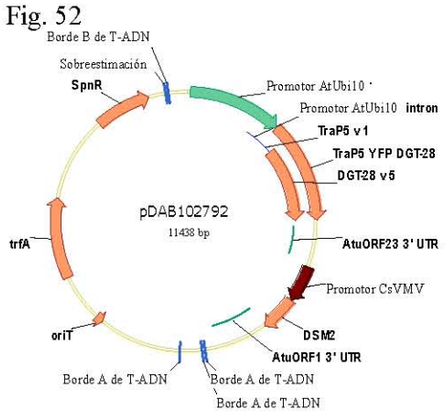


Fig. 53

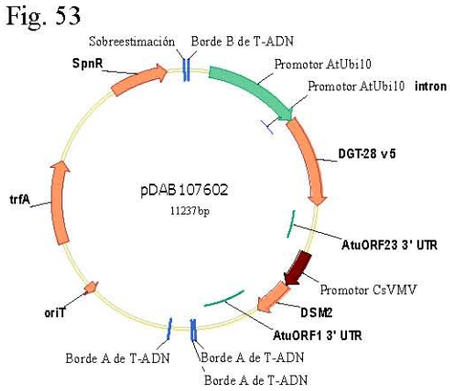


Fig.54

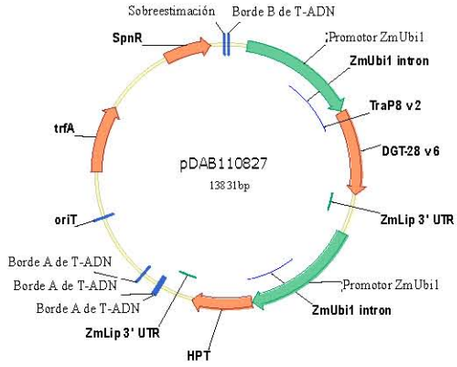


Fig. 49

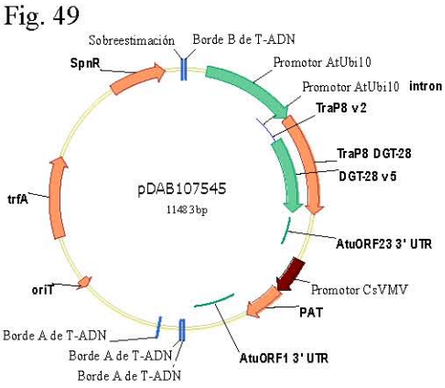


Fig. 50

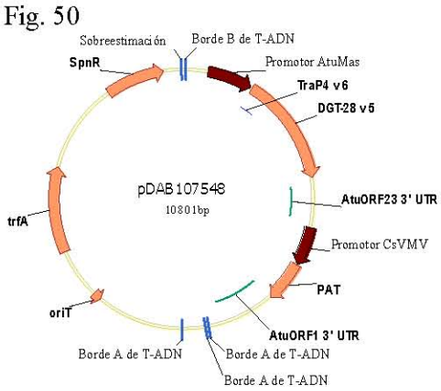


Fig. 51

Fig. 45

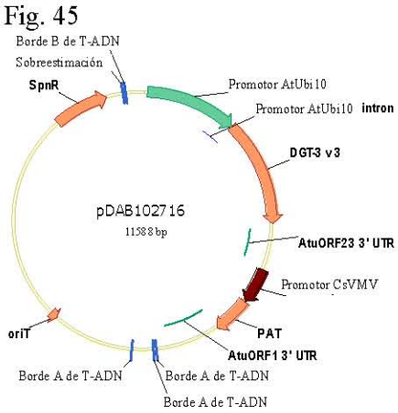


Fig. 46

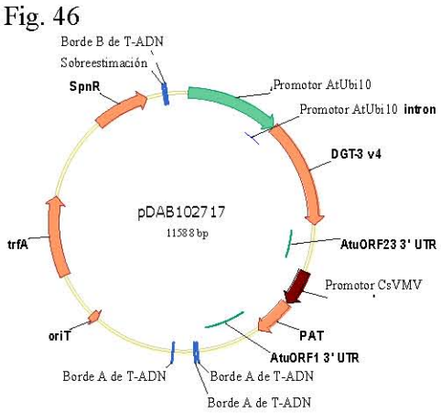


Fig.47

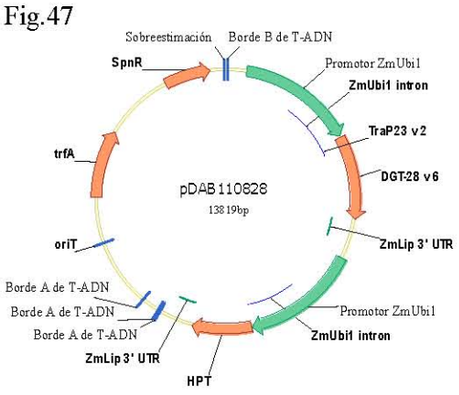


Fig. 48

Fig. 43

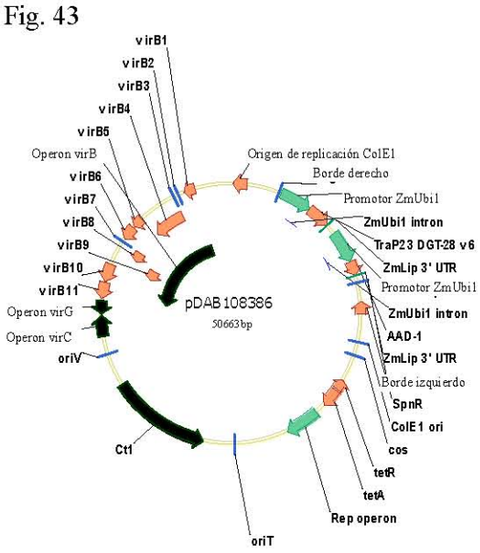

virB1
virB2
virB3
virB4
virB5
Operon virB
virB6
virB7
virB8
virB9
virB10
virB11
Operon virG
Operon virC
oriV
pDAB108386
50663bp
Ct1
oriT
Origen de replicación ColE1
Borde derecho
Promotor ZmUbi1
ZmUbi1 intron
TraP23 DGT-28 v6
ZmLip 3' UTR
Promotor ZmUbi1
ZmUbi1 intron
AAD-1
ZmLip 3' UTR
Borde izquierdo
SpnR
ColE1 ori
cos
tetR
tetA
Rep operon

Fig. 44

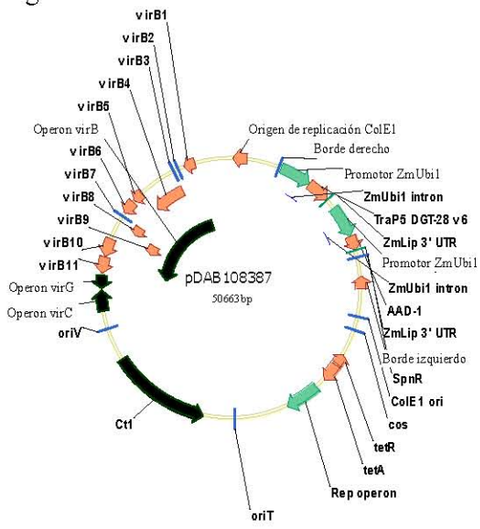

virB1
virB2
virB3
virB4
virB5
Operon virB
virB6
virB7
virB8
virB9
virB10
virB11
Operon virG
Operon virC
oriV
pDAB108387
50663bp
Ct1
oriT
Origen de replicación ColE1
Borde derecho
Promotor ZmUbi1
ZmUbi1 intron
TraP5 DGT-28 v6
ZmLip 3' UTR
Promotor ZmUbi1
ZmUbi1 intron
AAD-1
ZmLip 3' UTR
Borde izquierdo
SpnR
ColE1 ori
cos
tetR
tetA
Rep operon

Fig. 41

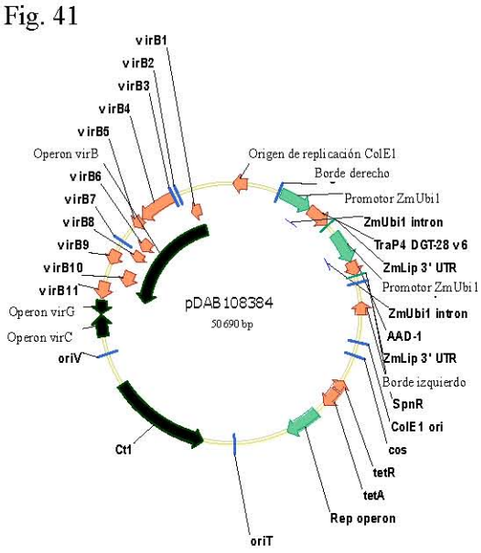

virB1
virB2
virB3
virB4
virB5
Operon virB
virB6
virB7
virB8
virB9
virB10
virB11
Operon virG
Operon virC
oriV
Origen de replicación ColE1
Borde derecho
Promotor ZmUbi1
ZmUbi1 intron
TraP4 DGT-28 v6
ZmLip 3' UTR
Promotor ZmUbi1
ZmUbi1 intron
AAD-1
ZmLip 3' UTR
Borde izquierdo
SpnR
ColE1 ori
cos
tetR
tetA
Rep operon
oriT
Ct1
pDAB108384
50690 bp

Fig. 42

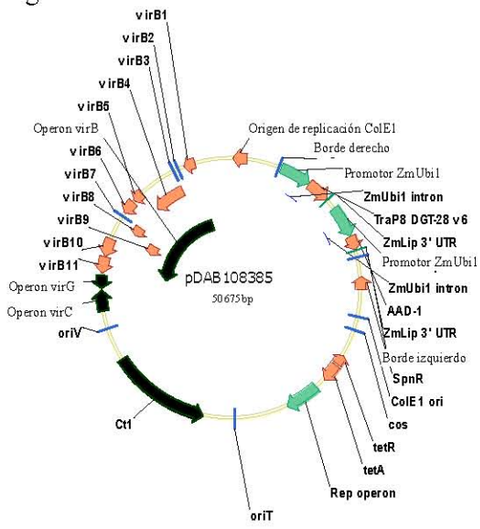

virB1
virB2
virB3
virB4
virB5
Operon virB
virB6
virB7
virB8
virB9
virB10
virB11
Operon virG
Operon virC
oriV
Origen de replicación ColE1
Borde derecho
Promotor ZmUbi1
ZmUbi1 intron
TraP8 DGT-28 v6
ZmLip 3' UTR
Promotor ZmUbi1
ZmUbi1 intron
AAD-1
ZmLip 3' UTR
Borde izquierdo
SpnR
ColE1 ori
cos
tetR
tetA
Rep operon
oriT
Ct1
pDAB108385
50675 bp

Fig. 38

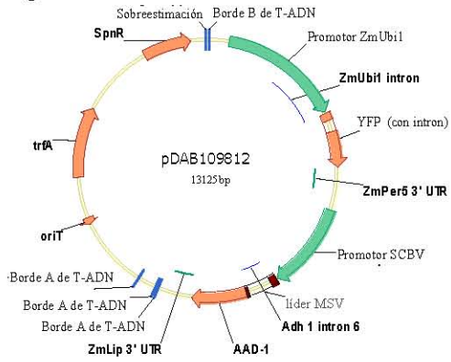


Fig. 39

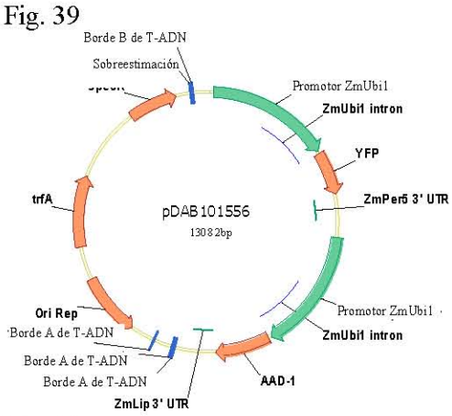


Fig. 40

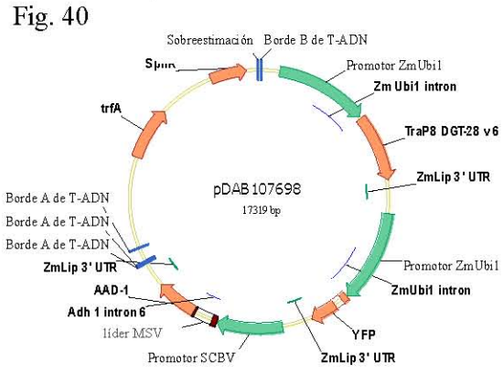


Fig. 35

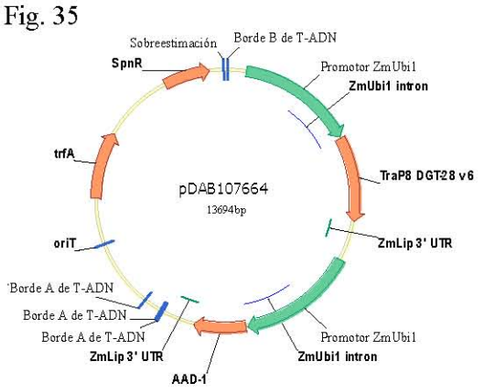


Fig. 36

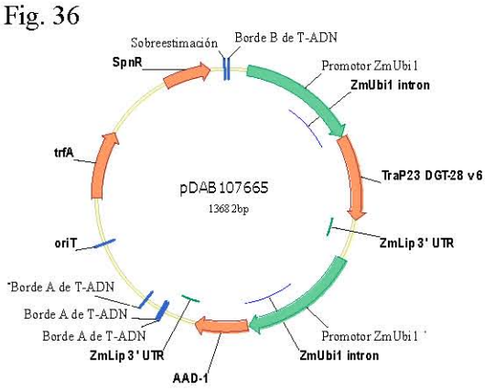


Fig. 37

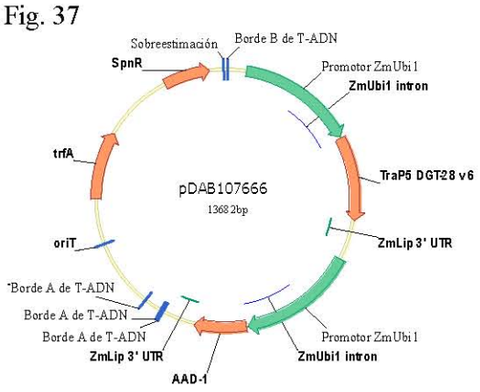


Fig. 32

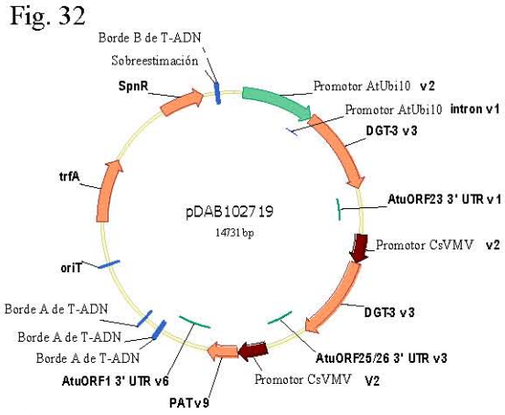


Fig. 33

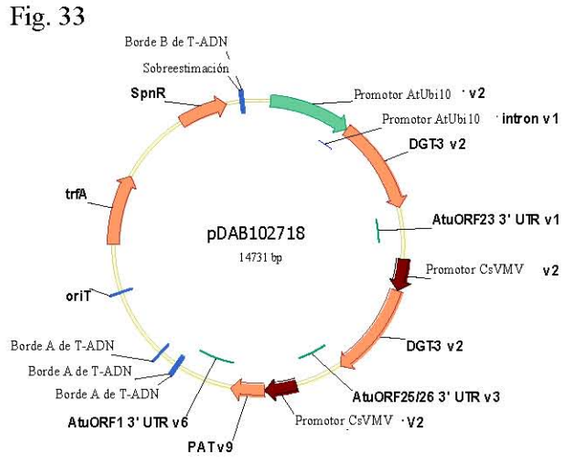


Fig. 34

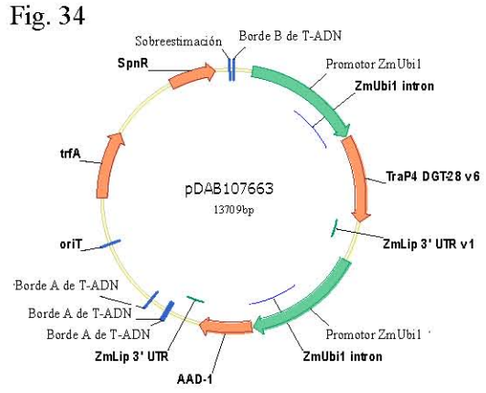


Fig. 31

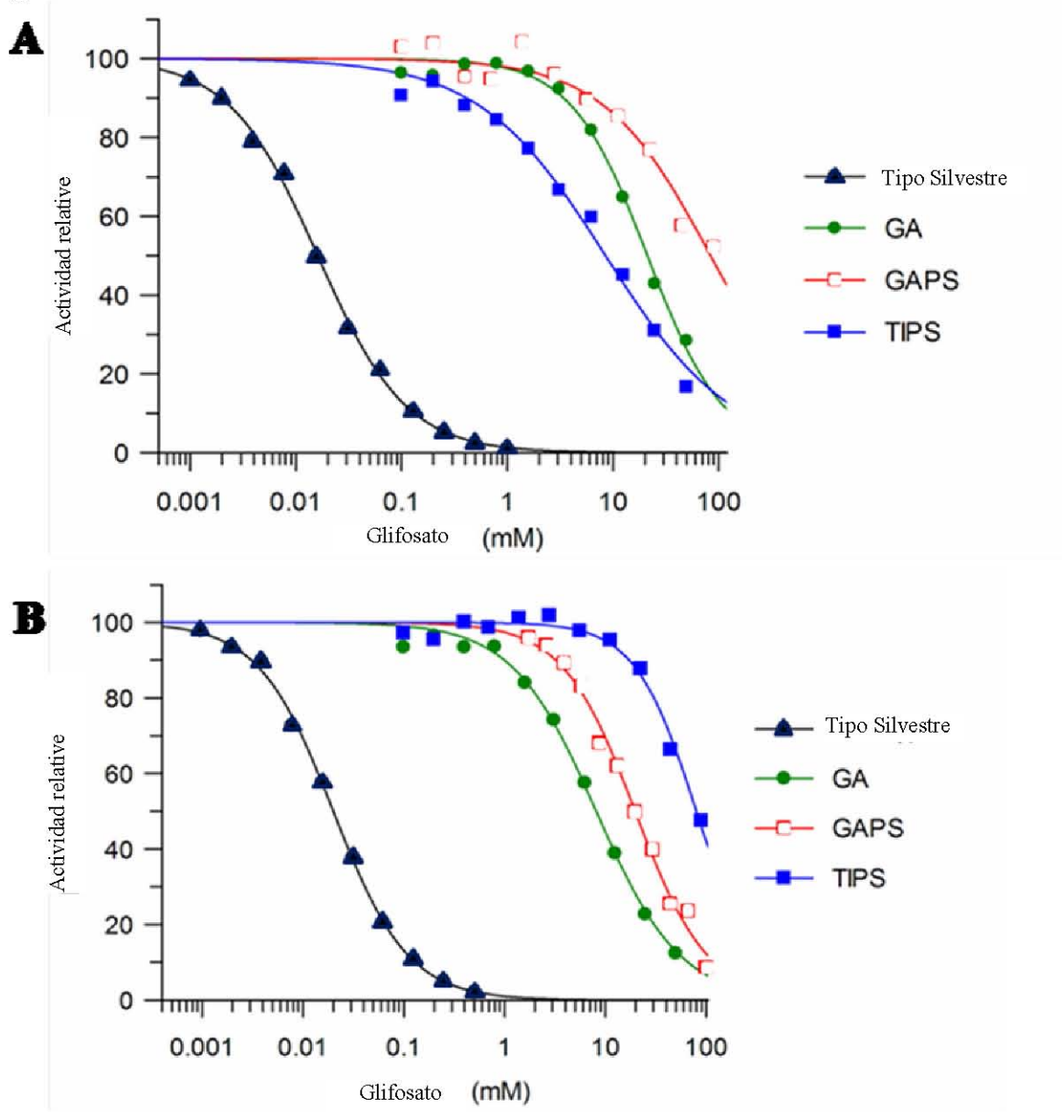

A
100
80
60
40
20
0
Actividad relative
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Glifosato (mM)
Tipo Silvestre
GA
GAPS
TIPS
B
100
80
60
40
20
0
Actividad relative
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Glifosato (mM)
Tipo Silvestre
GA
GAPS
TIPS

Fig. 28

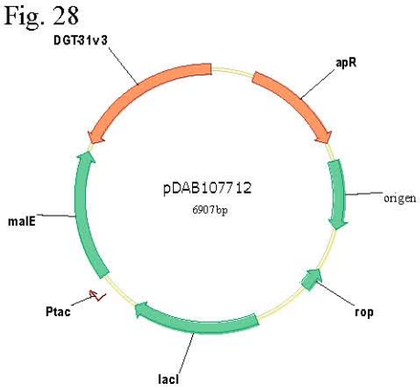


Fig. 29

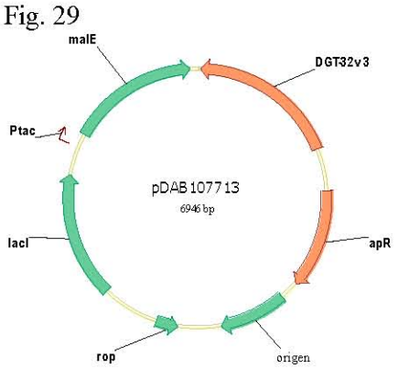


Fig. 30

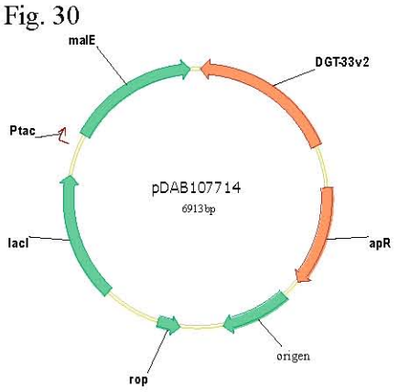


Fig. 25

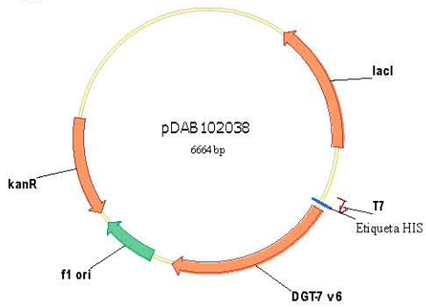


Fig. 26

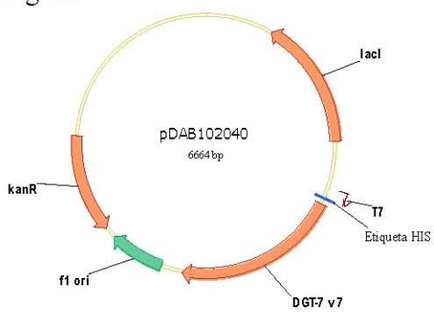


Fig. 27

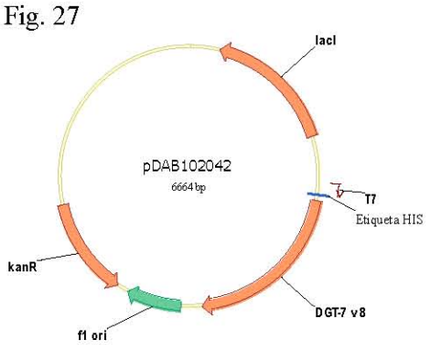


Fig. 22

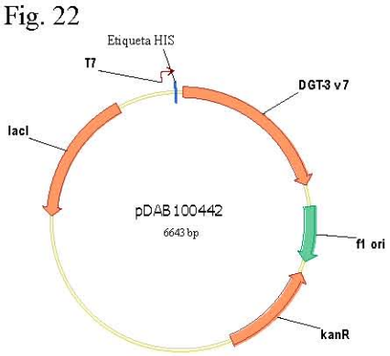


Fig. 23

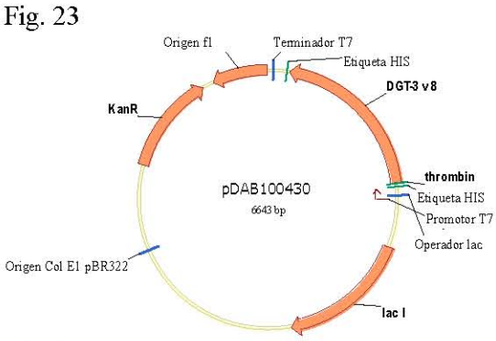


Fig. 24

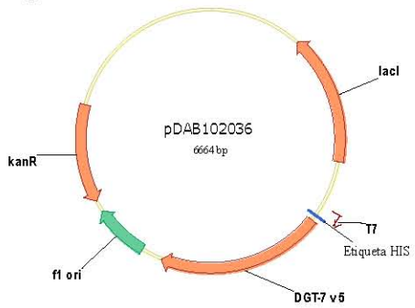


Fig. 18

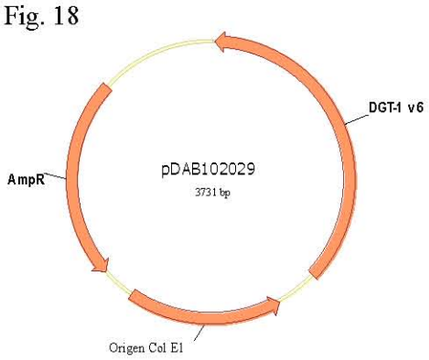


Fig. 19

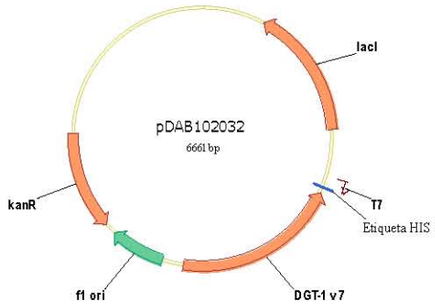


Fig. 20

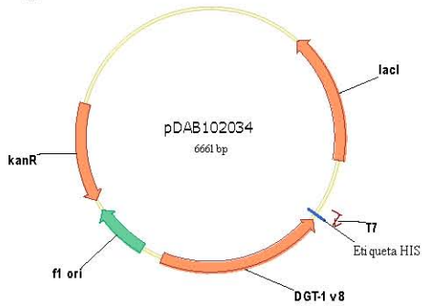


Fig. 21

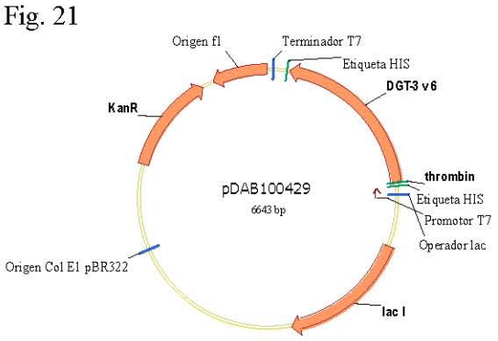


Fig. 15

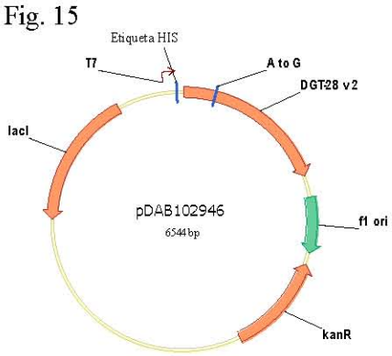


Fig. 16

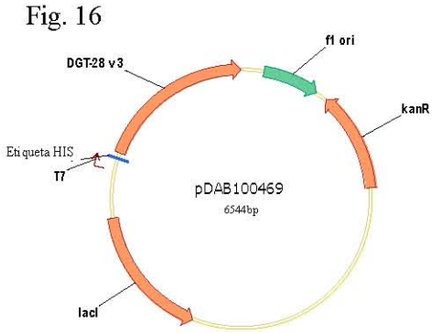


Fig. 17

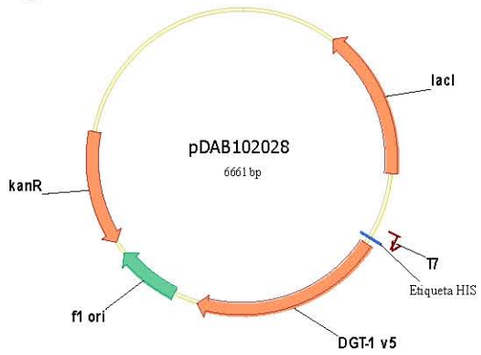


Fig. 12

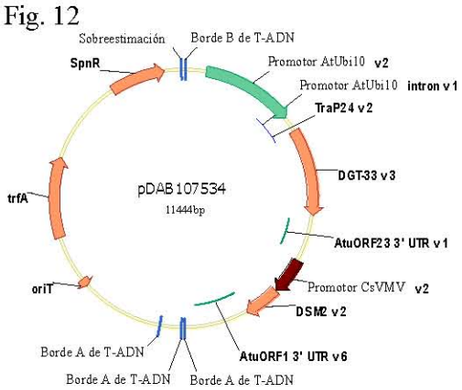


Fig. 13

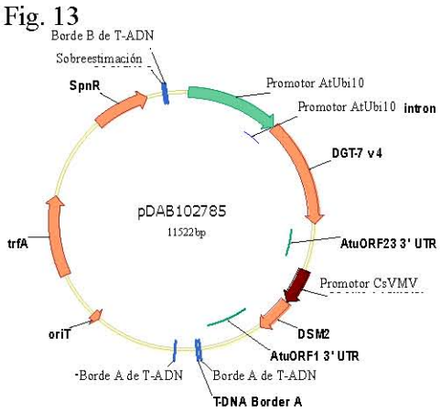


Fig. 14

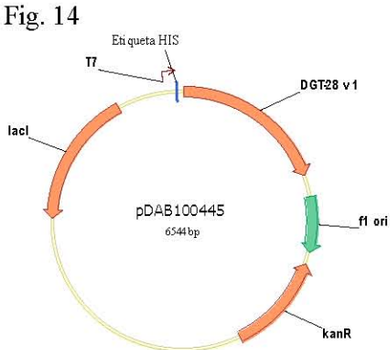


Fig.9

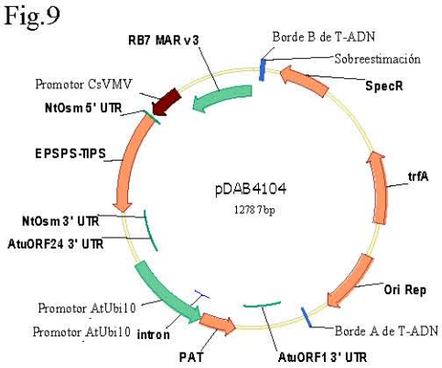


Fig.10

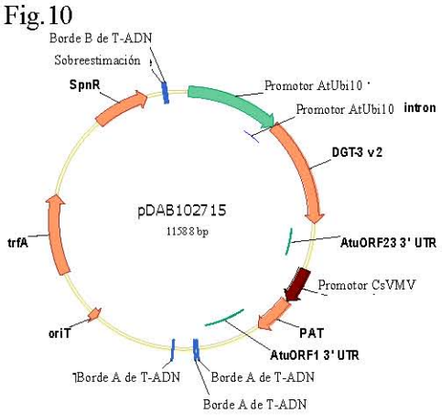


Fig.11

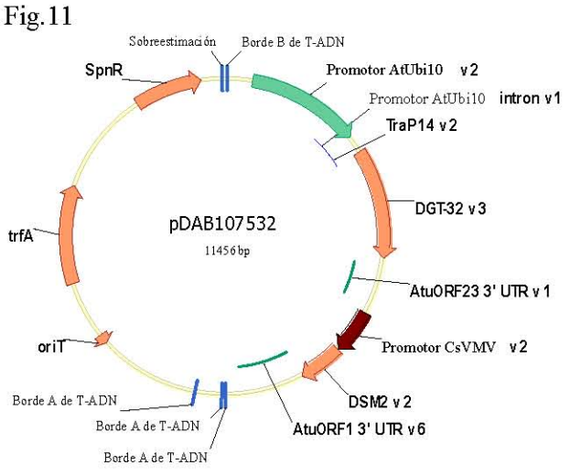


Fig.6

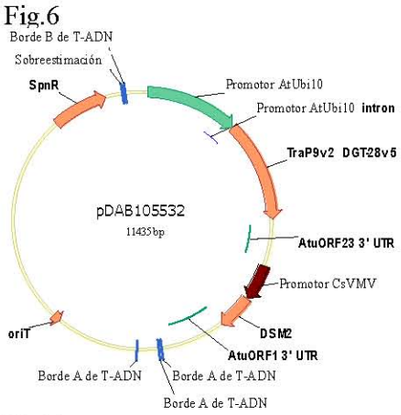


Fig.7

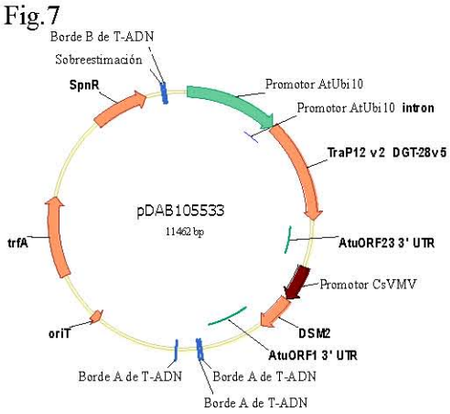


Fig.8

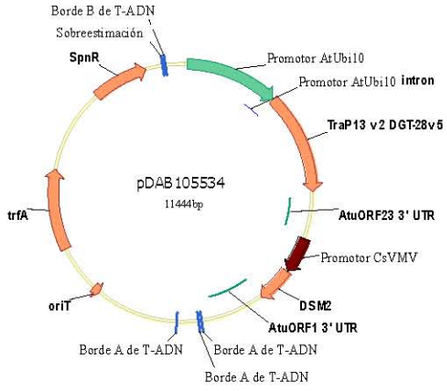


Fig.3

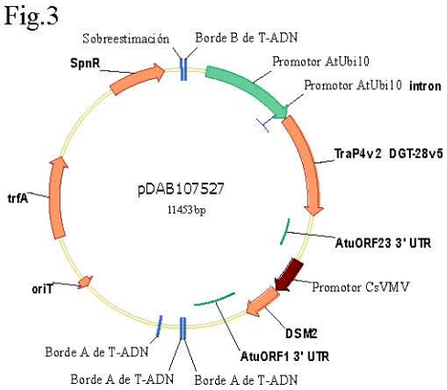


Fig.4

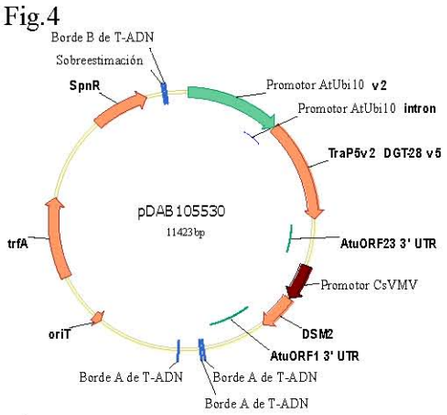
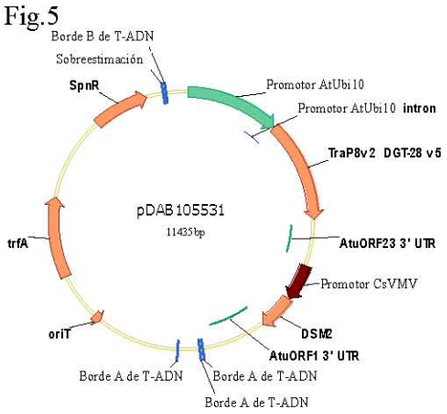


Fig.5



DRWHIEGRPSGPAAADAEVHCRDGATTARFLPTLAAAAASGTYRFDASAQMRRRPLAPLTEALRTLGVDLRHD

Fig. 2

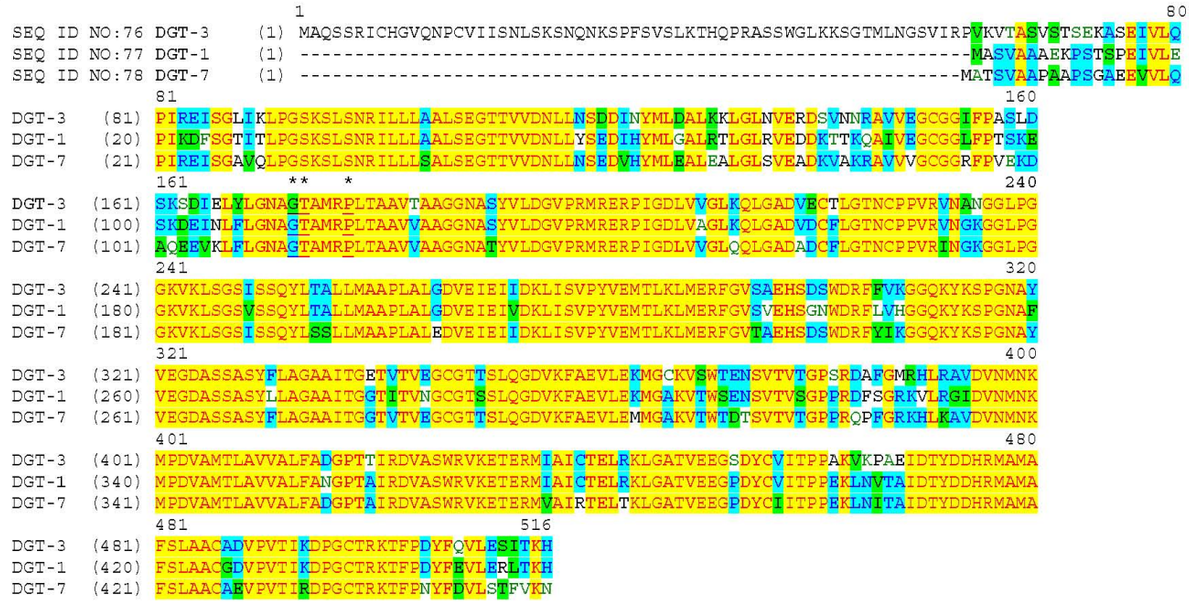


Fig. 1


SEQ ID NO:67 DGT-33 (60) --DRWRVEGRPD-GPAAPDAD-----VYCRDGATTARFLPTLVAAAASGTYRFDASAQMRRRPLAPLTRALTALGVDLRH
SEQ ID NO:68 DGT-32 (57) --DRWRVQGRPA-GPAATEAD-----VYCRDGATTARFLPTLAAAAASGTYRFDASAQMRRRPLAPLTRALTALGVDLRH
SEQ ID NO:145 DGT-31 (60) --DRWHIEGRPS-GPAAADAE-----VHCRDGATTARFLPTLAAAAASGTYRFDASAQMRRRPLAPLTEALRTLGVDLRH
SEQ ID NO:69 DGT-28 (60) --DTWQVDGRPQ-GPAVAEAD-----VYCRDGATTARFLPTLAAAG-HGTYRFDASPQMRRRPLLPLSRALRDLGVDLRH
SEQ ID NO:70 grg-23 (59) --DDWVVEGLGQ--APNLDAD-----IWCEDAGTVARFLPPFVAAG-QGKFTFDGSEQLRRRPLRPVVDGIRHLGARVSS
SEQ ID NO:71 CP4 Agro (75) --DTWIIDGVGNGGLLAPEAP------LDFGNAATGCRLTMGLVGVYDFDSTFIGDASLTKRPMGRVLNPLREMGVQVKS
SEQ ID NO:72 DGT-3 (74) VNNRAVVEGCGGIFPASLDSKSDIELYLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADVEC
SEQ ID NO:73 DGT-1 (81) TTKQAIVEGCGGLFPTSKESKDEINLFLGNAGTAMRPLTAAVVAAGGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVAGLKQLGADVDC
SEQ ID NO:74 DGT-7 (82) VAKRAVVVGCGGRFPVEKDAQEEVKLFLGNAGTAMRPLTAAVVAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLQQLGADADC
SEQ ID NO:75 aroA (69) --DRTRCEIIGNGGPLHADG--ALELFLGNAGTAMRPLAAALCLGSN--DIVLTGEPRMKERPIGHLVDALRLGGAKITY