

TÍTULO DE LA INVENCION
MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TOLERANCIA A LOS HERBICIDAS EN
PLANTAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/200.428, presentada el 3 de agosto de 2015, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias contenido en el archivo de nombre MONS383W0_ST25.txt, el cual es de 69,4 KB (medidos en MS-WINDOWS) y se creó el 27 de julio de 2016, se presenta mediante la presente por presentación electrónica y se incorpora a la presente mediante esta referencia.

ANTECEDENTES

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología. Más específicamente, la invención se refiere a moléculas de ADN recombinante que codifican enzimas que proporcionan tolerancia a herbicidas que inhiben protoporfirinógeno oxidasa.

Técnica relacionada

La producción de cultivo agrícola suele utilizar rasgos transgénicos creados utilizando los métodos de la biotecnología. Se puede introducir un gen heterólogo, también conocido como transgen, en una planta para producir un rasgo transgénico. La expresión del transgen en la planta confiere un rasgo, por ejemplo tolerancia a herbicidas, en la planta. Los ejemplos de rasgos de tolerancia a herbicidas transgénicos incluyen tolerancia a glifosato, tolerancia a glufosinato y tolerancia a dicamba. Con el aumento de especies de malezas resistentes a los herbicidas utilizados comúnmente, se necesitan nuevos rasgos de tolerancia a herbicidas en el campo. Los herbicidas de particular interés incluyen herbicidas que inhiben protoporfirinógeno oxidasa (PPO), denominados herbicidas PPO. Los herbicidas PPO proporcionan control de un espectro de malezas resistentes a herbicidas, realizando así un rasgo que confiere tolerancia a estos herbicidas particularmente útiles en un sistema de cultivos combinado con uno o más rasgos de tolerancia a herbicidas.

La protoporfirinógeno oxidasa funciona en vías de biosíntesis de clorofila y hemo donde convierte protoporfirinógeno IX en protoporfirinógeno IX. Después de la producción de protoporfirinógeno IX, las vías biosintética de clorofila y hemo divergen con diferentes iones de metal incorporados (hierro para hemo y magnesio para clorofila). Los segmentos de

esta vía se conservan a través de procariotas y eucariotas, y muchas de las enzimas PPO encontradas a través de procariotas y eucariotas son relativamente similares. Algunas procariotas (p. ej., cianobacterias) utilizan esta vía para la producción de clorofila y hemo mientras otras procariotas (p. ej., *Escherichia coli*) utilizan esta vía para la producción de hemo.

Se han aislado protoporfirinógeno oxidasas insensibles a herbicidas ("iPPO") de una cantidad de procariotas y eucariotas. En una base estructural, se cree que hay al menos tres subclases distintas de enzimas PPO: HemY (Hansson y Hederstedt, "Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* hemEHY gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes" *Journal of Bacteriology* 174(24):8081-8093 (1992)), HemG (Sasarman, et al., "Mapping of a new hem gene in *Escherichia coli* K12" *Microbiology* 113:297-303 (1979)) y HemJ (Boynton, et al., "Discovery of a gene involved in a third bacterial protoporphyrinogen oxidase activity through comparative genomic analysis and functional complementation" *Applied and Environmental Microbiology* 77(14):4795-4801 (2011)). La presente invención proporciona iPPO recombinantes novedosas que son miembros de la familia HemG. A pesar de veinte años de investigación y la cantidad de iPPO identificadas hasta la fecha, aún no se ha comercializado una planta de cultivo transgénica que comprenda una iPPO

recombinante. Una plataforma de control de malezas fuerte depende, en parte, de un desarrollo continuo de paquetes de rasgos de tolerancia a herbicidas. Identificar y utilizar iPP0 para crear rasgos de cultivo transgénicos, por lo tanto, representa un avance para la agricultura.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor heterólogo unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de polipéptidos elegida de SEQ ID NO:1-20, en donde el polipéptido tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas. En determinadas modalidades, el polipéptido tiene al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia, al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia, al menos el 95 % de identidad de secuencia, al menos el 96 % de identidad de secuencia, al menos el 97 % de identidad de secuencia, al menos el 98 % de identidad de secuencia, o al menos el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de polipéptidos elegida entre SEQ ID NO:1-20 y tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas. En algunas modalidades, se proporciona una molécula de ADN recombinante, en donde la secuencia de ácido nucleico se selecciona del

grupo que consiste en SEQ ID NO:22-63. En modalidades específicas, la molécula de ADN recombinante codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-20. Por lo tanto, la invención proporciona un polipéptido recombinante que comprende al menos el 85 % de identidad de secuencia con la longitud completa de una secuencia de aminoácidos elegida entre SEQ ID NO:1-20, en donde el polipéptido tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas.

En determinadas modalidades, un promotor heterólogo, por ejemplo, un promotor funcional en una célula de planta, está unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de polipéptidos de la invención, por ejemplo una secuencia de polipéptidos elegida de SEQ ID NO:1-20, en donde el polipéptido tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas. Dicha molécula de ADN resultante además puede comprender una secuencia diana que funciona para localizar el polipéptido dentro de una célula.

En un aspecto, la invención proporciona una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN recombinante de la invención. En una modalidad, dicha construcción de ADN comprende, en enlace operable a una secuencia de ácido nucleico de la invención, una secuencia diana que funciona

para localizar el polipéptido dentro de una célula. La molécula de ADN puede estar presente en el genoma de una planta, semilla o célula transgénica. En determinadas modalidades, el polipéptido confiere tolerancia a herbicidas a la célula, planta, semilla o parte de planta.

Otro aspecto de la invención proporciona una planta, semilla, célula o parte de planta transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante de la invención o un polipéptido recombinante de la invención. La planta, semilla, célula o parte de planta transgénica, por ende, puede comprender, es decir, presentar, tolerancia a al menos un herbicida PPO. En algunas modalidades, la planta, semilla, célula o parte de planta transgénica comprende un rasgo de tolerancia a herbicida transgénico adicional.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para conferir tolerancia a herbicidas a una planta, semilla, célula o parte de planta que comprende: expresar heterológamente un polipéptido recombinante de la invención en la planta, semilla, célula o parte de planta. En algunas modalidades del método, la planta, semilla, célula o parte de planta comprende actividad de protoporfirinógeno oxidasa conferida por el polipéptido recombinante. En algunas modalidades, la tolerancia a herbicidas es a al menos un herbicida PPO seleccionado del grupo que consiste en acifluorfen, fomesafen, lactofen, fluoroglicofen-etilo, oxifluorfen, flumioxazin,

azafenidin, etilcarfentrazona-etilo, sulfentrazona, flutiacet-metilo, oxadiargilo, oxadiazon, piraflufen-etilo, saflufenacil y S-3100.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de transformación de plantas que comprende las etapas de: a) introducir una molécula de ADN recombinante de la invención en una célula de planta; y b) regenerar una planta transgénica de allí que comprende la molécula de ADN recombinante. El método además puede comprender la etapa de seleccionar una planta tolerante a al menos un herbicida PPO. El método además puede comprender una etapa de cruzar la planta regenerada con ella misma o con una segunda planta y recoger semillas del cruce.

Aun otro aspecto de la invención proporciona un método para controlar malezas en un área de crecimiento vegetal que comprende poner en contacto un área de crecimiento vegetal que comprende la planta o semilla transgénica con al menos un herbicida PPO, en donde la planta o semilla transgénica es tolerante al herbicida PPO y en donde las malezas son controladas en el área de crecimiento vegetal.

Además, se proporciona un método de identificación de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa, el cual método comprende: a) transformar una cepa *E. coli* que tiene una inactivación de gen para la enzima PPO de *E. coli* natural con un vector de expresión bacteriana que comprende una molécula

de ADN recombinante que codifica una proteína de tolerancia a herbicidas candidata; y b) cultivar dicha *E. coli* transformada utilizando un medio bacteriano libre de hemo, en donde el creciento que utiliza dicho medio bacteriano identifica una proteína que tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa.

Además, la invención proporciona un método de identificación de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas, el cual método comprende: a) transformar una cepa *E. coli* que tiene una inactivación de gen para la enzima PPO de *E. coli* natural con un vector de expresión bacteriana que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína recombinante; y b) cultivar dicha *E. coli* transformada utilizando un medio bacteriano que contiene al menos un herbicida PPO, en donde el crecimiento de bacterias identifica una proteína que tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de selección de un gen de tolerancia a herbicidas que comprende: a) expresar una molécula de ADN recombinante de la invención en una célula de planta; y b) identificar una célula de planta que presenta tolerancia a un herbicida PPO.

Además, la invención proporciona métodos de selección de un gen de tolerancia a herbicidas que comprende: a) expresar una molécula de ADN recombinante de la invención en célula

bacteriana que carece de HemG, en donde la célula bacteriana se cultiva en un medio libre de hemo en presencia de un herbicida PPO; y b) identificar una célula bacteriana que presenta tolerancia a un herbicida PPO.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de una planta tolerante a un herbicida PPO y al menos un herbicida diferente que comprende: a) obtener una planta que comprende una molécula de ADN recombinante de la invención; b) cruzar la planta transgénica con una segunda planta que comprende tolerancia a al menos un herbicida diferente, y c) seleccionar una planta progenie resultante de dicho cruce que comprende tolerancia a un herbicida PPO y el al menos un herbicida diferente es otro aspecto de la invención.

La invención también proporciona, en otro aspecto, un método para reducir el desarrollo de malezas tolerantes a herbicidas que comprende: a) cultivar en un entorno de crecimiento de cultivo una planta de la presente invención que comprende tolerancia a un herbicida PPO, por ejemplo comprendiendo una molécula de ADN de la presente invención, y comprende tolerancia a al menos un herbicida diferente; y b) aplicar un herbicida PPO y al menos un herbicida diferente al ente de crecimiento de cultivo, en donde la planta de cultivo es tolerante al herbicida PPO y el al menos otro herbicida diferente. En determinadas modalidades del método, el

herbicida PPO se puede seleccionar del grupo que consiste en acifluorfen, fomesafen, lactofen, fluoroglicofen-etilo, oxifluorfen, flumioxazin, azafenidin, etilcarfentrazona-etilo, sulfentrazona, flutiacet-metilo, oxadiargilo, oxadiazon, piraflufen-etilo, saflufenacil y S-3100. En algunas modalidades del método, el al menos un herbicida diferente se selecciona del grupo que consiste en: un inhibidor de ACCasa, un inhibidor de ALS, un inhibidor de EPSPS, una auxina sintética, un inhibidor de fotosíntesis, un inhibidor de síntesis de glutamina, un inhibidor de HPPD, un inhibidor de PPO, y un inhibidor de ácidos grasos de cadena larga. En modalidades específicas, el inhibidor de ACCasa es un ariloxifenoxi propionato o una ciclohexanodiona; el inhibidor de ALS es una sulfonilurea, imidazolinona, triazolopirimidina o una triazolinona; el inhibidor de EPSPS es glifosato; la auxina sintética es un herbicida fenoxi, un ácido benzoico, un ácido carboxílico o una semicarbazona; el inhibidor de fotosíntesis es una triazina, una triazinona, un nitrilo, un benzotiadiazol o una urea; el inhibidor de síntesis de glutamina es glufosinato; el inhibidor de HPPD es un isoxazol, una pyrazolona o una tricetona; el inhibidor de PPO es un difeniléter, una N-fenilftalimida, un triazinona de arilo o una pirimidinediona; o el inhibidor de ácidos grasos de cadena larga es una cloroacetamida, un oxiacetamida o un pirazol.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Alineación de secuencias de proteínas H_N90, H_N20, H_N60, H_N10, H_N30, H_N40, H_N50, H_N70, H_N100 y H_N110 (SEQ ID NO:1-10) con las posiciones de consenso mostradas a continuación.

Figura 2. Resultados de ensayos del sistema de selección bacteriana de PPO con herbicidas PPO medidos a las 8 horas de crecimiento de *E. coli* que contiene la iPP0 evaluada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 es la secuencia de aminoácidos de H_N90.

SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de H_N20.

SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos de H_N60.

SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de H_N10, que es la protoporfirinógeno oxidasa de HemG salvaje de *E. coli* (NCBI N.º de acceso a GenBank WP_021498199).

SEQ ID NO:5 es la secuencia de aminoácidos de H_N30.

SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de H_N40.

SEQ ID NO:7 es la secuencia de aminoácidos de H_N50.

SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de H_N70.

SEQ ID NO:9 es la secuencia de aminoácidos de H_N100.

SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos de H_N110.

De SEQ ID NO:11 a SEQ ID NO:17 son las secuencias de aminoácidos que carecen de la metionina de inicio correspondiente a SEQ ID NO:1, 2, 4, 5, 6, 7 y 9,

respectivamente.

SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:19 son variantes de aminoácidos de SEQ ID NO:11.

SEQ ID NO:20 es una variante de aminoácido de SEQ ID NO:17.

SEQ ID NO:21 es la secuencia de aminoácidos de WH, que es la protoporfirinógeno oxidasa salvaje de *Amaranthus tuberculatus* (cáñamo de agua).

De SEQ ID NO:22 a SEQ ID NO:31 son secuencias de nucleótidos que codifican de SEQ ID NO.: 1 a SEQ ID NO:10, respectivamente, optimizados por codones para la expresión de *E. coli*.

De SEQ ID NO:32 a SEQ ID NO:41 son las secuencias de nucleótidos que codifican de SEQ ID NO.: 1 a SEQ ID NO:10, respectivamente, optimizados por codones para la expresión dicotiledónea.

De SEQ ID NO:42 a SEQ ID NO:48 son las secuencias de nucleótidos que codifican de SEQ ID NO:11 a SEQ ID NO:17, respectivamente, optimizados por codones para la expresión dicotiledónea.

SEQ ID NO:49 y SEQ ID NO:52 son variantes de nucleótidos de SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, respectivamente.

SEQ ID NOs:50, 51 y 53 son secuencias de nucleótidos que codifican SEQ ID NO:18, 19 y 20.

De SEQ ID NO:54 a SEQ ID NO:63 son las secuencias de nucleótidos que codifican de SEQ ID NO.: 1 a SEQ ID NO:10,

respectivamente, optimizados por codones para la expresión monocotiledónea.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se proporcionan las siguientes descripciones y definiciones para definir mejor la invención y para guiar a los entendidos en la técnica en la práctica de la invención. A menos que se indique lo contrario, los términos se entenderán de acuerdo con el uso convencional que le dan los expertos en la técnica.

La invención proporciona moléculas de ADN recombinante novedosas y proteínas que codifican protoporfirinógeno oxidasa (iPP0) insensible a herbicidas. Por ejemplo, en una modalidad, la invención proporciona vectores y casetes de expresión que codifican iPP0 derivadas de microbios para la expresión en células y plantas. También se proporcionan métodos para producir células y plantas tolerantes a herbicidas PP0. La invención además proporciona métodos y composiciones para utilizar herramientas de modificación genética de proteína y bioinformáticas para obtener y mejorar iPP0.

En aspectos específicos, la invención proporciona moléculas de ADN recombinante y proteínas. Tal como se utiliza en la presente, el término “recombinante” se refiere a un ADN, proteína, célula, semilla u organismo de origen no natural que es el resultado de modificación genética y como tal normalmente no se encuentra en la naturaleza. Una “molécula de

ADN recombinante" es una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que no se produce de forma natural en la naturaleza y como tal es el resultado de la intervención humana, por ejemplo una molécula de ADN compuesta de al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí. Un ejemplo de una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN proporcionada en la presente que codifica protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas unida operativamente a un elemento regulador heterólogo u otro elemento, por ejemplo un promotor heterólogo. Una "proteína recombinante" es una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que no se produce naturalmente y como tal es el resultado de la intervención humana, por ejemplo una proteína modificada genéticamente o una proteína quimérica. Una célula, semilla u organismo recombinante es una célula, semilla u organismo que comprende ADN transgénico, por ejemplo una célula, semilla, planta o parte de planta transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante y, por lo tanto, se produce como resultado de la transformación de plantas.

Tal como se utiliza en la presente, el término "modificación genética" se refiere a la creación de un ADN, proteína u organismo no natural que normalmente no se encuentra en la naturaleza y, por lo tanto, comprende la aplicación de intervención humana. Se puede utilizar modificación genética para producir un ADN, proteína u organismo modificado

genéticamente que se concibió y se creó en el laboratorio utilizando una o más técnicas de biotecnología tal como biología molecular, bioquímica de proteína, transformación bacteriana y transformación de plantas. Por ejemplo, se puede utilizar modificación genética para crear un gen quimérico que comprende al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí utilizando una o más de las técnicas de biología molecular, por ejemplo clonación génica, ligación de ADN y síntesis de ADN. Un gen quimérico puede consistir de dos o más moléculas de ADN heterólogas que se unen operativamente, por ejemplo una secuencia codificante de proteínas unida operativamente a un elemento de expresión génica tal como una secuencia codificante de péptidos de tránsito o un promotor heterólogo. Se puede utilizar modificación genética para crear una proteína modificada genéticamente cuya secuencia de polipéptidos se creó utilizando una o más de las técnicas de modificación genética de proteínas, por ejemplo diseño de proteínas que utiliza mutagénesis dirigida al sitio y evolución dirigida que utiliza mutagénesis aleatoria y transposición de ADN. Una proteína modificada genéticamente puede tener una o más eliminaciones, inserciones o sustituciones con respecto a la secuencia codificante de la proteína salvaje y cada eliminación, inserción o sustitución puede consistir de uno o más aminoácidos. En otra modalidad, una proteína modificada genéticamente puede consistir en dos

péptidos heterólogos que se unen operativamente, por ejemplo una enzima unida operativamente a un péptido de tránsito.

Tal como se utiliza en la presente, "insensible a herbicidas" significa la capacidad de una protoporfirinógeno oxidasa (PPO) de mantener al menos parte de su actividad enzimática en presencia de uno o más herbicidas PPO. La actividad enzimática de una protoporfirinógeno oxidasa se puede medir a través de cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, a través de un ensayo enzimático en el cual la producción del producto de protoporfirinógeno oxidasa o el consumo del sustrato de protoporfirinógeno oxidasa en presencia de uno o más herbicidas PPO se mide a través de fluorescencia, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o espectrometría de masas (MS). Otro ejemplo de un ensayo para medir actividad enzimática de una protoporfirinógeno oxidasa es un ensayo bacteriano, por ejemplo los ensayos de crecimiento descritos en la presente, por los cuales se expresa una protoporfirinógeno oxidasa recombinante en una célula bacteriana que de otro modo carece de actividad de PPO y se mide la capacidad de la protoporfirinógeno oxidasa recombinante de complementar este fenotipo de inactivación. La insensibilidad a Herbicidas puede ser insensibilidad completa o parcial a un herbicida parcial, y puede ser expresada como un porcentaje (%) de tolerancia o insensibilidad a un herbicida PPO particular. Tal como se utiliza en la presente,

una "protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas" o "iPP0" presenta insensibilidad a herbicidas en presencia de uno o más herbicidas PPO.

Tal como se utiliza en la presente, una "cepa de inactivación *hemG*" significa un organismo o célula de un organismo, por ejemplo *E. coli*, que carece de actividad de HemG en la medida en que es incapaz de crecer en medio de crecimiento libre de hemo, o de tal manera que su crecimiento es alterado de forma detectable en ausencia de hemo con respecto a una cepa de otro modo isogénica que comprende una HemG. Una cepa de inactivación *hemG*, por ejemplo, de *E. coli* se puede preparar en vista de los conocimientos en el técnica, por ejemplo en vista de la secuencia *hemG* de *E. coli* (Ecogene N.º de acceso EG11485; Sasarman et al., "Nucleotide sequence of the *hemG* gene involved in the protoporphyrinogen oxidase activity of *Escherichia coli* K12" *Can J Microbiol* 39:1155-1161, 1993).

Como se usa en la presente, el término "transgen" se refiere a una molécula de ADN incorporada artificialmente en el genoma del organismo debido a la intervención humana, por ejemplo un método de transformación de plantas. Tal como se utiliza en la presente, el término "transgénico" significa que comprende un transgen, por ejemplo una "planta transgénica" se refiere a una planta que comprende un transgen en su genoma y un "rasgo transgénico" se refiere a una característica o fenotipo transportado o conferido por la presencia de un transgen

incorporado en el genoma de la planta. Debido a dicha alteración genómica, la planta transgénica es algo claramente diferente de la planta salvaje relacionada y el rasgo transgénico es un rasgo que no se encuentra naturalmente en la planta salvaje. Las plantas transgénicas de la invención comprenden las moléculas de ADN recombinante y proteínas modificadas genéticamente proporcionadas por la invención.

Tal como se utiliza en la presente, el término "heterólogo" se refiere a la relación entre dos o más componentes derivados de diferentes fuentes y, por ende, no asociados normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante codificante de proteínas es heteróloga con respecto a un promotor unido operativamente si dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Además, una molécula de ADN recombinante particular puede ser heteróloga con respecto a una célula, semilla u organismo en el cual se inserta cuando no se produce naturalmente en esa célula, semilla u organismo particular.

Tal como se utiliza en la presente, el término "aislado" se refiere a la separación al menos parcial de una molécula de otras moléculas asociadas típicamente con ella en su estado natural. En una modalidad, el término "aislado" se refiere a una molécula de ADN que está separada de los ácidos nucleicos que normalmente flanquean la molécula de ADN en su estado natural. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica una

proteína que está presente naturalmente en una bacteria es una molécula de ADN aislada si no se encuentra dentro del ADN de la bacteria en la cual la molécula de ADN que codifica la proteína se encuentra naturalmente. Por ende, una molécula de ADN fusionada o unida operativamente a una o más moléculas de ADN diferentes con las cuales no se encontraría asociada en la naturaleza, por ejemplo, como consecuencia de técnicas de transformación de plantas o ADN recombinante, se considera aislada en la presente. Estas moléculas se consideran aisladas incluso cuando están integradas en el cromosoma de una célula hospedadora o presentes en una solución de ácido nucleico con otras moléculas de ADN.

Tal como se utiliza en la presente, el término "molécula de ADN codificante de proteínas" se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. Una "secuencia codificante de proteínas" significa una secuencia de ADN que codifica una proteína. Una "secuencia" significa una disposición secuencial de nucleótidos o aminoácidos. Los límites de una secuencia codificante de proteínas se pueden determinar por un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de detención de traducción en el extremo 3'. Una molécula codificante de proteínas puede comprender una secuencia de ADN que codifica una secuencia de proteínas. Tal como se utilizan en la presente, "expresión transgénica", "expresar un transgen",

“expresión de proteínas” y “expresar una proteína” significan la producción de una proteína a través del proceso de transcripción de una molécula de ADN en ARN mensajero (ARNm) y traducción del ARNm en cadenas polipeptídicas, que en última instancia se pliegan en proteínas. Una molécula de ADN codificante de proteínas puede estar unida operativamente a un promotor heterólogo en una construcción de ADN para su uso en la expresión de la proteína en una célula transformada con la molécula de ADN recombinante. Tal como se utiliza en la presente, “unidas operativamente” significa dos moléculas de ADN unidas de tal manera que una puede afectar la función de la otra. Las moléculas de ADN unidas operativamente pueden ser parte de una molécula contigua simple y pueden ser adyacentes o no. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una molécula de ADN codificante de proteínas en una construcción de ADN donde las dos moléculas de ADN están dispuestas de tal manera que el promotor puede afectar la expresión del transgen.

Tal como se utiliza en la presente, una “construcción de ADN” es una molécula de ADN recombinante que comprende dos o más secuencias de ADN heterólogo. Las construcciones de ADN son útiles para la expresión transgénica y pueden estar comprendidas en vectores y plásmidos. Las construcciones de ADN se pueden utilizar en vectores para la transformación, es decir, la introducción de ADN heterólogo en una célula

hospedadora, para producir plantas y células transgénicas, y como tal también pueden estar comprendidas en el ADN plástido o ADN genómico de una planta, semilla, célula o parte de planta transgénica. Tal como se utiliza en la presente, un "vector" significa cualquier molécula de ADN recombinante que se puede utilizar para la transformación bacteriana o de plantas. Las moléculas de ADN recombinante establecidas en el listado de secuencias, por ejemplo, se pueden insertar en un vector como parte de una construcción que tiene la molécula de ADN recombinante unida operativamente a un elemento de expresión génica que funciona en una planta para afectar la expresión de la proteína modificada genéticamente codificada por la molécula de ADN recombinante. Los métodos generales útiles para manipular moléculas de ADN para realizar y utilizar construcciones de ADN recombinante y vectores de transformación de plantas son conocidos en la técnica y se describen detalladamente, por ejemplo, en guías y manuales de laboratorio que incluyen MR Green y J Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (cuarta edición) ISBN:978-1-936113-42-2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2012). Los componentes de una construcción de ADN, o un vector que comprende una construcción de ADN, incluyen uno o más elementos de expresión génica unidos operativamente a una secuencia de ADN que se puede transcribir, por ejemplo los siguientes: un promotor para la expresión de un ADN unido

operativamente, una molécula de ADN codificante de proteínas unida operativamente y una región no traducida (UTR) 3' unida operativamente. Los elementos de expresión génica útiles en la práctica de la presente invención incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes tipos de elementos: promotor, UTR 5', potenciador, líder, elemento que actúa en cis, intrón, secuencia diana, UTR 3' y uno o más transgenes marcadores seleccionables.

Las construcciones de ADN de la invención pueden incluir un promotor unido operativamente a una molécula de ADN codificante de proteínas proporcionada por la invención, por la cual el promotor dirige la expresión de la molécula de proteína recombinante. Los promotores útiles para la práctica de la presente invención incluyen los que funcionan en una célula para la expresión de un polinucleótido unido operativamente, por ejemplo un promotor bacteriano o vegetal. Los promotores vegetales son variados y conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los que son inducibles, virales, sintéticos, constitutivos, regulados temporalmente, regulados espacialmente y/o regulados espacio-temporalmente.

En una modalidad de la invención, una construcción de ADN proporcionada en la presente incluye una secuencia diana que está unida operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una molécula de polipéptidos que tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas, por lo que

la secuencia diana facilita la localización de la molécula de polipéptidos dentro de la célula. En la técnica las secuencias diana se conocen como secuencias de señal, péptidos diana, secuencias de localización y péptidos de tránsito. Un ejemplo de una secuencia diana es un péptido de tránsito a cloroplastos (CTP), una secuencia diana mitocondrial (MTS) o un péptido diana mitocondrial y de cloroplasto doble. Al facilitar la localización de la proteína dentro de la célula transgénica, la secuencia diana puede aumentar la acumulación de proteína recombinante, proteger la proteína de la degradación proteolítica y/o mejorar el nivel de tolerancia a herbicidas, y, por lo tanto, reducir los niveles de lesión en la célula, semilla u organismo transgénico después de la aplicación del herbicida.

Los CTP y otras moléculas diana que se pueden utilizar en conexión con la presente invención se conocen en la técnica e incluyen, entre otros, el CTP de EPSPS *Arabidopsis thaliana* (Klee et al., *Mol Gen Genet.* 210:437-442, 1987), el CTP de EPSPS de *Petunia hybrida* (della-Cioppa et al., *PNAS* 83:6873-6877, 1986), la secuencia señal cab-m7 de maíz (Becker et al., *Plant Mol Biol.* 20:49-60, 1992; PCT WO 97/41228), una presecuencia mitocondrial (p. ej. Silva Filho et al., *Plant Mol Biol* 30:769-780, 1996), y la secuencia señal de glutatión reductasa de la arveja (Creissen et al., *Plant J.* 8:167-175, 1995; PCT WO 97/41228).

Las moléculas de ADN recombinante de la presente invención se pueden sintetizar y modificar a través de métodos conocidos en la técnica, ya sea completamente o en parte, donde es deseable proporcionar secuencias útiles para la manipulación de ADN (tal como la restricción de sitios de reconocimiento de enzimas o sitios de clonación basada en recombinación), secuencias preferidas de plantas (tal como uso de codón de planta o secuencias de consenso Kozak) o secuencias útiles para el diseño de construcciones de ADN (tales como secuencias espaciadoras o enlazadoras). La presente invención incluye moléculas de ADN recombinante y proteínas modificadas genéticamente que tienen al menos el 70 % de identidad de secuencia, al menos el 80 % de identidad de secuencia, al menos el 85 % de identidad de secuencia, al menos el 90 % de identidad de secuencia, al menos el 95 % de identidad de secuencia, al menos el 96 % de identidad de secuencia, al menos el 97 % de identidad de secuencia, al menos el 98 % de identidad de secuencia, y al menos el 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las moléculas de ADN recombinante o secuencias de polipéptidos proporcionadas en la presente, y que tienen actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas. Tal como se utiliza en la presente, la frase "porcentaje de identidad de secuencia" o "% de identidad de secuencia" se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos idénticos en una secuencia de polinucleótidos o

polipéptidos lineal de una secuencia de referencia ("de consulta") (o su cadena complementaria) en comparación con una secuencia de prueba ("sujeto") (o su cadena complementaria) cuando las dos secuencias se alinean de forma óptima (con inserciones, eliminaciones o brechas de nucleótidos o aminoácidos adecuadas que totalizan menos del 20 por ciento de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación). La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación es conocida por los expertos en la técnica y se puede llevar a cabo con herramientas tales como el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, al algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, y a través de implementaciones computarizadas de estos algoritmos tales como GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA disponibles como parte del paquete de software Sequence Analysis de GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., San Diego, CA), MEGAlign (DNASTar Inc., 1228 S. Park St., Madison, WI 53715), y MUSCLE (versión 3.6) (Edgar, "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput" *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-7 (2004)), por ejemplo, con parámetros por defecto. Una "fracción de identidad" para segmentos alineados de una secuencia de prueba y una secuencia de referencia es la cantidad de componentes idénticos que son compartidos por las dos secuencias alineadas por la cantidad total de componentes

en la parte del segmento de secuencia de referencia que se alinea, es decir, la secuencia de referencia completa o una parte definida más pequeña de la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia se representa como la fracción de identidad multiplicada por 100. La comparación de una o más secuencias puede ser con una secuencia de longitud completa o una parte de esta, o con una secuencia más larga.

Las proteínas modificadas genéticamente se pueden producir mediante el cambio (es decir, modificación) de una proteína salvaje para producir una proteína nueva con características modificadas, p. ej., un patrón de localización celular particular, tales como dirigidas al cloroplasto o mitocondria, o una combinación novedosa de características de proteína útiles, tales como $V_{\text{máx}}$, K_m , K_i , IC_{50} alterados, especificidad del sustrato, especificidad del inhibidor/herbicida, selectividad del sustrato, la capacidad de interactuar con otros componentes en la célula tal como proteínas o membranas compañeras, y estabilidad de la proteína, entre otros. Las modificaciones se pueden realizar en posiciones de aminoácidos específicas en una proteína y pueden ser una sustitución del aminoácido encontrado en esa posición en la naturaleza (es decir, en la proteína salvaje) con un aminoácido diferente. Las proteínas modificadas genéticamente proporcionadas por la invención, por ende, proporcionan una proteína nueva con una o más características de proteínas alteradas con respecto a una

proteína similar encontrada en la naturaleza. En una modalidad de la invención, una proteína modificada genéticamente tiene características de proteínas alteradas, por ejemplo las que provocan disminución de sensibilidad a uno o más herbicidas en comparación con una proteína salvaje similar, o capacidad mejorada de conferir tolerancia a herbicidas en una planta transgénica que expresa la proteína modificada genéticamente a uno o más herbicidas. En una modalidad, la invención proporciona una proteína modificada genéticamente, y la molécula de ADN recombinante que la codifica, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de la tabla 1 y que tiene al menos aproximadamente el 70 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia, aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia y aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de proteínas modificadas genéticamente proporcionadas en la presente, incluso, entre otros, SEQ ID NO:1-20. Se pueden realizar mutaciones de aminoácidos como una sustitución de aminoácidos simple en la proteína o en combinación con una o más mutaciones, por

ejemplo una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos diferentes. Las mutaciones se pueden realizar a través de cualquier método conocido por los expertos en la técnica.

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos.

Residuo	Sustituciones conservadoras	Residuo	Sustituciones conservadoras
Ala	Ser	Leu	Ile, Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu; Val		

Tal como se utiliza en la presente, “salvaje” significa una versión de origen natural similar pero no idéntica. Una “molécula de ADN salvaje” o “proteína salvaje” es una versión de origen natural de la molécula de ADN o proteína, es decir, una versión de la molécula de ADN o proteína preexistente en la naturaleza. Un ejemplo de una proteína salvaje útil para la comparación con las proteínas modificadas genéticamente proporcionadas por la invención es la protoporfirinógeno oxidasa de *Arabidopsis thaliana*. Una “planta salvaje” es una planta no transgénica del mismo tipo que la planta transgénica, y como tal es genéticamente diferente de la planta transgénica que comprende el rasgo de tolerancia a herbicidas. Los ejemplos de una planta salvaje útiles para la comparación con plantas de maíz transgénicas son maíz LH244 no

transgénico (número de depósito ATCC PTA-1173) y maíz endogámico 01DKD2 (I294213) (número de depósito ATCC PTA-7859). Para las plantas de soja transgénicas, una línea comparativa ejemplar sería soja A3555 no transgénica (número de depósito ATCC PTA-10207), y para plantas de algodón transgénicas una línea comparativa ejemplar sería Coker 130 no transgénico (número de protección de variedad de plantas 8900252).

Plantas transgénicas y herbicidas

Un aspecto de la invención incluye células de plantas transgénicas, tejidos de plantas transgénicas, plantas transgénicas y semillas transgénicas que comprenden las moléculas de ADN recombinante y las proteínas modificadas genéticamente proporcionadas por la invención. Estas células, tejidos, plantas y semillas que comprenden las moléculas de ADN recombinante y las proteínas modificadas genéticamente presentan tolerancia a herbicidas a uno o más herbicidas PPO y, opcionalmente, tolerancia a uno o más herbicidas adicionales.

Los métodos adecuados para la transformación de células de plantas hospedadoras para su uso con la presente invención incluyen prácticamente cualquier método a través del cual se puede introducir ADN en una célula (por ejemplo, cuando una construcción de ADN recombinante está integrada en forma estable en un cromosoma de planta) y son conocidos en la

técnica. Un método ejemplar y ampliamente utilizado para introducir una construcción de ADN recombinante en plantas es el sistema de transformación de *Agrobacterium*, el cual es conocido por los expertos en la técnica. Otro método ejemplar para introducir una construcción de ADN recombinante en plantas es la inserción de una construcción de ADN recombinante en un genoma de planta en un sitio predeterminado a través de métodos de integración dirigida al sitio. La integración dirigida al sitio se puede lograr a través de cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de nucleasas de dedos de cinc, meganucleasas modificadas genéticamente o naturales, TALE-endonucleasas o una endonucleasa guiada por ARN (por ejemplo un sistema CRISPR/Cas9). Se pueden regenerar plantas transgénicas a partir de una célula de planta transformada a través de métodos de cultivo de células de plantas. Una planta transgénica homocigota con respecto a un transgen (es decir, dos copias alélicas del transgen) se puede obtener mediante autopolinización (autofecundación) de una planta transgénica que contiene un alelo de transgen único consigo mismo, por ejemplo una planta R0, para producir semillas R1. Un cuarto de la semilla R1 producida es homocigótica con respecto al transgen. Las plantas cultivadas a partir de la germinación de semilla R1 se puede evaluar para detectar la cigosidad, utilizando un ensayo SNP, una secuenciación de ADN o un ensayo

de amplificación térmica que permite la distinción entre heterocigotas y homocigotas, denominado ensayo de cigosidad.

Tal como se utiliza en la presente, un "herbicida inhibidor PPO" o "herbicida PPO" es un químico que tiene como diana e inhibe la actividad enzimática de una protoporfirinógeno oxidasa (PPO), que cataliza la deshidrogenación de protoporfirinógeno IX para formar protoporfirina IX, que es el precursor para hemo y clorofila. La inhibición de protoporfirinógeno oxidasa provoca la formación de especies de oxígeno reactivo, lo que produce la alteración de la membrana celular y, en última instancia, la muerte de células susceptibles. Los herbicidas PPO son conocidos en la técnica y se encuentran disponibles a nivel comercial. Los ejemplos de herbicidas PPO incluyen, entre otros, difeniléteres (por ejemplo acifluorfen, sus sales y ésteres, aclonifen, bifenox, sus sales y ésteres, etoxifen, su sales y ésteres, fluoronitrofen, furiloxifen, halosafen, clometoxifen, fluoroglicofen, sus sales y ésteres, lactofen, sus sales y ésteres, oxifluorfen, y fomesafen, sus sales y ésteres); tiadiazoles (por ejemplo flutiacet-metilo y tidiazimina); pirimidindionas o feniluracilos (por ejemplo benzofendizona, butafenacil, etilo [3-2-cloro-4-fluoro-5-(1-metil-6-trifluorometil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-3-il)fenoxi]-2-piridiloxi]acetato (número de registro CAS 353292-31-6 y denominado en la presente S-3100), flupropacil,

saflufenacil y tiafenacil); fenilpirazoles (por ejemplo fluazolato, piraflufen y piraflufen-etilo); oxadiazoles (por ejemplo oxadiargilo y oxadiazon); triazolinonas (por ejemplo azafenidin, bencarbazona, carfentrazona, sus sales y ésteres y sulfentrazona); oxazolidinedionas (por ejemplo pentoxazona); N-fenilftalimidas (por ejemplo cinidon-etilo, flumiclorac, flumiclorac-pentilo y flumioxazin); derivados de benzoxazinona (por ejemplo 1,5-dimetil-6-tioxo-3-(2,2,7-trifluoro-3,4-dihidro-3-oxo-4-prop-2-inil-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-1,3,5-triazinana-2,4-diona); flufenpir y flufenpir-etilo; piraclonil; y profluazol. Las protoporfirinógenos oxidasas y las células, semillas, plantas y partes de plantas proporcionadas por la invención presentan tolerancia a herbicidas a uno o más herbicidas PPO.

Los herbicidas se pueden aplicar a un área de cultivo de plantas que comprende las plantas y semillas proporcionadas por la invención como un método para controlar malezas. Las plantas y semillas proporcionadas por la invención comprenden un rasgo de tolerancia a herbicidas y como tal son tolerante a la aplicación de uno o más herbicidas PPO. La aplicación de herbicidas puede ser la tasa comercial recomendada (1X) o cualquier fracción o múltiple de la misma, por ejemplo dos veces la tasa comercial recomendada (2X). Las tasas de herbicidas se pueden expresar como equivalente ácido por libra por acre (lb ae/acre) o equivalente ácido por gramo por

hectárea (g ae/ha) o como ingrediente activo en libras por acre (lb ai/acre) o ingrediente activo en gramos por hectárea (g ai/ha), dependiendo del herbicida y la formulación. La aplicación de herbicidas comprende al menos un herbicida PPO. El área de cultivo de plantas puede comprender o no plantas de malezas en el momento de la aplicación de herbicida. Una dosis eficaz como herbicida de herbicidas PPO para su uso en un área para controlar malezas puede consistir en un intervalo de entre aproximadamente 0,1X y aproximadamente 30X tasas de etiqueta durante una temporada de cultivo. La tasa de etiqueta 1X para algunos herbicidas PPO ejemplares se proporciona en la tabla 2. Un (1) acre es equivalente a 2,47105 hectáreas y una (1) libra es equivalente a 453,592 gramos. Las tasas de herbicidas se pueden convertir entre unidades inglesas y métricas tal como: (lb ai/ac) multiplicado por 1,12 = (kg ai/ha) y (kg ai/ha) multiplicado por 0,89 = (lb ai/ac).

Tabla 2: Herbicidas PPO ejemplares

Herbicida PPO	Familia química	Tasa 1X
acifluorfen	Difeniléteres	420 g ai/ha
fomesafen	Difeniléteres	420 g ai/ha
lactofen	Difeniléteres	7-220 g ai/ha
fluoroglicofen-etilo	Difeniléteres	15- 40 g ai/ha
oxifluorfen	Difeniléteres	0,28-2,24 kg ai/ha
flumioxazin	N-fenilftalimida	70 g ai/ha
azafenidin	Triazolinona	240 g ai/ha
carfentrazona-etilo	Triazolinona	4-36 g ai/ha
<i>sulfentrazona</i>	Triazolinona	0,1-0,42 kg ai/ha
flutiacet-metilo	Tiadiazol	3-15 g ai/ha
oxadiargilo	Oxadiazol	50-150 g ai/ha
oxadiazon	Oxadiazol	2,24-4,48 kg ai/ha
piraflofen-etilo	Fenilpirazol	6-12 g ai/ha
saflufenacil	Pirimidindiona	25-50 g/ha
S-3100	Pirimidindiona	5-80 g/ha

Las aplicaciones de herbicida pueden ser secuencialmente o se pueden mezclar en tanque con uno, dos o una combinación de varios herbicidas PPO o cualquier otro herbicida compatible. Se pueden utilizar múltiples aplicaciones de uno herbicida o de dos o más herbicidas, en combinación o solos, durante una temporada de cultivo en áreas que comprenden las plantas transgénicas de la invención para el control de un amplio espectro de malezas dicotiledóneas, malezas monocotiledóneas o ambas, por ejemplo, dos aplicaciones (por ejemplo una aplicación antes de la siembra y una aplicación después del brote, o una aplicación antes del brote y una aplicación después del brote) o tres aplicaciones (por ejemplo una aplicación antes de la siembra, una aplicación antes del brote y una aplicación después del brote, o una aplicación antes del brote y dos aplicaciones después del brote).

Tal como se utiliza en la presente, "tolerancia" o "tolerancia a herbicidas" significa la capacidad de una planta, semilla o célula de resistir los efectos tóxicos de un herbicida cuando se aplica. Los cultivos tolerantes a herbicidas pueden continuar creciendo y no se ven afectados o mínimamente afectados por la presencia del producto químico aplicado. Tal como se utiliza en la presente, un "rasgo de tolerancia a herbicidas" es un rasgo transgénico que imparte tolerancia a herbicidas mejorada a una planta en comparación con la planta

salvaje. Las plantas contempladas que se debe producir con un rasgo de tolerancia a herbicidas de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, cualquier planta, incluso plantas de cultivo tales como soja (p. ej. *Glycine max*), maíz, algodón (*Gossypium sp.*) y canola, entre otros.

Las plantas, progenie, semillas, células de plantas y partes de plantas transgénicas de la invención también pueden contener uno o más rasgos adicionales. Los rasgos adicionales pueden ser introducidos mediante el cruce de una planta que contiene un transgen que comprende las moléculas de ADN que comprende proporcionadas por la invención con otra planta que contiene uno o más rasgos adicionales. Tal como se utiliza en la presente, "cruza" significa reproducción de dos plantas individuales para producir una planta progenie. Por ende, se pueden cruzar dos plantas para producir progenie que contiene los rasgos deseables de cada progenitora. Tal como se utiliza en la presente, "progenie" significa la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora, y la progenie transgénica comprende una construcción de ADN proporcionada por la invención e heredada de al menos una planta progenitora. Los rasgos adicionales también se pueden introducir mediante la transformación conjunta de una construcción de ADN para esos rasgos transgénicos adicionales con una construcción de ADN que comprende las moléculas de ADN recombinante proporcionadas por la invención (por ejemplo, con

todas las construcciones de ADN presentes como parte del mismo vector utilizado para la transformación de plantas) o mediante la inserción de los rasgos adicionales en una planta transgénica que comprende una construcción de ADN proporcionada por la invención o viceversa (por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los métodos de transformación de plantas o edición genómica en una planta o célula de planta transgénica). Tales rasgos adicionales incluyen de modo no taxativo mayor resistencia a insectos, mayor eficacia del uso del agua, mayor rendimiento, mayor resistencia a las sequías, mayor calidad de semilla, mayor calidad nutricional, producción de semillas híbridas y tolerancia a herbicidas, donde el rasgo se mide con respecto a una planta salvaje. Los rasgos de tolerancia a herbicidas ejemplares pueden incluir tolerancia transgénica o no transgénica a uno o más herbicidas tales como inhibidores de ACCasa (por ejemplo ariloxifenoxipropionatos y ciclohexanedionas), inhibidores de ALS (por ejemplo sulfonilureas, imidazolinonas, triazoloirimidinas y triazolinonas) inhibidores de EPSPS (por ejemplo glifosato), auxinas sintéticas (por ejemplo fenoxis, ácidos benzoicos, ácidos carboxílicos, semicarbazonas), inhibidores de fotosíntesis (por ejemplo triazinas, triazinonas, nitrilos, benzotiadiazoles y ureas), inhibidores de síntesis de glutamina (por ejemplo glufosinato), inhibidores de HPPD (por ejemplo isoxazoles, pirazolonas y

tricetonas), inhibidores de PPO (por ejemplo difeniléteres, N-fenilftalimida, aril triazinonas y pirimidinedionas), e inhibidores de ácidos grasos de cadena larga (por ejemplo cloroacetamidas, oxiacetamidas y pirazoles), entre otros. Los rasgos de resistencia a insectos ejemplares pueden incluir resistencia a uno o más miembros de insectos dentro de uno o más órdenes de lepidópteros, coleópteros, hemípteros y homópteros, entre otros. Tales rasgos adicionales son conocidos por un experto en la técnica; por ejemplo, y el Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal (APHIS) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) proporciona una lista de tales rasgos transgénicos.

Se puede seleccionar una célula transformada con un polinucleótido de la presente invención, por ejemplo una construcción de expresión, para detectar la presencia del polinucleótido o su actividad enzimática codificada antes o después de la regeneración de dicha célula en una planta transgénica. Por ende, las plantas transgénicas que comprenden dicho polinucleótido, por ejemplo, se pueden seleccionar mediante la identificación de una planta transgénica que comprende el polinucleótido o la actividad enzimática codificada y/o que presenta un rasgo alterado con respecto a una planta de control de otro modo isogénica. Dicho rasgo, por ejemplo, puede ser tolerancia a un herbicida PPO.

Las plantas y progenie transgénicas que contienen un rasgo

transgénico proporcionado por la invención se pueden utilizar con cualquier método de reproducción conocido en la técnica. En las líneas de plantas que comprenden dos o más rasgos transgénicos, los rasgos transgénicos se pueden segregar o unir independientemente, o una combinación de ambos, en líneas de plantas que comprenden tres o más rasgos transgénicos. Se contemplan también el retrocruzamiento a una planta parental y el cruzamiento con una planta no transgénica, así como la propagación vegetativa. Las descripciones de los métodos de reproducción que se utilizan para diferentes rasgos y cultivos son conocidas por los expertos en la técnica. Para confirmar la presencia de los transgenes en una planta o semilla particular, se pueden realizar diversos ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de biología molecular, por ejemplo transferencia Southern y Northern, PCR y secuenciación de ADN; ensayos bioquímicos, por ejemplo detección de la presencia de un producto de proteína, por ejemplo, a través de medios inmunológicos (ELISA o transferencias western) o a través de función enzimática; ensayos de partes de plantas, por ejemplo ensayos de hojas o raíces; y además, a través del análisis del fenotipo de la planta completa.

La introgresión de un rasgo transgénico en un genotipo de planta se logra como resultado del proceso de conversión por retrocruzamiento. Un genotipo de planta en el cual se ha

realizado una introgresión de un rasgo transgénico se puede denominar línea, genotipo endogámico o híbrido convertido por retrocruzamiento. De forma similar, un genotipo de planta que carece del rasgo transgénico deseado se puede denominar línea, genotipo endogámico o híbrido no convertido.

Una vez descrita detalladamente la invención, resultará evidente que es posible realizar modificaciones, variaciones y modalidades equivalentes sin alejarse del alcance de la invención definida en las reivindicaciones adjuntas. Además, se apreciará que los ejemplos en la presente descripción se proporcionan como ejemplos no taxativos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar las modalidades de la invención. Los expertos en la técnica entenderán que las técnicas descritas en los ejemplos representan las técnicas descritas en los ejemplos siguientes representan técnicas que los inventores descubrieron que funcionan correctamente en la práctica de la descripción y, por lo tanto, puede considerarse como que constituyen modos preferidos para llevarla a la práctica. No obstante, los expertos en la técnica, en función de la presente descripción, deben observar que se pueden realizar diversos cambios en las modalidades específicas descritas y seguir obteniendo un resultado igual o similar sin alejarse del concepto, espíritu

y alcance de la invención. De forma más específica, resultará evidente que se pueden sustituir los agentes descritos en la presente con determinados agentes tanto química como fisiológicamente relacionados y obtener los mismos resultados o resultados similares. Se considera que todas dichas modificaciones y sustitutos similares evidentes para los expertos en la técnica quedan comprendidos por el espíritu, alcance y concepto de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

**Ejemplo 1: descubrimiento de protoporfirinógeno oxidasa
microbiana**

Se identificaron protoporfirinógeno oxidasas novedosas a partir de bases de datos de secuencias microbianas utilizando métodos bioinformáticos y un sistema de detección bacteriano de protoporfirinógeno oxidasas novedosas. La secuencia de HemG de *E. coli* (SEQ ID NO:4) se utilizó como una secuencia de partida para el análisis bioinformático de las bases de datos de la secuencia microbiana. El análisis bioinformático identificó treinta y tres protoporfirinógeno oxidasas putativas novedosas de la familia de PPO de HemG de diversas fuentes bacterianas. Las secuencias codificantes de estas enzimas de PPO de HemG putativas se compararon utilizando mapeo de árbol filogenético y resultaron ser relativamente diversas. Se seleccionaron diez para análisis posterior de este grupo de treinta y tres debido a su representación de

miembros agrupados únicos individuales en el árbol filogenético.

Las secuencias de codificación para las diez enzimas de PPO de HemG seleccionadas se optimizaron para la expresión de *E. coli* para eliminar cualquier codón extraño encontrado en la secuencia de ADN de tipo salvaje. Las secuencias de codificación optimizadas para *E. coli* para las diez enzimas de PPO de HemG se clonaron en vectores de expresión bacterianos. Una enzima de PPO sensible a herbicidas que se encuentra naturalmente en el cáñamo de agua (*Amaranthus tuberculatus*) se clonó en un vector de expresión bacteriano para utilizar como un control para la función de PPO y la sensibilidad a herbicidas (denominado "WH" y proporcionado como SEQ ID NO:21; NCBI N.º de acceso a GenBank ABD52326; Patzoldt, et al. "A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase" *Proceedings of the National Academy of Science EUA*. 103(33):12329-12334 (2006)). La enzima de PPO de cáñamo de agua no es un miembro de la familia de HemG. La enzima de PPO de HemG que se encuentra naturalmente en *E. coli* se clonó en un vector de expresión bacteriano para utilizar como un control para la actividad de PPO y para evaluarlo en cuanto a la sensibilidad a herbicidas (denominado H_N10 y proporcionado como SEQ ID NO:4).

Se creó un sistema de detección bacteriano de protoporfirinógeno oxidasas para evaluar las proteínas

recombinantes en cuanto a la actividad de la protoporfirinógeno oxidasa y por lo tanto confirmar que son enzimas de PPO funcionales. Este sistema de detección utilizó un ensayo de rescate funcional en una cepa de *E. coli* que contenía una inactivación génica para la enzima de PPO de *E. coli* (SEQ ID NO:4). La cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* que se utilizó mostró un crecimiento muy mínimo en el medio bacteriano libre de hemo (como medio LB), pero se recuperó el crecimiento cuando el medio bacteriano se complementó con hemo libre o cuando se expresó una protoporfirinógeno oxidasa recombinante activa en *E. coli*. Por lo tanto, la cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* se puede utilizar con la expresión de la proteína recombinante para evaluar rápida y fácilmente proteínas en cuanto a la actividad de la protoporfirinógeno oxidasa.

Se transformó la cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* con vectores de expresión bacteriana que contienen el gen codificante de las diez enzimas de PPO de HemG putativas, la enzima de PPO de HemG de *E. coli* y la enzima de PPO de cáñamo de agua. Las bacterias se estriaron en placas de medio LB, que es un medio bacteriano libre de hemo. La expresión de una enzima de PPO recombinante rescató el crecimiento de *E. coli*, lo que produjo crecimiento en las placas de LB. El crecimiento de la cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* transformada en placas de LB indicó que una secuencia de proteínas funcionaba

como una protoporfirinógeno oxidasa. Diez enzimas de PPO de HemG (SEQ ID NOs:1-10) y la enzima de PPO de cáñamo de agua (SEQ ID NO:21) pudieron recuperar el crecimiento de la cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* transformada en este ensayo, lo que confirma su actividad de PPO. Un alineamiento de las secuencias de proteína de las enzimas de PPO, con las posiciones de consenso, se proporciona como la figura 1. Utilizando este ensayo, se puede evaluar una gran cantidad de proteínas novedosas o modificadas genéticamente para confirmar y medir la actividad de la protoporfirinógeno oxidasa.

Ejemplo 2: insensibilidad del inhibidor de protoporfirinógeno oxidasa

Se identificaron protoporfirinógeno oxidasas novedosas que son tolerantes a los herbicidas de PPO utilizando un sistema de detección bacteriano herbicida. Este sistema de detección utilizó un ensayo de crecimiento de la cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* en medio líquido LB con un herbicida de PPO para identificar protoporfirinógeno oxidasas que no fueron sensibles al herbicida de PPO.

La cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* se transformó con un vector de expresión bacteriano que contenía la actividad de la protoporfirinógeno oxidasa confirmada y se cultivó en medio líquido LB. La forma cristalina purificada de uno de cinco herbicidas de PPO diferentes (acifluorfen (1 mM), flumioxazin (0,5 mM), lactofen (0,5 mM), fomesafen (1 mM) y S-3100 (100

uM), lo que representa tres subclases de químicos de PPO diferentes, se añadió al medio. Se expresaron proteínas recombinantes y se midieron los índices de crecimiento de *E. coli*. Se midieron las curvas de crecimiento (OD600) para las diferentes variantes con y sin los herbicidas de PPO en momentos seleccionados desde el momento cero hasta veinticuatro horas. El crecimiento de una cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* transformada en medio LB con un herbicida de PPO indicó que el gen utilizado para transformar el *E. coli* codificó una protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicidas (iPPO).

Se utilizaron protoporfirinógeno oxidasas novedosas con este ensayo para evaluar la insensibilidad a los herbicidas de PPO. Se descubrió que las diez protoporfirinógeno oxidasas proporcionadas como SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:10 conferían índices de crecimiento normales a la cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* en medio LB con un herbicida de PPO, lo que indica que estas proteínas son protoporfirinógeno oxidasas insensible a herbicidas (iPPO) (figura 2). La cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* que expresa PPO de cáñamo de agua (SEQ ID NO:21) fue sensible a los cinco herbicidas de PPO, lo que confirma que el ensayo pudo distinguir entre protoporfirinógeno oxidasas sensibles e insensibles para cada uno de los herbicidas. Utilizando este ensayo, se puede evaluar una gran cantidad de proteínas novedosas o modificadas

genéticamente para confirmar la actividad de la protoporfirinógeno oxidasa en presencia de herbicidas de PPO.

Ejemplo 3: ensayo de enzimas de protoporfirinógeno oxidasa (PPO)

Se caracterizaron enzimáticamente las protoporfirinógeno oxidasas para medir cada afinidad de unión del sustrato de la enzima de PPO (K_m) y sensibilidad al herbicida de PPO (IC₅₀). Se utilizaron enzimas de PPO de plantas de tipo salvaje de cáñamo de agua, soja y maíz para la comparación con las protoporfirinógeno oxidasas de HemG microbiano (proporcionadas como SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:10).

Se prepararon etioplastos y cloroplastos a partir de cotiledones etiolados (soja, *Glycine max*), hojas etioladas/coleóptilos (maíz, *Zea mays*) y hojas apicales desplegadas (cáñamo de agua, *Amaranthus tuberculata*) generalmente mediante el procedimiento descrito por Grossmann et al., ("The Herbicide Saflufenacil (Kixor™) is a New Inhibitor of Protoporphyrinogen IX Oxidase Activity" *Weed Science*, 58(1):1-9 (2010)). Se colocaron semillas de soja (A3555) y maíz (LH244) entre dos hojas de papel de germinación húmedo (Anchor Paper Company, Saint Paul, Minnesota, EUA) en un vaso de precipitados de agua en oscuridad continua durante ocho a diez días. Se cultivaron plantas de cáñamo de agua durante 30 días en el invernadero. Se recogió el tejido, se colocó entre hojas húmedas de toallas de papel hasta molerse y

obtener un polvo fino con un mortero y mano en nitrógeno líquido. Se añadió amortiguador de homogeneización (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, sucrosa 500 mM, EDTA 1 mM, cloruro de magnesio 1 mM y 2 g/litro de albúmina de suero bovino) al polvo congelado a 4:1 (ml de amortiguador de homogeneización a g de tejido de peso fresco), se mezcló vigorosamente y se filtró a través de cuatro capas de Miracloth™ prehumedecido (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania). Se centrifugó el filtrado a 9299 g durante cinco minutos. Se resuspendió el sedimento en amortiguador de homogeneización y se centrifugó a 150 g durante dos minutos. Se centrifugó la solución sobrenadante a 4000 g durante quince minutos. Se realizaron todas las etapas de centrifugado a 4 °C. El sedimento (fracción de plástido intacta) se resuspendió en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM y 20 % (v/v) de glicerina y se almacenó en alícuotas a -80 °C. La proteína total en las preparaciones de plástidos se midió mediante el método de Bradford (MM Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Analytical Biochemistry*, 72:248-254 (1976)) con albúmina de suero bovino como estándar.

Se expresaron enzimas de PPO seleccionadas en la línea celular de inactivación de *hemG* de *E. coli*. Se utilizaron células bacterianas de un cultivo durante la noche para inocular 20 ml de medio nuevo. Los cultivos se dejaron cultivar durante

aproximadamente 48 h a 20 °C hasta obtener un cultivo denso. Se recogieron células bacterianas mediante centrifugado y los sedimentos celulares se almacenaron a -80 °C hasta la realización de los ensayos enzimáticos. Se resuspendieron sedimentos bacterianos congelados en amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM y MgCl₂ 1 mM) y se sonicaron (Sonics VibraCell™, Newtown, CT EUA) durante tres ciclos de 30 segundos en un baño de hielo con un período de descanso de un minuto entre ciclos. Se centrifugaron células destruidas a 200 g durante 2 minutos a 4 °C y se utilizó la solución sobrenadante para los ensayos de enzima de PPO después de la dilución con amortiguador de extracción. Se midió la proteína total a través del método de Bradford (1976) con albúmina de suero bovino como estándar.

Se sintetizó el protoporfirinógeno IX (protógeno) mediante reducción de protoporfirina disponible en el mercado con amalgama de mercurio de sodio como lo describe JM Jacobs y NJ Jacobs ("Measurement of Protoporphyrinogen Oxidase Activity" en *Current Protocols in Toxicology* (1999) 8.5.1-8.5.13, John Wiley & Sons, Inc.). Se añadió protoporfirina (Proto) a hidróxido de potasio 0,01 N en 20 % de etanol y se agitó en la oscuridad hasta disolverse (aproximadamente 40 minutos). Se colocó un volumen de 0,8 ml en un recipiente de polipropileno de 2-ml con una tapa de rosca que contenía un anillo tórico y se le añadió aproximadamente 1 g (una punta de espátula,

aceite escurrido) de amalgama de mercurio de sodio (número de producto 451908, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, almacenado bajo aceite). Se tapó inmediatamente el tubo y se mezcló vigorosamente con un mezclador de vórtex y se ventiló aproximadamente cada 30 segundos quitándole la tapa hasta que la solución ya no tenía fluorescencia roja bajo luz UV (aproximadamente cinco minutos). Se enjuagó el recipiente de reacción con argón y se centrifugó brevemente para sedimentar la amalgama de sodio restante. Se diluyó inmediatamente la solución sobrenadante 1:1 (v/v) con una solución de DTT 0,1 M y Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5 y se enjuagó el recipiente con argón. Se dividió la solución resultante en alícuotas más pequeñas en 0,5 ml de tubos tapados con polipropileno que se enjuagaron con argón inmediatamente después de añadir la alícuota. Se cubrieron los tubos tapados con papel de aluminio y se almacenaron a -80 °C. Para el ensayo de enzimas, se descongelaron las alícuotas de protógeno, se guardaron cubiertas en hielo y se utilizaron el mismo día. La concentración del protógeno en la preparación se calculó restando la concentración de Proto, según lo medido por HPLC de fluorescencia (método descrito por Matsumoto et al, "Porphyrin Intermediate Involved in Herbicidal Action of delta-Aminolevulinic Acid on Duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.)" *Pesticide Biochem. and Phys.* 48:214-221 (1994)), en la solución de protógeno final (típicamente aproximadamente

1 % de material de partida) de la concentración de Proto en el material de partida y suponiendo la ausencia de impurezas significativas en las muestras. El protógeno preparado y almacenado en estas condiciones fue estable durante al menos seis meses.

La actividad de PPO en el extracto de plástido de planta y las preparaciones de extracto bacteriano se midió en general como se describe en Grossmann, et al. (2010). Diez microlitros de extracto de plástido (40 µg de proteína total) o extracto bacteriano (16 a 35 µg de proteína total para los diferentes extractos bacterianos) se añadieron al amortiguador de ensayo (Tris-HCl 100 mM, pH 7,4, DTT 5 mM, EDTA 1 mM y 0,085 % (v/v) de Tween 80). S-3100 (también denominado "SYN-523"; p. ej., la publicación de patente estadounidense US20100062941 A1) se añadió como un volumen de dos microlitros de una solución madre 100X preparada en acetona. Se proporcionó S-3100 de grado analítico por Sumitomo Chemical Company. Se realizaron todos los ensayos en una concentración final de 1 % (v/v) de acetona. Se incubaron los extractos (plástido o bacteriano), amortiguador y S-3100 a 30 °C (extractos de planta) o 37 °C (extractos bacterianos) durante cinco minutos antes del añadido de dos microlitros de protógeno para iniciar el ensayo. Todos los ensayos se realizaron en una placa de microtitulación de poliestireno negra de 96 pocillos (Costar® 3925, Corning, Inc., Corning, Nueva York) con un volumen final

de 200 microlitros. Después del añadido del protógeno ($3 \mu\text{M}$ para las mediciones de IC_{50} ; variable para las mediciones de K_m) a todos los pocillos, se incubó la placa a 30°C (extractos de planta) o 37°C (extractos bacterianos) antes de iniciar la recolección de datos. Se midió la fluorescencia en el tiempo a 30°C (extractos de planta) o 37°C (extractos bacterianos) con longitudes de onda de excitación y emisión de 405 nm y 630 nm, respectivamente, en un lector de microplacas SpectraMax® M5 Multi-Mode (Molecular Devices, Sunnyvale, California). Se ejecutó un blanco de ensayo mediante el añadido de extracto inactivado con calor (cinco minutos a 100°C) a la mezcla de ensayo.

Se midió la afinidad de unión del sustrato (protoporfirinógeno) de las protoporfirinógeno oxidasas como K_m . Los valores de K_m evidentes para cada PPO evaluado se calcularon utilizando ajuste de curva de hipérbola rectangular utilizando el paquete de software SoftPro® kinetics (Molecular Devices, Sunnyvale, California). La sensibilidad de la actividad enzimática al herbicida de PPO S-3100 se midió como la concentración que da el 50% de inhibición de la actividad de control (IC_{50}). Los valores de IC_{50} de S-3100 para cada PPO evaluado se determinaron gráficamente a partir de la gráfica semilogarítmica de concentración de S-3100 contra actividad de PPO.

K_m para las enzimas de PPO de tres fuentes de plantas (cáñamo

de agua, soja o maíz) y las enzimas de PPO de HemG microbianas (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:10) resultaron ser similares, en el intervalo de 0,3 uM a 2,0 uM. Las tres enzimas de PPO de planta evaluadas fueron sensibles a S-3100 con valores de IC₅₀ de 0,009, 0,004 y 0,003 uM, respectivamente. En cambio, las enzimas de PPO de una fuente bacteriana (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:10) fueron insensibles a S-3100 con valores de IC₅₀ mayores a 100 uM. Los datos se proporcionan en la tabla 3.

Tabla 3. Actividad enzimática de PPO de las enzimas purificadas a partir de fuentes de plantas o microbianas

Fuente	K _m (uM)	S-3100 IC ₅₀ (uM)
Cáñamo de agua	0,7	0,009
Soja	1,8	0,004
Maíz	2,0	0,003
H_N10 (SEQ ID NO:4)	0,7	> 100
H_N20 (SEQ ID NO:2)	0,8	> 100
H_N30 (SEQ ID NO:5)	1,0	> 100
H_N40 (SEQ ID NO:6)	1,4	> 100
H_N50 (SEQ ID NO:7)	1,0	> 100
H_N60 (SEQ ID NO:3)	1,1	> 100
H_N70 (SEQ ID NO:8)	1,4	> 100
H_N90 (SEQ ID NO:1)	1,2	> 100
H_N100 (SEQ ID NO:9)	0,6	> 100
H_N110 (SEQ ID NO:10)	0,3	> 100

Ejemplo 4: optimización enzimática de protoporfirinógeno oxidasas

La optimización de proteínas se utiliza para mejorar o alterar las propiedades enzimáticas de las protoporfirinógeno oxidasas novedosas. Se utilizan uno o más métodos de modificación genética de proteínas para optimizar las enzimas. Ejemplos no taxativos de enfoques de modificación genética de proteínas

incluyen mutaciones de escaneo de alanina; mutaciones de escaneo de homología; mutaciones de escaneo de Pro/Gly; permutas o mutaciones de regiones; y combinaciones de estas técnicas diversas (véase, M Lehmann y M Wyss, *Current Opinion in Biotechnology* 12(4):371-375 (2001); B Van den Burg y VGH Eijsink, *Current Opinion in Biotechnology* 13(4):333-337 (2002); y Weiss et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences EUA* 97(16):8950-8954 (2000)). Las secuencias de ADN codificantes de protoporfirinógeno oxidasas modificadas genéticamente se sintetizan y se clonan en un vector de expresión bacteriano. El vector se utiliza para transformar la cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* para la detección de rescate bacteriano de alto rendimiento inicial como se describe en el ejemplo 1. Las protoporfirinógeno oxidasas modificadas genéticamente que rescatan la cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* se detectan en cuanto a la sensibilidad a uno o más herbicidas de PPO utilizando el ensayo de crecimiento bacteriano que se describe en el ejemplo 2. Alternativamente, la cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* transformada se coloca en placas en medio con y sin un herbicida de PPO. Las variantes modificadas genéticamente que presentan tolerancia a herbicidas de PPO se expresan en un sistema de expresión bacteriano y se realiza una caracterización bioquímica detallada utilizando la proteína purificada con el ensayo fluorimétrico continuo descrito en el

ejemplo 3. Las variantes modificadas genéticamente que son insensibles a los herbicidas de PPO se seleccionan para clonación en vectores de transformación de plantas, transformación de plantas y pruebas *in planta*.

Ejemplo 5: expresión y evaluación de enzimas de PPO de HemG en el maíz

Se expresaron las enzimas de PPO de HemG microbianas en plantas de maíz transgénicas y se analizaron las plantas transgénicas para la tolerancia al herbicida de PPO. Se construyeron vectores de transformación de plantas que comprenden una molécula de ADN recombinante codificante de una de las enzimas de PPO de HemG microbianas proporcionadas como SEQ ID NO: 1-20. La secuencia de ADN codificante de una enzima de PPO puede incluir en el extremo 5' un codón para una metionina, denominado comúnmente codón de inicio, o este codón se puede eliminar para facilitar un enlace operativo de una secuencia de péptido de tránsito con el extremo 5' de la secuencia codificante. Ejemplos de secuencias de proteína enzimática de PPO que contienen una metionina en el extremo amino se proporcionan como SEQ ID NO:1-10. Ejemplos de secuencias de proteína enzimática de PPO sin una metionina en el extremo amino se proporcionan como SEQ ID NO:11-20. Para una transformación de planta, las secuencias de nucleótidos codificantes de las enzimas de PPO putativas se optimizaron por codones para la expresión de dicotiledóneas o

monocotiledóneas. La tabla 4 proporciona la SEQ ID NO correspondiente a la proteína y las secuencias de nucleótidos de las enzimas de PPO de HemG microbiano en los vectores de transformación.

Tabla 4. SEQ ID NO que corresponde a las variantes de PPO

PPO	Proteína	ADN bacteriano	Dicotiledónea optimizada por codones	Monocotiledónea optimizada por codones
H_N10	4, 13	25	35, 44	57
H_N20	2, 12	23	33, 43, 52	55
H_N30	5, 14	26	36, 45	58
H_N40	6, 15	27	37, 46	59
H_N50	7, 16	28	38, 47	60
H_N60	3	24	34	56
H_N70	8	29	39	61
H_N90	1, 11, 18, 19	22	32, 42, 49, 50, 51	54
H_N100	9, 17, 20	30	40, 48, 53	62
H_N110	10	31	41	63
PPO de cáñamo de agua	21	n/a	n/a	n/a

Se crearon cuatro vectores de transformación de plantas para expresar el H_N10 de PPO de HemG (SEQ ID NO:4) utilizando dos combinaciones diferentes de promotor más líder más intrón con dos secuencias de péptidos de diana diferente (TP) y dos secuencias de 3'UTR diferentes. Las construcciones de transformación de plantas se anotaron como construcciones 1, 6, 11 y 16. Para las evaluaciones *in planta* del maíz, se transformaron embriones de maíz inmaduros (LH244) utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y métodos estándar conocidos en la técnica.

Se produjeron plantas de maíz transgénicas utilizando las construcciones de transformación de planta 6 y 16 que contenían el gen codificante de H_N10 de PPO de HemG (SEQ ID NO:4). Se recogieron muestras de hojas de plantas R0 y se evaluaron por PCR para determinar la cantidad de copias del transgen insertado en el genoma de la planta. Las plantas que contenían una única copia (copia única) se autofecundaron y se cruzaron para generar la semilla R1 y F1 para futuras evaluaciones, respectivamente. Las plantas que contenían múltiples copias (multicopia) se pulverizaron del siguiente modo: (1) 5 g/ha S-3100 en aproximadamente la etapa de crecimiento V5 seguido de 10 g/ha S-3100 en aproximadamente la etapa de crecimiento V7, para una aplicación total de 15 g/ha S-3100 o (2) 10 g/ha S-3100 en aproximadamente la etapa de crecimiento V5. El porcentaje promedio de lesión, en una escala de 0-100 con cero como sin lesión y 100 como muerte de cultivo completa, se evaluó 7 días después del tratamiento final para cada lote. Se utilizó maíz LH244 no transgénico pulverizado como control y mostró un promedio del 43,3 % de lesión cuando se trató con un total de 15 g/ha S-3100 (tratamiento 1) y un promedio de lesión del 26,7 % cuando se trató con un total de 10 g/ha S-3100 (tratamiento 2). Las plantas de maíz transgénicas que expresan H_N10 de HemG (SEQ ID NO:4) superaron las plantas de control con un promedio del 28,9 % de lesión cuando se trató con un total de 15 g/ha S-

3100 (tratamiento 1) y un promedio de lesión del 24,2 % cuando se trató con un total de 10 g/ha S-3100 (tratamiento 2). Los datos se proporcionan en la tabla 5.

Tabla 5: Tolerancia al herbicida de maíz transgénico I

Tratamiento	Proteína	Construcción	Plantas evaluadas	Lesión promedio
1	n/a	no transgénico	12	43,3
1	H_N10	6	18	28,9
2	n/a	no transgénico	6	26,7
2	H_N10	16	12	24,2

Se produjeron plantas de maíz transgénico utilizando las construcciones de transformación de planta 6, 20, 21, 22 y 23 que contienen el gen codificante de las enzimas de PPO de HemG H_N90 (SEQ ID NO:1), H_N10 (SEQ ID NO:4), H_N60 (SEQ ID NO:3), H_N110 (SEQ ID NO:10) y H_N40 (SQ ID NO:6), respectivamente. Estas cinco construcciones tenían la misma combinación de promotor más líder más intrón con dos secuencias de péptidos diana diferentes (TP) y la misma secuencia de 3'UTR. Se obtuvieron muestras de hojas de las plantas R0 y se analizaron por PCR para determinar el número de copia del transgen. Se transplantaron plantas de copia única para hasta 12 eventos únicos por construcción a macetas, se autofecundaron y se cruzaron para generar la semilla R1 y F1, respectivamente, para futuras evaluaciones. Se pulverizaron plantas de varias copias y plantas de copia única adicionales con 40 gramos/ha

de S-3100 en aproximadamente la etapa de crecimiento de V5 y se tomaron calificaciones de las lesiones 7 días después del tratamiento. El porcentaje promedio (%) de lesión para todas las plantas que expresan cada enzima de PPO y la cantidad de plantas que se consideraron altamente tolerantes (menos del 10 % de lesión) se anotaron, en donde cada planta es un transformante de varias copias o de copia única exclusiva. Las plantas de maíz transgénicas que expresan H_N10 (SEQ ID NO:4) tuvieron una lesión promedio general del 39,5 % y produjeron 31 plantas altamente tolerantes de las 139 plantas evaluadas. Las plantas de maíz transgénicas que expresan H_N60 (SEQ ID NO:3) tuvieron una lesión promedio general del 55,8 % y produjeron 19 plantas altamente tolerantes de las 86 plantas evaluadas. Las plantas de maíz transgénicas que expresan H_N90 (SEQ ID NO:1) tuvieron la lesión promedio general más baja del 31,4 % y produjeron 44 plantas altamente tolerantes de las 99 plantas evaluadas. Las plantas de maíz transgénicas que expresan H_N40 (SEQ ID NO:6) tuvieron una lesión promedio general del 47,0 % y produjeron la proporción más alta de plantas altamente tolerantes con 53 plantas altamente tolerantes de las 98 plantas evaluadas. Las plantas de maíz transgénicas que expresan H_N110 (SEQ ID NO:10) tuvieron una lesión promedio del 43,0 %, pero no produjeron ninguna planta altamente tolerante. Los datos se proporcionan en la tabla 6.

Tabla 6: Tolerancia al herbicida de maíz transgénico II

Construcción	Proteína	SEQ ID NO	Plantas evaluadas	Lesión promedio	Altamente tolerante
6	H_N10	4	139	39,5%	31
20	H_N60	3	86	55,8%	19
21	H_N90	1	99	31,4%	44
22	H_N110	10	94	43,0%	0
23	H_N40	6	98	47,0%	53

Los datos del maíz transgénico R0 demostraron que las cinco enzimas de PPO de HemG microbianas H_N90 (SEQ ID NO:1), H_N10 (SEQ ID NO:4), H_N60 (SEQ ID NO:3), H_N40 (SEQ ID NO:6) y H_N110 (SEQ ID NO:10) produjeron índices de lesión reducidos cuando se expresaron en plantas transgénicas y, por lo tanto confirieron tolerancia de cultivo a un herbicida de PPO.

Las plantas F1 transgénicas producidas del cruzamiento de las plantas de R0 de copia única que expresan H_N10 (SEQ ID NO:4) en una de dos configuraciones de las construcciones se evaluaron en el invernadero en cuanto a la tolerancia al herbicida. Se trataron las plantas con 40 gramos/ha de S-3100 en la etapa de crecimiento de V3 y se tomaron calificaciones de las lesiones siete días después del tratamiento. Las plantas de maíz transgénicas que expresan H_N10 (SEQ ID NO:4) en la configuración de la construcción 6 produjeron 13 de 18 eventos que producen plantas altamente tolerantes (10 % o menos de lesión) pero la configuración de la construcción 16

no produjo ningún evento productor de plantas altamente tolerantes.

Las plantas F1 transgénicas producidas del cruzamiento de las plantas de R0 de copia única que expresan H_N10 (SEQ ID NO:4) en una de dos configuraciones de las construcciones (construcciones 6 y 16) se evaluaron en el campo en cuanto a la tolerancia al herbicida. Esta población de F1 fue segregante (50 % hemicigota y 50 % nula) y la selección para las plantas transgénicas no se realizó antes de las calificaciones de las lesiones. Se espera que las calificaciones de lesiones promedio generales para una población sean superiores a una población transgénica homogénea ya que es difícil discernir plantas no transgénicas de plantas transgénicas. Los ensayos se realizaron en dos ubicaciones con dos replicados y 3 tratamientos por construcción. Se utilizaron plantas de maíz no transgénicas como un control negativo. Los tratamientos de aplicación de herbicidas fueron los siguientes: El tratamiento 1 fue de 0,036 lb ai/acre de S-3100 aplicado a V2 seguido de (fb) V4 fb V8; el tratamiento 2: fue de 0,072 lb ai/acre de S-3100 aplicado a V2 fb V4 fb V8; el tratamiento 3: fue de 0,144 lb ai/acre de S-3100 aplicado a V2 fb V4 fb V8. Las calificaciones de lesiones de cultivo en porcentaje se evaluaron en la etapa de crecimiento V2 (CIPV2) y en la etapa de crecimiento V4 (CIPV4) de 5 a 7 días después del

tratamiento (el error V2 y el error V4 son la mitad de la diferencia menos significativa (LSD)). Las calificaciones de lesiones de cultivo se combinaron para ambas ubicaciones. Todas las plantas no transgénicas y las plantas con eventos generados utilizando la construcción 16 mostraron entre 94,6-99,5% de lesión después de la aplicación de herbicida en V2 y V4 para cada uno de los tres tratamientos. Las plantas con eventos generados utilizando la construcción 6 mostraron solamente entre 30 % y 50 % de lesión después de la aplicación de herbicida en V2 y ninguna lesión después de la aplicación de herbicida en V4. Los datos se proporcionan en la tabla 7.

Tabla 7. Ensayo de campo de eficacia de maíz F1 que contiene H_N10 (SEQ ID NO:4)

Tratamiento	Construcción	CIPV2	CIPV4	Error V2	Error V4
Trt 1	tipo salvaje	94,6	99	8,6	1,2
	6	37,5	0	8,6	1,2
	16	96,3	98,5	8,6	1,2
Trt 2	tipo salvaje	99,5	99,5	5,4	0
	6	37,5	0	5,4	0
	16	99,5	99,5	5,4	0
Trt 3	tipo salvaje	99,5	99,5	0	0
	6	50	0	0	0
	16	99,5	99,5	0	0

Los datos del campo e invernadero de maíz transgénico F1 demostraron que la enzima de PPO de HemG microbiana H_N10 (SEQ ID NO:4) producida redujo las tasas de lesión cuando se expresó en plantas transgénicas y, por ende, confirieron

tolerancia de cultivo a un herbicida PPO.

Ejemplo 6: Expresión y evaluación de enzimas de PPO de HemG en plantas de soja

Se expresaron las enzimas de PPO de HemG microbianas en plantas de soja transgénicas y se analizaron las plantas transgénicas para la tolerancia al herbicida de PPO. Se construyeron vectores de transformación de plantas que comprenden una molécula de ADN que comprende que codifica una de las enzimas de PPO de HemG microbianas proporcionadas como H_N10 (SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:13); H_N20 (SEQ ID NO:12); H_N30 (SEQ ID NO:14); H_N40 (SEQ ID NO:15); H_N50 (SEQ ID NO:16); H_N90 (SEQ ID NO:11, 18, 19); y H_N100 (SEQ ID NO:17, 20).

En soja, se transformaron embriones extirpados (A3555) con las construcciones de transformación 1 y 11 utilizando *A. tumefaciens* y métodos estándar conocidos en la técnica. Las construcciones de transformación 1 y 11 tenían la misma combinación promotor líder más intrón, la misma secuencia 3'UTR, la misma H_N10 de PPO de HemG (SEQ ID NO:4) microbiana, pero diferían en las secuencias de péptidos diana (TP). Las plántulas transgénicas R0 regeneradas se cultivaron en el invernadero. Las plantas que representaban veinte eventos de soja R0 de copia simple producidos a partir de la construcción 11 y que expresaban la enzima H_N10 de PPO microbiana (SEQ ID NO: 4) se pulverizaron con 210 g/ha de flumioxazin (Valor®,

Valent U.S.A. Corporation, Walnut Creek CA). El herbicida se pulverizó en la etapa de desarrollo V3 con tres hojas trifoliadas completamente desarrolladas y las calificaciones de lesión se evaluaron 8 días después del tratamiento. Se anotó el porcentaje de plantas que se consideraron altamente tolerantes (15 % o menos de lesión). Después de la aplicación de 210 g/ha de flumioxazin, las plantas de control de soja no transgénicas tuvieron una clasificación de lesión promedio del 30 % y ninguna planta altamente tolerante. Las plantas de soja que expresan la enzima H_N10 de PPO microbiana (SEQ ID NO:4) tuvieron una clasificación de lesión promedio del 22 %, y el 9 % de las plantas evaluadas eran altamente tolerantes al herbicida.

Las plantas que representaban diez eventos de soja R0 de copia múltiple producidos a partir de la construcción 11 y que expresaban la enzima H_N10 de PPO microbiana (SEQ ID NO: 4) se pulverizaron con 5g/ha de S-3100. El herbicida se pulverizó en la etapa de desarrollo V3 con tres hojas trifoliadas completamente desarrolladas y las calificaciones de lesión se tomaron 8 días después del tratamiento. Se anotó el porcentaje de plantas que se consideraron altamente tolerantes (25% o menos de lesión). Después de la aplicación de S-3100 (5 g/ha), las plantas de control de soja no transgénicas tuvieron una clasificación de lesión promedio del 60% y ninguna planta altamente tolerante. Las plantas de soja que expresan la

enzima H_N10 de PPO microbiana (SEQ ID NO:4) tuvieron una clasificación de lesión promedio del 47%, y el 30% de las plantas evaluadas eran altamente tolerantes al herbicida.

Las plantas de soja R1 transgénicas de copia simple en el invernadero se pulverizaron con uno de las tres tasas de aplicación de herbicida: El tratamiento 1 era de 5 gramos ai/ha de S-3100 aplicado a V4 seguido de (fb) R1; el tratamiento 2 era de 10 gramos ai/ha de S-3100 aplicado a V4 fb R1; el tratamiento 3 era de 30 gramos ai/ha de S-3100 aplicado a V4 fb R1. Las calificaciones en porcentaje de lesión de cultivo en V2 (CIPV2) se evaluaron diez días después del tratamiento. Las plantas no transgénicas tuvieron clasificación de lesión entre el 89 % y el 100 % y no estuvieron disponibles para la clasificación en la etapa de crecimiento R1. Las plantas producidas a partir de la construcción 1 y que expresaban la enzima H_N10 de PPO microbiana (SEQ ID NO: 4) tuvieron clasificaciones de lesión que oscilaban entre el 3 % y el 15,7 %. Los datos se proporcionan en la tabla 8.

Tabla 8: Tamiz de eficacia S-3100 de invernadero de soja R1

Construcción	Tratamiento	Tasa S-3100	% de lesión en etapa V4	% de lesión en etapa R1
1	1	5 g/ha	4,2	3
1	2	10 g/ha	7,8	6,5
1	3	30 g/ha	9,4	15,7
No transgénico	1	5 g/ha	89	
No transgénico	2	10 g/ha	98	
No transgénico	3	30 g/ha	100	

Se utilizó un método de transformación y selección de plantas de alto rendimiento para evaluar grandes cantidades de construcciones en las plantas transgénicas para la tolerancia a herbicidas en tejido de plántulas de transformación temprana. Esto permitió una selección más rápida y de mayor volumen de las configuraciones de la construcción y las enzimas PPO.

Los genes codificantes de las siete enzimas de PPO de HemG microbianas H_N10 (SEQ ID NO:13); H_N20 (SEQ ID NO:12); H_N30 (SEQ ID NO:14); H_N40 (SEQ ID NO:15); H_N50 (SEQ ID NO:16); H_N90 (SEQ ID NO:11, 18, 19); y H_N100 (SEQ ID NO:17, 20) estaban unidos operativamente a treinta y siete péptidos diana diferentes y se clonaron en un vector de transformación de planta base. Esto permitió la comparación lado a lado de siete enzimas de PPO de HemG diferentes con treinta y siete péptidos diana diferentes utilizando el mismo promotor y elementos 3'UTR para la expresión génica. Estas construcciones de transformación de plantas se utilizaron para transformar embriones extirpados de soja (germoplasma A3555) utilizando *A. tumefaciens* y métodos estándar conocidos en la técnica. Se inocularon cuatrocientos explantos para cada construcción, lo que produjo doce contenedores por construcción. Se utilizó una solución de herbicida de PPO estéril para las pruebas de tolerancia a herbicidas. La solución de herbicida consistió en

0,3 g de S-3100 en concentrado de aceite de cultivo (5,0 mL) y 495 mL de agua desionizada. Esto se filtró a través de una unidad de filtro de cultivo de tejido Nalgene® Rapid-Flow™ de 0,45 micrones y una unidad de filtro de membrana de acetato de celulosa sin surfactante (VWR, Radnor, PA, EUA). Se agitó la solución estéril resultante antes de la aplicación.

Cinco semanas después de la transformación, cuatro de los doce recipientes de plantas por construcción se pulverizaron con dos pasadas de solución herbicida de PPO estéril. Las plántulas tratadas se encerraron en el recipiente y recibieron al menos 15 horas de exposición a la luz después de la pulverización cada día durante cuatro días. Al final del día cuatro tras la aplicación de S-3100, se fotografiaron las plántulas tratadas y se puntuaron en una escala visual de coloración verde (la coloración verde representa tejido de plantas fotosintéticas sanas comparado con el tejido foto blanqueado) contra el daño. Los valores de puntuación fueron 0 para tolerancia baja, daño alto, coloración verde baja; 1 para algo de tolerancia, daño promedio, coloración verde moderada; y 2 para tolerancia buena, daño bajo, coloración verde alta. La puntuación para cada construcción se presenta en la tabla 9, en donde n.d. indica que el análisis no se realizó. Los resultados indican que en esta selección de alto rendimiento, una serie de construcciones proporcionaron tolerancia al herbicida de PPO.

Tabla 9. Selección de soja de alto rendimiento para tolerancia a herbicida: puntaje de coloración

Péptido diana	H_10	H_N20	H_N30	H_N40	H_N50	H_N90	H_N100
TP1	n.d.	0	2	2	1	2	2
TP2	n.d.	0	0	1	1	2	1
TP3	1	1	n.d.	1	1	2	1
TP4	n.d.	1	n.d.	2	1	1	n.d.
TP5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	1	n.d.
TP6	0	1	0	n.d.	2	2	2
TP7	n.d.	2	1	2	1	2	2
TP8	0	1	1	2	1	0	0
TP9	1	1	1	0	1	1	0
TP10	n.d.	n.d.	0	n.d.	1	2	1
TP11	n.d.	1	1	1	0	2	0
TP12	1	2	1	1	1	2	2
TP13	1	2	1	1	1	2	0
TP14	0	0	n.d.	2	1	2	1
TP15	n.d.	1	1	2	2	2	2
TP16	1	1	n.d.	n.d.	0	1	1
TP17	n.d.	2	1	1	1	2	1
TP18	1	1	0	1	1	2	1
TP19	0	1	0	1	0	1	1
TP20	0	2	n.d.	n.d.	n.d.	2	2
TP21	0	0	n.d.	2	1	1	0
TP22	1	1	n.d.	n.d.	2	2	2
TP23	1	1	n.d.	1	1	1	2
TP24	0	1	1	0	1	1	0
TP25	n.d.	1	n.d.	2	2	1	1
TP26	0	1	0	1	1	0	n.d.
TP27	1	1	0	1	1	1	1
TP28	n.d.	1	0	1	1	2	1
TP29	n.d.	1	1	1	1	1	1
TP30	n.d.	1	n.d.	1	1	1	1
TP31	1	1	n.d.	1	0	0	1
TP32	n.d.	0	n.d.	1	1	0	2
TP33	1	1	1	0	1	2	1
TP34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	2	0
TP35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1
TP36	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	2	1
TP37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.

Las plántulas en los recipientes no pulverizados que corresponden a las construcciones que tienen un puntaje de 2 se trasplantaron aproximadamente 7 semanas después de la transformación y se cultivaron como plantas R0 utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. También se cultivaron plántulas correspondientes a puntajes no tolerantes de 0 y 1 para actuar como controles negativos. Se cultivaron las plantas R0 en un invernadero en condiciones de vivero de día prolongado (18 h de luz a 80 °F, después 6 h de oscuridad a 74 °F) durante aproximadamente cuatro semanas. A las once semanas, las plantas R0 se pulverizaron con dos pasadas de la misma solución herbicida (0,3 g de S-3100) descrito arriba. Se recogieron calificaciones de lesiones de herbicidas siete días después del tratamiento.

Los resultados de la aplicación de tolerancia al herbicida en once semanas a las plantas R0 confirmó los puntajes de calificación de lesión de porcentaje bajo observados en la selección de alto rendimiento en cinco semanas. Cualquier calificación de lesión del 30 % o superior fue equivalente a las calificaciones de lesiones de soja no transgénicas. Algunas de las construcciones se destacaron como que proporcionan muy buena tolerancia a la aplicación del herbicida. Por ejemplo, TP1 con PPO H_N90 (SEQ ID NO:11) presentó solo 3 % de lesión y con PPO H_N30 (SEQ ID NO:14) o PPO H_N40 (SEQ ID NO:15) presentó solo 5 % de lesión; TP20 con

PPO H_N90 (SEQ ID NO:11) presentó solo 5 % de lesión. En cambio, TP32 con PPO H_N90 (SEQ ID NO:11) tuvo una calificación de lesión del 50 %. Los datos se presentan en la tabla 10, en donde n.d. indica que el análisis no se realizó.

Tabla 10. Tolerancia al herbicida de soja transgénica R0: puntajes de lesión porcentuales

Péptido diana	H_N20	H_N30	H_N40	H_N50	H_N90	H_N100
TP1	n.d.	5	5	n.d.	3	15
TP2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
TP3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	n.d.
TP4	n.d.	n.d.	15	n.d.	n.d.	n.d.
TP5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TP6	25	n.d.	n.d.	40	25	30
TP7	20	n.d.	40	n.d.	15	30
TP8	n.d.	n.d.	30	n.d.	40	n.d.
TP9	n.d.	35	n.d.	40	30	n.d.
TP10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	35
TP11	n.d.	35	n.d.	n.d.	30	n.d.
TP12	20	n.d.	n.d.	n.d.	30	50
TP13	20	n.d.	15	40	15	n.d.
TP14	n.d.	n.d.	35	40	25	n.d.
TP15	30	35	30	40	35	30
TP16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
TP17	25	n.d.	n.d.	40	15	n.d.
TP18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	n.d.
TP19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TP20	20	n.d.	n.d.	n.d.	5	35
TP21	n.d.	n.d.	35	n.d.	25	n.d.
TP22	n.d.	n.d.	n.d.	40	30	30
TP23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	35
TP24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TP25	n.d.	n.d.	15	35	n.d.	n.d.
TP26	n.d.	35	n.d.	n.d.	40	n.d.
TP27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
TP28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	35
TP29	30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40
TP30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TP31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TP32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	50	40
TP33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	25	n.d.
TP34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
TP35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15	35
TP36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15	n.d.
TP37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Para evaluar adicionalmente las construcciones de

transformación de plantas en la soja, se transformaron embriones extirpados (A3555) utilizando vectores de transformación de plantas con *A. tumefaciens* y los métodos estándar conocidos en la técnica. Las plántulas transgénicas R0 regeneradas se cultivaron en el invernadero y se dividieron en grupos. Los grupos se pulverizaron con uno o más herbicidas de PPO por grupo para evaluar la tolerancia al herbicida. Por ejemplo, las plantas transgénicas R0 se pulverizaron aproximadamente en la etapa de crecimiento V2-V4 con lactofeno a una velocidad de 110 g ai/ha (0,09 lb ai/acre) o 220 g ai/ha (0,19 lb ai/acre). Se evaluaron las plantas en cuanto a las lesiones uno a catorce días después del tratamiento y se registraron los puntajes de lesión. Se utilizan muestras de hojas para identificar las plantas transgénicas con una copia única del inserto de ADN transgénico y las plantas R0 que contienen solo una copia única y que pasaron las pruebas de pulverización de herbicida se autofecundaron para producir la semilla R1.

Las plantas R1 se cultivan en el invernadero y se dividen en grupos. Los grupos se pulverizaron con uno o más herbicidas de PPO por grupo para evaluar la tolerancia al herbicida. Por ejemplo, el lactofen de herbicida PPO se aplica antes del brote y/o en la etapa de crecimiento V2 a V6 a una tasa de 220 g ai/ha (0,19 lb ai/acre). Se evaluaron las plantas en cuanto a las lesiones uno a catorce días después del

tratamiento y se registraron los puntajes de lesión. Se utilizan plantas transgénicas no pulverizadas para la comparación fenotípica con plantas salvajes no pulverizadas. Se generan plantas R2 mediante la autofecundación de una planta R1 transgénica homocigota y la recolección de semillas. Las plantas R2 son evaluadas en uno o más ensayos de ubicaciones de campo o de invernadero. Se aplican tratamientos de herbicida y las macetas o plantas se califican para detectar la lesión de cultivo entre el día uno y catorce después de la aplicación de herbicida en una escala de 0-100, donde cero significa cero lesión y 100 significa muerte completa del cultivo.

Ejemplo 7: ensayo de disco de hoja

Se empleó un ensayo de disco de hoja para una evaluación rápida y con daño mínimo de la tolerancia al herbicida en plantas transgénicas que expresan una enzima de PPO recombinante. Se muestreó tejido de hoja de la hoja totalmente verde más joven de plantas de maíz y soja. Se cortaron cinco discos de hojas de 4-mm de diámetro de las muestras de hojas utilizando un punzón de biopsia desechable con un émbolo (Integra® Miltex®, Inc., York, Pennsylvania) y se colocaron los discos de hojas en un ml de solución de incubación (MES 1 mM, pH 6,5, 1 % p/v sucrosa, 1 % (v/v) de acetona) en placas de poliestireno de 24 pocillos con tapas. Para el análisis de tolerancia al herbicida, se añadió S-3100 a la solución de

incubación hasta una concentración final de 1 micromolar. Se aplicó infiltración de vacío y las placas de discos de hojas se incubaron en oscuridad continua durante un día a temperatura ambiente (23-24 °C) seguido de un (soja) o dos (maíz) días continuos de incubación con luz bajo bombillas incandescentes y fluorescentes suspendidas (520 uE) a 26-27 °C. Se puntuó la lesión del disco de hoja visualmente en una escala de 0 (lesión inferior) a 4 (mayor lesión), con los puntajes más bajos que indican mayor tolerancia al herbicida de PPO.

Los discos de hojas de las plantas de maíz transgénicas producidos utilizando la construcción 6 y que expresan la enzima de PPO H_N10 (SEQ ID NO: 4) mostraron tolerancia a herbicida significativa basándose en un puntaje de disco de hoja promedio de 0,4. Este resultado coincidió con la tolerancia al herbicida de PPO observada en plantas completas transformadas con la construcción 6 y que expresan la enzima de PPO H_N10 (SEQ ID NO: 4). Los discos de hojas de plantas de soja transgénicas producidos utilizando la construcción 1 y la construcción 11 y que expresan la enzima de PPO H_N10 (SEQ ID NO: 4) mostraron que las plantas con la construcción 1 presentaron tolerancia al herbicida significativa con una calificación de lesión de cero, mientras que las plantas con la construcción 11 presentaron una calificación de lesión de 1,6 y las plantas no transgénicas presentaron una calificación

de lesión de 2,6.

Ejemplo 8: expresión y evaluación de enzimas de PPO de HemG en el algodón

Se expresan las enzimas de PPO de HemG microbianas en plantas de algodón transgénicas y se analizan las plantas transgénicas para la tolerancia al herbicida de PPO. En algodón, se transforman embriones extirpados (Coker 130) con estos vectores utilizando *A. tumefaciens* y métodos estándar conocidos en la técnica. Las plántulas transgénicas R0 regeneradas se cultivaron en el invernadero y se dividieron en grupos. Los grupos se utilizan para pulverizar herbicidas PPO (un herbicida PPO por grupo) para evaluar la tolerancia. Por ejemplo, las plántulas transgénicas R0 se pulverizan en la etapa de crecimiento de aproximadamente 2-4 hojas verdadera con lactofen a una tasa de 110g ai/ha (0,09 lb ai/acre) o 220g ai/ha (0,19 lb ai/acre). Se evaluaron las plantas en cuanto a las lesiones uno a catorce días después del tratamiento y se registraron los puntajes de lesión. Se utilizan muestras de hojas para identificar plantas transgénicas con una copia simple del inserto transgénico. Las plantas R0 que contienen solamente una copia simple y pasan la prueba de pulverización con herbicida se autofecundan para producir semillas R1.

Las plantas R1 se cultivan en el invernadero y se dividen en grupos. Los grupos se pulverizaron con uno o más herbicidas de PPO por grupo para evaluar la tolerancia al herbicida. Por

ejemplo, el lactofen de herbicida PPO se aplica antes del brote y/o en la etapa de dos hojas verdaderas de la primera flor a una tasa de 220 g ai/ha (0,19 lb ai/acre) (1X). Se evaluaron las plantas en cuanto a las lesiones uno a catorce días después del tratamiento y se registraron los puntajes de lesión. Se utilizan plantas transgénicas no pulverizadas para la comparación fenotípica con plantas salvajes no pulverizadas.

Se generan plantas R2 mediante la autofecundación de una planta R1 transgénica homocigota y la recolección de semillas. Las plantas R2 son evaluadas en uno o más ensayos de ubicaciones de campo o de invernadero. Se aplican tratamientos de herbicida y las macetas o plantas se califican para detectar la lesión de cultivo entre el día uno y catorce después de la aplicación de herbicida en una escala de 0-100, donde cero significa cero lesión y 100 significa muerte completa del cultivo.