

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PLANTAS

REFERENCIA A SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/368,840, presentada el 29 de julio de 2016, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

Un formulario legible por computadora de un listado de secuencias se presenta con esta solicitud de manera electrónica y se incorpora en esta solicitud mediante referencia en su totalidad. Este listado de secuencias está contenido en el archivo llamado MONS397WO_ST25, que tiene 330 kilobytes de tamaño (medido en el sistema operativo MS Windows) y fue creado el 26 de julio de 2017.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere generalmente a los campos de la agricultura, biotecnología vegetal y biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a composiciones para la expresión de proteínas recombinantes en plantas transgénicas y métodos para su uso.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

La producción de cultivo agrícola suele utilizar cultivos con genomas modificados, incluidos rasgos transgénicos creados utilizando los métodos de la biología molecular. Por ejemplo, se puede introducir un gen heterólogo, también conocido como transgén, en un genoma de planta. La expresión del transgén en la planta confiere un rasgo, por ejemplo, tolerancia a herbicidas o control de insectos, en la planta. La expresión exitosa de un transgén en una planta se puede lograr utilizando elementos de expresión de genes heterólogos. Un ejemplo de esto es el uso de un péptido de tránsito unido operativamente a una proteína recombinante para lograr la localización subcelular de la proteína recombinante y, por lo tanto, una expresión o función de la proteína mejorada. Por lo tanto, existe una necesidad de péptidos de tránsito novedosos capaces de localizar de manera eficaz proteínas recombinantes dentro de las células vegetales.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una proteína con tolerancia a

herbicidas heteróloga, en donde el péptido de tránsito comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 97 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266. En una modalidad, la proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicida. En otra modalidad, la proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 97 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:100-119, SEQ ID NO:163-182 y SEQ ID NO:224-228. En otra modalidad, la secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos 97 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:54-99 y SEQ ID NO:267-297. En otra modalidad, la secuencia de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos 97 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:121-162 y SEQ ID NO:183-223, SEQ ID NO:229-235. En otra modalidad, la molécula de ADN recombinante además comprende un promotor heterólogo unido operativamente a la secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN proporcionada en la presente, por ejemplo, una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga, en donde el péptido de tránsito comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 97 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266, unida operativamente a un promotor heterólogo. En una modalidad, la proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicida. En otra modalidad, la proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:100-119, SEQ ID NO:163-182 y SEQ ID NO:224-228. En otra modalidad, la construcción de ADN está presente en el genoma de una planta, una semilla o una célula transgénica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una planta, una semilla o una célula transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante proporcionada en la presente, por ejemplo, una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito unida operativamente

a una secuencia de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga, en donde el péptido de tránsito comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 97 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266. En una modalidad, la planta, la semilla o la célula es tolerante a al menos un herbicida PPO. En otra modalidad, el herbicida PPO se selecciona del grupo que consiste en: acifluorfen, fomesafen, lactofen, fluoroglicofen-etilo, oxifluorfen, flumioxazin, azafenidin, carfentrazona-etilo, sulfentrazona, flutiacet-metilo, oxadiargilo, oxadiazon, piraflufen-etilo, saflufenacil y S-3100. En otra modalidad, la planta, la semilla o la célula transgénica es tolerante a al menos un segundo herbicida.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína recombinante que comprende lo siguiente en unión operativa: a) un péptido de tránsito que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 95 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266; y b) una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga. En una modalidad, la proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicida. En otro aspecto, la presente invención proporciona una planta, una

semilla o una célula transgénica que comprende la proteína recombinante proporcionada en la presente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una planta tolerante a herbicidas que comprende las siguientes etapas: a) transformar una célula de planta con una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga, en donde el péptido de tránsito comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 97 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266; y b) regenerar a partir de esta una planta tolerante a herbicidas que comprende la molécula de ADN. En una modalidad, la proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:100-119, SEQ ID NO:163-182 y SEQ ID NO:224-228. En otra modalidad, el método además comprende la etapa de cruzar la planta regenerada consigo misma o con una segunda planta para producir una o más plantas de progenie. En otra modalidad, el método además puede comprender la etapa de seleccionar una planta de progenie que sea tolerante a al menos un herbicida PPO. En determinadas modalidades, el herbicida PPO se selecciona del grupo que consiste en: acifluorfen, fomesafen,

lactofen, fluoroglicofen-etilo, oxifluorfen, flumioxazin, azafenidin, carfentrazona-etilo, sulfentrazona, flutiacetmetilo, oxadiargilo, oxadiazon, piraflufen-etilo, saflufenacil y S-3100.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una planta o una semilla transgénica tolerante a herbicidas que comprende cruzar una planta que comprende una molécula de ADN recombinante proporcionada en la presente consigo misma o una segunda planta para producir una planta o una semilla transgénica tolerante a herbicidas. En determinadas modalidades, la molécula de ADN recombinante comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga, en donde el péptido de tránsito comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 97 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para expresar una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga en una planta o una célula, en donde el método comprende cultivar una planta o una célula que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito unida operativamente a

una secuencia de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga, en donde el péptido de tránsito comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 97 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266, en donde el cultivo da lugar a la expresión de la proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga. En una modalidad, la proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicida.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para controlar o evitar el crecimiento de malezas en un área de crecimiento de una planta que comprende aplicar una cantidad eficaz de al menos un herbicida PPO a un área de crecimiento de una planta que comprende una planta o una semilla transgénica tal como se proporciona en la presente, por ejemplo, una planta o una semilla transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga, en donde el péptido de tránsito comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 97 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266, en donde la planta o la semilla transgénica es tolerante al

herbicida PPO. En determinadas modalidades, el herbicida PPO se selecciona del grupo que consiste en: acifluorfen, fomesafen, lactofen, fluoroglicofen-etilo, oxifluorfen, flumioxazin, azafenidin, carfentrazona-etilo, sulfentrazona, flutiacet-metilo, oxadiargilo, oxadiazon, piraflufen-etilo, saflufenacil y S-3100.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para controlar el crecimiento de malezas tolerantes a herbicidas que comprende: a) cultivar en un área de crecimiento de una planta una planta o una semilla proporcionada en la presente, por ejemplo, una planta o una semilla que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga, en donde el péptido de tránsito comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 97 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266; y b) aplicar un herbicida PPO y al menos otro herbicida al área de crecimiento de la planta, en donde la planta o la semilla es tolerante al herbicida PPO y el al menos un herbicida adicional. En determinadas modalidades, el herbicida PPO se selecciona del grupo que consiste en acifluorfen, fomesafen, lactofen, fluoroglicofen-etilo, oxifluorfen, flumioxazin,

azafenidin, carfentrazona-etilo, sulfentrazona, flutiacetmetilo, oxadiargilo, oxadiazon, piraflufen-etilo, saflufenacil y S-3100. En otra modalidad, el otro herbicida al cual la planta o la semilla es tolerante 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 glutamina sintetasa, un inhibidor de HPPD, un inhibidor de PPO y un inhibidor de ácidos grasos de cadena larga. En otras modalidades, 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 glutamina sintetasa es glufosinato; el inhibidor de HPPD es un isoxazol, una pirazolona o una tricetona; el inhibidor de PPO es un difeniléter, una N-fenilftalimida, una triazinona de arilo o una pirimidindiona; o el inhibidor de ácidos grasos de cadena muy larga es una cloroacetamida, una oxiacetamida o un pirazol.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que

codifica un péptido de tránsito unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga, en donde el péptido de tránsito comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 95 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:236-266. En una modalidad, la proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga tiene actividad de protoporfirinógeno oxidasa insensible a herbicida. En otra modalidad, la proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 95 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:100-119, SEQ ID NO:163-182 y SEQ ID NO:224-228. En otra modalidad, la secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos 95 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:267-297. En otra modalidad, la secuencia de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos 95 por ciento de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:121-162 y SEQ ID NO:183-223, SEQ ID NO:229-235. En otra modalidad, la molécula de ADN recombinante además comprende un promotor heterólogo unido operativamente a la secuencia de ADN que

codifica un péptido de tránsito.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO:1-2 y SEQ ID NO:236 son las secuencias de aminoácidos del péptido de tránsito de *Arabidopsis thaliana* albino y verde pálido (APG6).

SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos del péptido de tránsito de algodón 12G088600TP.

SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:237-266 son las secuencias de aminoácidos de péptidos de tránsito.

SEQ ID NO:50-52 y SEQ ID NO:267 son las secuencias de ácido nucleico que codifican el péptido de tránsito de APG6.

SEQ ID NO:53 es la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de tránsito de algodón 12G088600TP.

SEQ ID NO:54-99 y SEQ ID NO:268-297 son secuencias de ácido nucleico ejemplares que codifican SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:237-266, respectivamente.

SEQ ID NO:100-119 son las secuencias de aminoácidos de las protoporfirinógeno oxidasas de HemG.

SEQ ID NO:120 es la secuencia de aminoácidos de la protoporfirinógeno oxidasa de tipo salvaje de *Amaranthus tuberculatus* (cáñamo de agua) (WH).

SEQ ID NO:121-162 y SEQ ID NO:229 son secuencias de ácido nucleico ejemplares que codifican SEQ ID NO:100-119.

SEQ ID NO:163-182 y SEQ ID NO:224-228 son secuencias de aminoácidos de protoporfirinógeno oxidasas de HemY.

SEQ ID NO:183-223 y SEQ ID NO:230-235 son secuencias de ácido nucleico ejemplares que codifican SEQ ID NO:163-182 y SEQ ID NO:224-228.

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 pertinente.

La unión operativa de un péptido de tránsito con una proteína heteróloga utiliza el sistema de localización de proteína de la célula de planta transgénica para lograr la localización subcelular de la proteína heteróloga. El péptido de tránsito se retira de la proteína heteróloga en una etapa del procesamiento durante la translocación de la proteína heteróloga hacia un organelo. Las propiedades de la combinación de un péptido de tránsito específico con una proteína heteróloga específica cuando se expresa en una planta pueden ser impredecibles y sorprendentes. Por ejemplo, la eficacia de la localización subcelular y la eficacia del procesamiento (remoción del péptido de tránsito de la proteína heteróloga)

varían y se pueden ver afectadas por la secuencia de aminoácidos del péptido de tránsito, la proteína heteróloga o ambas. Estas variables afectan la función y los niveles de una proteína heteróloga y, por lo tanto, afectan el fenotipo de una célula, una planta o una semilla transgénica que comprende la proteína heteróloga. Se conocen en la técnica diversos péptidos de tránsito para utilizar en las plantas transgénicas, pero teniendo en cuenta la variabilidad de las eficacias de la localización subcelular y el procesamiento y el desarrollo continuo de nuevos rasgos transgénicos, se necesitan péptidos de tránsito novedosos.

La invención proporciona moléculas de ADN recombinante novedosas para su direccionamiento con eficacia a las proteínas heterólogas dentro de las células de plantas. El direccionamiento eficaz de una proteína heteróloga comprende la localización subcelular eficaz de la combinación del péptido de tránsito y la proteína heteróloga y el procesamiento del péptido de tránsito a partir de la proteína heteróloga. Aunque se conocen péptidos de tránsito para localizar proteínas heterólogas dentro de las células, el grado de localización y procesamiento para cualquier combinación de péptido de tránsito y proteína heteróloga varía. La localización y el procesamiento afectan el nivel de expresión y la función de una proteína heteróloga y, por lo tanto, afectan el fenotipo de la célula,

la planta o la semilla que comprende la proteína heteróloga. Por ejemplo, la localización y el procesamiento ineficaces de una combinación de un péptido de tránsito y una proteína con tolerancia a herbicidas puede dar como resultado baja tolerancia a herbicidas para una planta transgénica.

La invención supera estos obstáculos al proporcionar moléculas de ADN recombinante novedosas capaces de proporcionar direccionamiento eficaz de una proteína mediante una localización y un procesamiento mejorados. Las moléculas de ADN recombinante de la invención comprenden una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica una proteína heteróloga. En un ejemplo, las moléculas de ADN recombinante de la invención incluyen, entre otros, una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una protoporfirinógeno oxidasa tolerante a herbicidas. También se proporcionan composiciones y métodos para utilizar estas moléculas de ADN recombinante.

Moléculas recombinantes

Tal como se utiliza en la presente, el término "recombinante" se refiere a un ADN, una proteína, una célula, una semilla o un organismo no natural que es el resultado de una modificación genética y fue creado por intervención del ser humano. Una

"molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que no se produce de forma natural y que, como tal, es el resultado de la intervención humana, por ejemplo una molécula de ADN compuesta por una combinación de al menos dos secuencias de ADN heterólogas entre sí. Un ejemplo de una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN proporcionada en la presente que codifica un péptido de tránsito de la presente invención, por ejemplo, un péptido de tránsito que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266, unida operativamente a una molécula de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas de la presente invención, por ejemplo, una protoporfirinógeno oxidasa que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:100-119, 163-182 y 224-228. Una "proteína recombinante" es una proteína producida como resultado de la intervención humana que no se produce de forma natural. Un ejemplo de una proteína recombinante es una proteína proporcionada en la presente que comprende un péptido de tránsito de la presente invención, por ejemplo, un péptido de tránsito que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266, unida operativamente a una proteína heteróloga, por ejemplo, una proteína con tolerancia a herbicidas de la presente invención, por ejemplo, una protoporfirinógeno

oxidasa que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:100-119, 163-182 y 224-228. Una célula, una semilla o un organismo recombinante es una célula, una semilla o un organismo que comprende ADN o una proteína transgénica o heteróloga, por ejemplo, una célula de planta, una semilla, una planta o una parte de planta transgénica que comprende una molécula de ADN heteróloga o una proteína heteróloga de la invención.

Según se utiliza en la presente, el término "molécula de ADN aislada" significa que la molécula de ADN está presente sola o combinada con otras composiciones, pero no está dentro de su entorno natural. Una molécula de ADN de la invención es una molécula de ADN aislada siempre que la molécula de ADN no se encuentre dentro del ADN del organismo en la ubicación genómica en la cual aparece naturalmente. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína y una secuencia de ADN de péptido de tránsito heteróloga se considera aislada cuando se encuentra en un contexto que no es el genoma en el cual la secuencia de ADN que codifica una proteína y la secuencia de ADN de péptido de tránsito heteróloga se encuentran naturalmente (tal como el genoma de una planta, una semilla, una parte de planta o una célula transgénica).

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "modificación

genética" se refiere a la creación, la modificación o la producción de una molécula de ADN, una proteína, una célula o un organismo utilizando las técnicas de la biotecnología (por ejemplo, biología molecular, bioquímica de proteínas, transformación bacteriana y transformación de plantas). Por lo tanto, la modificación genética es el resultado de la intervención humana. Por ejemplo, se puede utilizar modificación genética para crear una molécula de ADN recombinante que codifica un péptido de tránsito que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49 y SEQ ID NO:236-266 unida operativamente a una molécula de ADN que codifica una proteína con tolerancia a herbicidas, tal como una protoporfirinógeno oxidasa que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:100-119, 163-182 y 224-228 utilizando una o más de las técnicas de biología molecular, tal como clonación génica, ligadura de ADN y síntesis de ADN. Dicha molécula de ADN recombinante además puede comprender, opcionalmente, un promotor heterólogo funcional en una célula de planta.

Tal como se utilizan en la presente, "tolerancia a herbicidas" o "tolerante a herbicidas" con respecto a una proteína significa la capacidad de mantener al menos parte de su actividad o función en presencia de un herbicida. Por ejemplo, una protoporfirinógeno oxidasa (PPO) es tolerante a herbicidas

si mantiene al menos parte de su actividad enzimática en presencia de uno o más herbicidas PPO. La tolerancia a herbicidas se puede medir a través de cualquier forma conocida en la técnica. Por ejemplo, la actividad enzimática de una protoporfirinógeno oxidasa se puede medir 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 tolerancia a herbicidas puede ser insensibilidad completa o parcial a un herbicida, y puede ser expresada como un porcentaje (%) de tolerancia o insensibilidad a un herbicida PPO. Tal como se utiliza en la presente, una "protoporfirinógeno oxidasa tolerante a herbicidas" presenta tolerancia a herbicidas en presencia de uno o más herbicidas PPO.

Tal como se utiliza en la presente, "tolerancia a herbicidas" o "tolerante a herbicidas" con respecto a un organismo, una planta, una semilla, un tejido, una parte o una célula significa la capacidad del organismo, la planta, la semilla, el tejido, la parte o la célula de resistir a los efectos de un herbicida cuando se aplica. Por ejemplo, una planta tolerante a herbicidas puede sobrevivir o continuar creciendo en presencia del herbicida. La tolerancia a herbicidas de una planta, una semilla, un tejido de planta, una parte de planta o una célula se puede medir comparando la planta, la semilla, el tejido de planta, la parte de planta o la célula con un control adecuado. Por ejemplo, la tolerancia a herbicidas se puede medir o evaluar aplicando un herbicida a una planta que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína capaz de conferir tolerancia a herbicidas (la planta de prueba) y una planta que no comprende la molécula de ADN recombinante que codifica la proteína capaz de conferir tolerancia a herbicidas (la planta de control) y luego comparando la lesión de planta de ambas plantas, donde la tolerancia a herbicidas de la planta de prueba se indica por una menor velocidad de lesión en comparación con la velocidad de lesión de la planta de control. Una planta, una semilla, un tejido de planta, una parte de planta o una célula tolerante a herbicidas presenta una menor respuesta a los efectos tóxicos

de un herbicida al compararla con una planta, una semilla, un tejido de planta, una parte de planta o una célula de control. 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 silvestre. Las plantas contempladas que se podrían producir con un rasgo de tolerancia a herbicidas de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, cualquier planta, incluidas plantas de cultivo tales como plantas de soja (*Glycine max*), maíz (*Zea mays*), algodón (*Gossypium sp.*), trigo (*Triticum spp.*) y *Brassica*, entre otras.

Tal como se utiliza en la presente, una "cepa de inactivación *hemG*" se refiere a un organismo o una célula de un organismo, por ejemplo, *E. coli*, que carece de actividad de HemG en la medida en que sea incapaz de crecer en medio de crecimiento libre de hemo, o de manera que su crecimiento sea alterado de forma detectable en ausencia de hemo con respecto a una cepa de otro modo isogénica que comprende una HemG funcional. Se puede preparar una cepa de inactivación *hemG*, por ejemplo, de *E. coli* teniendo presentes los conocimientos en la técnica, por ejemplo, considerando 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).

El término "transgén" se refiere a una molécula de ADN incorporada artificialmente en el genoma de un organismo debido a la intervención humana, por ejemplo, métodos de transformación de plantas. Como se usa en la presente, el término "transgénico" se refiere a que comprende un transgén, por ejemplo, una "planta transgénica" se refiere a una planta que comprende un transgén en su genoma y un "rasgo transgénico" se refiere a una característica o fenotipo portado u obtenido por la presencia de un transgén incorporado en el genoma de la planta. Debido a dicha alteración genómica, la planta transgénica es algo claramente diferente de la planta silvestre relacionada y el rasgo transgénico es un rasgo que no se encuentra naturalmente en la planta silvestre. Las plantas transgénicas de la invención comprenden las moléculas de ADN recombinante proporcionadas por la invención.

Tal como se utiliza en la presente, el término "heterólogo" se refiere a la relación entre dos o más cosas que normalmente no se encuentran asociadas en la naturaleza, por ejemplo, que se derivan de diferentes fuentes o que normalmente no se encuentran juntas en la naturaleza de ninguna otra manera. Por ejemplo, una molécula de ADN o una proteína pueden ser heterólogas con respecto a otra molécula de ADN, proteína, célula, planta, semilla u organismo si normalmente no se

encuentran juntas en la naturaleza o en el mismo contexto. En determinadas modalidades, una primera molécula de ADN es heteróloga con respecto a una segunda molécula de ADN si las dos moléculas de ADN no se encuentran normalmente juntas en la naturaleza en el mismo contexto, y una proteína es heteróloga con respecto a una segunda proteína unida operativamente, tal como un péptido de tránsito, si dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. En otra modalidad, una molécula de ADN recombinante que codifica un péptido de tránsito unido operativamente a una protoporfirinógeno oxidasa es heteróloga con respecto a un promotor unido operativamente que es funcional en una célula de planta si dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Una molécula de ADN recombinante también puede ser heteróloga con respecto a una célula, una semilla o un organismo en el cual se inserta cuando no se encuentra de forma natural en esa célula, semilla u organismo. Una "proteína heteróloga" es una proteína que está presente en una planta, una semilla, una célula, un tejido o un organismo en el cual no está presente de forma natural o que está unida operativamente a una proteína con la cual no está unida de forma natural. Un ejemplo de una proteína heteróloga es una proteína que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49, 236-266, 100-119, 163-182 y 224-228 que se expresa en una planta,

una semilla, una célula, un tejido o un organismo en el cual no se encuentra de forma natural, o que está unida operativamente a una segunda proteína, tal como un péptido de tránsito o una proteína tolerante a herbicidas, con la cual no está unida de forma natural. En otro ejemplo, una proteína heteróloga, tal como una proteína con tolerancia a herbicidas heteróloga, por ejemplo, una protoporfirinógeno oxidasa, se puede introducir en una célula de planta en la cual no está presente de forma natural utilizando las técnicas de biología molecular y transformación de plantas.

Tal como se utiliza en la presente, el término "molécula de ADN que codifica proteínas" se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína. Tal como se utiliza en la presente, una "secuencia de ADN que codifica proteínas" significa una secuencia de ADN que codifica una proteína. Una secuencia de ADN que codifica proteínas puede ser cualquier secuencia de ADN que codifica una proteína, por ejemplo, una proteína que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-49, 236-266, 100-119, 163-182 y 224-228. Tal como se utiliza en la presente, el término "proteína" se refiere a una cadena de aminoácidos unida por enlaces peptídicos (amida) e incluye cadenas de polipéptidos que están plegadas o dispuestas de una forma biológicamente funcional y cadenas de polipéptidos que no lo

están. Una "secuencia" significa una disposición secuencial de nucleótidos o aminoácidos. Los límites de una secuencia que codifica proteínas suelen estar determinados por un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de detención de traducción en el extremo 3'.

Tal como se utiliza en la presente, el término "proteína con tolerancia a herbicidas" significa una proteína capaz de conferir tolerancia a herbicidas a una célula, un tejido, una parte de planta, una semilla o un organismo. Algunos ejemplos de proteínas con tolerancia a herbicidas son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasas tolerantes al glifosato (p. ej., CP4-EPSPS, 2mEPSPS), glifosato oxidorreductasas (GOX), glifosato N-acetiltransferasas (GAT), acetolactato sintasas (ALS)/acetohidroxiácido sintasas (AHAS) tolerantes a herbicidas, 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasas (HPPD) tolerantes a herbicidas, dicamba monooxigenasas (DMO), fosfinotricina acetil transferasas (PAT), glutamina sintetetasas tolerantes a herbicidas (GS), 2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasas (TfdA), R-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasas (RdpA), S-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasas (SdpA), protoporfirinógeno oxidasas (PPO) tolerantes herbicidas y citocromo P450 monooxigenasas. Por ejemplo, una protoporfirinógeno oxidasa que comprende una

secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:100-119, SEQ ID NO:163-182 y SEQ ID NO:224-228 es una proteína tolerante a herbicidas.

Tal como se utilizan en la presente, "expresión transgénica", "expresar un transgén", "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 pueden plegar o no en proteínas. Una molécula de ADN que codifica 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, y que por lo tanto comprende, la molécula de ADN recombinante o una parte de esta. Tal como se utiliza en la presente, "unidas operativamente" se refiere a dos moléculas de ADN o proteína 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 que codifica 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 transgén. En otra modalidad, dos o más moléculas de proteína pueden estar unidas operativamente.

Por ejemplo, un péptido de tránsito puede estar unido operativamente a una proteína heteróloga, tal como una proteína tolerante a herbicidas.

En una modalidad, las moléculas de ADN recombinante de la invención incluyen una secuencia de ADN que codifica una protoporfirinógeno oxidasa (PPO) unida operativamente a una secuencia de péptido de tránsito. Tal como se utiliza en la presente, "protoporfirinógeno oxidasa" o "PPO" se refiere a una oxidasa capaz de convertir protoporfirinógeno IX en protoporfirina IX. Dicha protoporfirinógeno oxidasa se conoce en la técnica e incluye, por ejemplo, las secuencias de proteína proporcionadas como SEQ ID NO:100-119, SEQ ID NO:163-182 y SEQ ID NO:224-228.

En otra modalidad, las moléculas de ADN recombinante de la invención incluyen una secuencia de ADN que codifica una secuencia de péptido de tránsito unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica una proteína que presenta actividad de protoporfirinógeno oxidasa tolerante a herbicidas, mediante lo cual la secuencia del péptido de tránsito facilita la localización de la molécula de proteína dentro de la célula. Los péptidos de tránsito también se conocen en la técnica como secuencias de señal, secuencias de direccionamiento, péptidos de direccionamiento y secuencias de localización. Un ejemplo de un péptido de tránsito es un

péptido de tránsito de cloroplastos (CTP), una secuencia de direccionamiento mitocondrial (MTS) o un péptido de direccionamiento mitocondrial y de cloroplasto doble. Al facilitar la localización de la proteína dentro de la célula, tal como en las mitocondrias o el cloroplasto, el péptido de tránsito asegura la localización de una proteína en un organelo para una actividad enzimática óptima y puede aumentar la acumulación de la proteína y proteger a la proteína de la degradación proteolítica y/o aumentar el nivel de tolerancia a herbicidas, y así reducir los niveles de lesión en la célula, la semilla o el organismo transgénico luego de la aplicación de herbicidas. Luego de la translocación en el organelo, el péptido de tránsito se escinde típicamente de la proteína, también denominado procesamiento. El procesamiento del péptido de tránsito puede ser completo (es decir, el péptido de tránsito completo se escinde del extremo amino terminal de la proteína), incompleto (es decir, uno o más aminoácidos del péptido de tránsito permanecen en el extremo amino terminal de la proteína) o resultar en la remoción de uno o más aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína. El procesamiento completo del péptido de tránsito de una protoporfirinógeno oxidasa aumenta el nivel de acumulación de proteína, aumentando así la tolerancia a herbicidas PPO y reduciendo los niveles de lesión en la célula, la semilla o el organismo transgénico

luego de la aplicación de herbicida. Por ejemplo, los péptidos de tránsito pueden comprender una secuencia de aminoácidos de la presente invención, tal como las proporcionadas por SEQ ID NO:1-49 y SEQ ID NO:236-266. Dicho péptido de tránsito puede ser codificado por una secuencia de ácido nucleico de la invención, por ejemplo, las proporcionadas por SEQ ID NO:50-99 y SEQ ID NO:267-297.

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, especialmente cuando 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 y proteínas que tienen al menos 90 % de identidad de secuencia, al menos 91 % de identidad de secuencia, al menos 92 % de identidad de secuencia, al menos 93 % de identidad de secuencia, al menos 94 % de identidad de secuencia, al menos 95 % de identidad de secuencia, al menos 96 % de identidad de secuencia, al menos 97 % de identidad de secuencia, al menos 98 % de identidad de secuencia y al menos

99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de proteína o molécula de ADN proporcionadas en la presente como SEQ ID NO:1-297. 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 proteínas 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, el 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,

Nucleic Acids Research 32(5):1792-7 (2004) 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 dividida por la cantidad total de componentes del segmento de secuencia de referencia, 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.

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 de plantas. Las moléculas de ADN 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 unida operativamente a un elemento de expresión génica que funciona en una planta para afectar la expresión de la proteína codificada por la molécula de ADN. Los métodos para construir vectores y construcciones de ADN se conocen en la técnica. Los componentes de una construcción de ADN, o un vector que comprende una construcción de ADN, generalmente 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 3'. 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, región no traducida 5', potenciador, líder, elemento que actúa en cis, intrón, región no traducida 3' y uno o más trangenos 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

heteróloga. 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 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 de ADN que codifica un péptido de tránsito que está unido operativamente a una secuencia de ADN heteróloga que codifica una proteína que presenta actividad de protoporfirinógeno oxidasa tolerante a herbicidas, por lo que la secuencia de péptido de tránsito facilita la localización de la proteína dentro de la célula.

Tal como se utiliza en la presente, "control" se refiere a un control experimental diseñado con fines de comparación. Por ejemplo, una planta de control en un análisis de una planta transgénica es una planta del mismo tipo que la planta experimental (es decir, la planta a evaluarse) pero no contiene el inserto transgénico, la molécula de ADN recombinante o construcción de ADN de la planta experimental. Algunos ejemplos de plantas de control útiles para la comparación con las plantas transgénicas incluyen: para las plantas de maíz, maíz

LH244 no transgénico (número de depósito ATCC PTA-1173); para la comparación con plantas de soja transgénicas: soja A3555 no transgénica (número de depósito ATCC PTA-10207); para la comparación con plantas de algodón transgénicas: Coker 130 no transgénico (número de protección de variedad de plantas (PVP) 8900252); para la comparación con plantas de canola o *Brassica napus* transgénicas: la línea 65037 Restorer de la variedad de *Brassica napus* no transgénica (Solicitud de derechos de los fitomejoradores de Canadá 06-5517); para la comparación con plantas de trigo transgénicas: la variedad de trigo no transgénica germoplasma Samson (PVP 1994).

Tal como se utiliza en la presente, "silvestre" significa una versión de origen natural similar pero no idéntica. Una "molécula de ADN silvestre" o "proteína silvestre" es una versión de origen natural de la proteína o molécula de ADN, es decir, una versión de la proteína o molécula de ADN preexistente en la naturaleza. Un ejemplo de una proteína de tipo silvestre útil para la comparación con las proteínas modificadas genéticamente proporcionadas por la invención es la protoporfirinógeno oxidasa de *Arabidopsis thaliana*. Una "planta silvestre" 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. Algunos ejemplos de plantas silvestres

útiles para la comparación incluyen: para las plantas de maíz transgénico, maíz LH244 no transgénico (número de depósito ATCC PTA-1173), para la comparación con plantas de soja transgénicas: soja A3555 no transgénica (número de depósito ATCC PTA-10207); para la comparación con plantas de algodón transgénicas, Coker 130 no transgénico (número de protección de variedad de plantas 8900252); para la comparación con plantas de canola o Brassica napus transgénicas, la línea 65037 Restorer de la variedad de Brassica napus no transgénica (Solicitud de derechos de los fitomejoradores de Canadá 06-5517); para la comparación con plantas de trigo transgénicas, la variedad de trigo no transgénica germoplasma Samson (PVP 1994).

Plantas transgénicas y herbicidas

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

Los métodos adecuados para la transformación de células vegetales 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. Métodos ejemplares para introducir una construcción de ADN recombinante en plantas incluyen el sistema de transformación de *Agrobacterium* y el bombardeo de partículas de ADN, ambos de los cuales se conocen por los expertos en la técnica. Otro ejemplo de método 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 mediante 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). Las plantas transgénicas se pueden regenerar a partir de una célula de planta transformada mediante los métodos de cultivo de células de plantas o tomando un corte de una planta transgénica y enraizando el corte para establecer un clon vegetal de la planta transgénica. Una planta transgénica homocigota con respecto a un transgén (es decir, dos copias alélicas del transgén) se puede obtener mediante

autopolinización (autofecundación) de una planta transgénica que contiene un único alelo de transgén consigo misma, por ejemplo, una planta R0, para producir semillas R1. Un cuarto de la semilla R1 producida es homocigota con respecto al transgén. Las plantas cultivadas a partir de la germinación de semilla R1 se pueden evaluar para detectar la cigosidad, típicamente 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, "herbicida" es cualquier molécula que se utiliza para controlar, prevenir o interferir con el crecimiento de una o más plantas. Algunos ejemplos de herbicidas incluyen inhibidores de acetil-CoA carboxilasa (ACCase) (por ejemplo ariloxifenoxipropionatos y ciclohexanodionas); inhibidores de acetolactato sintasa (ALS) (por ejemplo, sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas y triazolinonas); inhibidores de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) (por ejemplo, glifosato), auxinas sintéticas (por ejemplo, fenoxis, ácidos benzoicos, ácidos carboxílicos, semicarbazonas), inhibidores de fotosíntesis (fotosistema II) (por ejemplo, triazinas, triazinonas, nitrilos, benzotiadiazolas y ureas), inhibidores de glutamina sintetasa (GS) (por ejemplo, glufosinato y

bialafos), inhibidores de 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) (por ejemplo, isoxazoles, pirazolonas y tricetonas), inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa (PPO) (por ejemplo, difeniléteres, N-fenilftalimida, aril triazinonas y pirimidinadionas), inhibidores de ácidos grasos de cadena muy larga (por ejemplo cloroacetamidas, oxiacetamidas y pirazoles), inhibidores de biosíntesis de celulosa (por ejemplo indaziflam), inhibidores de fotosistema I (por ejemplo paraquat), inhibidores de ensamblaje de microtubulos (por ejemplo, pendimetalina) e inhibidores de fitoeno desaturasa (PDS) (por ejemplo, norflurazona), entre otros.

Tal como se utiliza en la presente, un "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 de PPO son conocidos en la técnica y se encuentran disponibles a nivel comercial. Los ejemplos de herbicidas PPO incluyen, de modo no taxativo, difeniléteres (como acifluorfen, sus sales y ésteres, aclonifen, bifenox, sus sales y ésteres, etoxifen, sus 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, benzfendizona, 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); oxazolidindionas (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-2*H*-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.

Las plantas, las semillas, las partes de plantas, los tejidos

de plantas y las células proporcionados por la invención presentan tolerancia a herbicidas a uno o más herbicidas PPO. Los herbicidas PPO 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 tolerantes a la aplicación de uno o más herbicidas PPO. La aplicación de herbicida puede ser la tasa comercial recomendada (1X) o cualquier fracción o múltiplo de la misma, por ejemplo, dos veces la tasa comercial recomendada (2X). Las tasas de herbicidas se pueden expresar como gramos por hectárea (g/h) o libras por acre (lb/acre), equivalente ácido por libra por acre (lb ae/acre), equivalente ácido por gramo por hectárea (g ae/ha), 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 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 ejemplos de

herbicidas PPO se proporciona en la tabla 1. 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 de la siguiente manera: (lb ai/ac) multiplicado por 1,12 = (kg ai/ha) y (kg ai/ha) multiplicado por 0,89 = (lb ai/ac).

Tabla 1: Ejemplos de herbicidas PPO

Herbicida de PPO	Familia química	Tasa 1X
acifluorfen	Difeniléteres	420 g ai/ha
fomesafen	Difeniléteres	420 g ai/ha
lactofen	Difeniléteres	70-220 g ai/ha
fluoroglicofen-etilo	Difeniléteres	15- 40 g ai/ha
oxifluorfen	Difeniléteres	0,28-2,24 kg ai/ha
flumioxazin	N-fenilftalimida	70-105 g ai/ha
azafenidin	Triazolinona	240 g ai/ha
carfentrazona-etilo	Triazolinona	4-36 g ai/ha
sulfentrazona	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
piraflufen-etilo	Fenilpirazol	6-12 g ai/ha
saflufenacil	Pirimidindiona	25-100 g/ha
S-3100	Pirimidindiona	5-80 g/ha

Las aplicaciones de herbicida se pueden mezclar secuencialmente o en tanques con uno, dos o una combinación de varios herbicidas o cualquier otro herbicida compatible. Se pueden utilizar múltiples aplicaciones de un 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, una "maleza" es cualquier planta no deseada. Una planta se puede considerar en general no deseable para fines agrícolas u hortícolas (por ejemplo, la especie *Amaranthus*) o se puede considerar no deseable en una situación particular (por ejemplo, una planta de cultivo de una especie en un campo de una especie diferente, también se denomina una planta voluntaria).

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 transgén 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 la 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 y 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 ejemplos de rasgos de tolerancia a herbicidas pueden incluir tolerancia transgénica o no transgénica a uno o más herbicidas tales como inhibidores de ACCasa (por ejemplo, ariloxifenoxipropionatos y ciclohexandionas), 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 pirimidindionas) e inhibidores de ácidos grasos de cadena larga (por ejemplo, cloroacetamidas, oxiacetamidas y pirazoles), entre otros. Los ejemplos de rasgos de resistencia a insectos pueden incluir resistencia a uno o más miembros de insectos

dentro de uno o más órdenes de lepidópteros, coleópteros, hemípteros, tisanópteros, dípteros, himenópteros y ortópteros, 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 comúnmente 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 progenitora y el cruzamiento con una planta no transgénica, como en el caso de la propagación vegetativa. Las descripciones de los métodos de reproducción que se utilizan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos son conocidas por los expertos en la técnica. Para confirmar la presencia de uno o más transgenes en una planta o semilla, 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 a través del análisis del fenotipo de la planta completa. Para analizar el procesamiento del péptido de tránsito en una planta o semilla transgénica, los ensayos como secuenciamiento de degradación Edman o análisis de espectrometría de masas se pueden llevar a cabo en una proteína de protoporfirinógeno oxidasa heteróloga obtenida de la célula, planta o semilla transgénica y los datos de secuencia resultantes compararse con los de la proteína de

protoporfirinógeno oxidasa.

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

Tal como se usa en la presente, el término "que comprende" significa "incluye de modo no taxativo".

Habiendo descrito de manera detallada 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 reconocerá que los ejemplos en la presente descripción se proporcionan como ejemplos no taxativos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las modalidades preferidas de la invención. Los expertos en la técnica entenderán que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan las técnicas que los inventores descubrieron que funcionan correctamente en la práctica de la

invención y, por lo tanto, puede considerarse 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, el espíritu y el 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 dichas modificaciones y sustitutos similares evidentes para los expertos en la técnica quedan comprendidos por el espíritu, el alcance y el concepto de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: descubrimiento de péptido de tránsito

Se extrajeron péptidos de tránsito novedosos de una colección de bases de datos de secuencias de plantas. Se utilizaron métodos y herramientas bioinformáticos, tales como modelos Markov escondidos (HMM), la base de datos Pfam y la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST), para identificar miles de EST y secuencias genómicas que se predice que codifican proteínas que se sabe que se localizan en el cloroplasto y las mitocondrias en las células de plantas, tal

como la protoporfirinógeno oxidasa y las proteínas de choque de calor. Luego se analizaron estas secuencias y se identificó la secuencia que codifica el péptido de tránsito. Se identificaron miles de secuencias de péptidos de tránsito putativas y se evaluaron en cuanto a la eficacia prevista y la diversidad de secuencia comparativa. De estos, se seleccionaron 60 péptidos de tránsito exclusivos para su clonación y evaluación en células de plantas, con variantes producidas para algunos de estos (se indican como "_var" en la presente). La tabla 2 proporciona la SEQ ID NO correspondiente a la proteína y las secuencias de nucleótidos de cada péptido de tránsito y las variantes de estos.

Se sintetizaron moléculas de ADN recombinante que codifican los péptidos de tránsito utilizando la secuencia para cada péptido de tránsito previsto. Se produjeron las construcciones de ADN mediante la unión operativa de cada péptido de tránsito a un promotor y una secuencia que codifica proteínas. Luego se utilizaron estas construcciones de ADN para transformar los protoplastos de las plantas. Se utilizó un ensayo de protoplastos con protoplastos de plantas transformados para evaluar los péptidos de tránsito en cuanto a la actividad funcional de una proteína con tolerancia a herbicidas unida operativamente en presencia del herbicida. Los candidatos exitosos avanzaron a la transformación de las plantas para

permitir la evaluación de las plantas transgénicas.

Tabla 2. Péptidos de tránsito

Péptido de tránsito	PRT SEQ ID NO	ADN SEQ ID NO
ADADI_1600	8	58
ALLCE_3035	16, 37, 46, 47, 237	66, 87, 96, 97, 268
AMACR_2643	33	83
AMAGR_5230	29	79
AMAPA_1826	12	62
AMAPA_4787	18	68
AMBTR_1537	30	80
ANDGE_6461	26	76
BRANA_6036	31	81
BRANA_9788	7	57
CAMSA_6215	21, 41	71, 91
CANRO_3271	24	74
CANRO_3976	4, 35	54, 85
CONCA_4103	11	61
CUCME_4756	22, 39, 48	72, 89, 98
DIGSA_5107	17	67
DIGSA_5109	27	77
ERATE_2090	25	75
ERATE_4149	23, 36, 45	73, 86, 95
ERATE_4824	28	78
KOCSC_1672	14	64
NICBE_5162	6	56
ROSHY_6783	32	82
ROSHY_8873	9	59
SEDAL_8241	20	70
SENOB_8832	5, 44	55, 94
SETIT_2080	15	65
SPIOL_0401	19	69

SPIOL_0410	13	63
TAROF_2111	34, 42, 38, 43	84, 92, 88, 93
XANST_27	10, 40, 49	60, 90, 99
ERATE_3481	238	269
SETIT_9796	239	270
ACAOS_3432	240	271
ADADI_0544	241	272
TAROF_9570	242	273
AMACR_2380	243	274
AMACR_2381	244	275
AMAHY_5254	245	276
AMAPA_22810	246	277
AMAPA_2811	247	278
AMAPA_6265_1	248	279
AMAPA_6265_2	249	280
AMAPA_2906	250	281
AMARU_1762	251	282
AMARU_1763	252	283
AMARU_1764	253	284
AMAVI_1826	254	285
AMAVI_1827	255	286
AMBTR_6334	256	287
CONCA_3910	257	288
CUCME_3420	258	289
KOCSC_5431	259	290
KOCSC_9516	260	291
KOCSC_0438	261	292
ROSHY_3269	262	293
SEDAL_6599	263	294
SEDAL_6601	264	295
SPIOL_1551	265	296
ALLCE_6618	266	297

Ejemplo 2: descubrimiento de enzima de PPO

Se identificaron protoporfirinógeno oxidasas HemG y HemY microbianas novedosas que son tolerantes a herbicidas PPO a partir de bases de datos de secuencias microbianas utilizando métodos bioinformáticos y un sistema de detección bacteriano de herbicidas novedoso. 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 PPO para confirmar la actividad de protoporfirinógeno oxidasa para una enzima y para identificar protoporfirinógeno oxidasas que no fueron sensibles al herbicida PPO. En resumen, la cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* se transformó con un vector de expresión bacteriano que contenía una protoporfirinógeno oxidasa putativa y se cultivó en medio líquido LB. La forma cristalina purificada de uno de cinco herbicidas PPO diferentes acifluorfen (1 mM), flumioxazin (0,5 mM), lactofen (0,5 mM), fomesafen (1 mM) y S-3100 (100 microM), que representa tres subclases de químicos de PPO diferentes, se añadió al medio. Se expresaron proteínas recombinantes y se midieron las tasas 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 PPO indicó que el gen utilizado para transformar el *E. coli* codificó una protoporfirinógeno oxidasa tolerante a herbicidas. La cepa de *E. coli* de inactivación de *hemG* que expresa la protoporfirinógeno oxidasa de cáñamo de agua (WH) (SEQ ID NO:120), que es sensible a los cinco herbicidas PPO, se utilizó como control para confirmar que el ensayo podía distinguir entre protoporfirinógeno oxidasas sensibles y tolerantes para cada uno de los herbicidas.

Las protoporfirinógeno oxidasas que son proteínas tolerantes a herbicidas se proporcionan como SEQ ID NO:100-119, SEQ ID NO:163-182 y SEQ ID NO:224-228 y se muestran en la tabla 3. La secuencia de ADN que codifica una protoporfirinógeno oxidasa puede incluir en el extremo 5' un codón para una metionina, denominado comúnmente codón de inicio, o este codón (y opcionalmente algunos aminoácidos de extremo amino, por ejemplo, 2 a 7) se puede eliminar para facilitar un enlace operativo de una secuencia de péptido de tránsito con el extremo 5' de la secuencia codificante. Se pueden sintetizar opcionalmente secuencias de ADN que codifican una protoporfirinógeno oxidasa que estén optimizadas para la expresión en una monocotiledónea o una dicotiledónea. La tabla 3 proporciona cada secuencia de ADN de protoporfirinógeno oxidasa que está optimizada para la expresión en monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Tabla 3. Protoporfirinógeno oxidasas

Nombre	Proteína SEQ ID NO	ADN bacteriano SEQ ID NO	ADN optimizado para dicotiledóneas SEQ ID NO	ADN optimizado para monocotiledóneas SEQ ID NO
H_N10	103, 112	124	134, 143	156
H_N20	101, 111	122	132, 142, 151	154
H_N30	104, 113	125	135, 144	157
H_N40	105, 114	126	136, 145	158
H_N50	106, 115	127	137, 146	159
H_N60	102	123	133	155
H_N70	107	128	138	160
H_N90	100, 110, 117, 118	121	131, 141, 148, 149, 150, 229	153
H_N100	108, 116, 119	129	139, 147, 152	161
H_N110	109	130	140	162
WH PPO	120	n/a	n/a	n/a
R2N30	163, 164	183	189, 190	195
R2N40	165, 224	184	191, 230	196
R2N40opt	166, 225	185	231, 232	n/a
R2N70	167, 226	186	192, 233	197
R2N90	168, 227	187	193, 234	198
R2N100	169, 228	188	194, 235	199
R1N473	170, 175, 179	200	205, 216, 220	211
R1N533	171, 176, 180	201	206, 217, 221	212
R1N171	172, 177, 181	202	207, 218, 222	213
R1N311	173	203	208	214
R1N333	174, 178, 182	204	209, 210, 219, 223	215

Ejemplo 3: evaluación de péptidos de tránsito y protoporfirinógeno oxidasa en protoplastos

Se evaluaron péptidos de tránsito unidos operativamente a una protoporfirinógeno oxidasa en protoplastos de plantas en cuanto a la tolerancia a herbicidas PPO. Se construyeron vectores de

transformación de plantas que comprendían una molécula de ADN recombinante que codificaba la protoporfirinógeno oxidasa H_N90 unida operativamente a un péptido de tránsito. Los vectores luego se utilizaron para transformar los protoplastos de plantas, que se evaluaron en cuanto a la sensibilidad a los herbicidas PPO.

Se produjeron vectores de transformación de plantas que comprendían (i) elementos de expresión fijos (un promotor y 3'UTR) unidos operativamente a un péptido de tránsito unido operativamente a la protoporfirinógeno oxidasa H_N90. Utilizando esto, se evaluaron 68 péptidos de tránsito y se realizaron comparaciones directas mediante el uso de la misma protoporfirinógeno oxidasa y otros elementos de expresión en cada vector. Se produjeron vectores de control con los mismos elementos de expresión fijos que comprendían (i) protoporfirinógeno oxidasa H_N90 sin péptido de tránsito (control H_N90) o (ii) proteína fluorescente verde (GFP) sin péptido de tránsito (control GFP).

Se transformaron protoplastos de soja utilizando métodos estándar y se cultivaron en presencia del herbicida PPO S-3100 a una concentración de 1,0 microM. Luego se evaluaron los protoplastos en cuanto a la tolerancia al herbicida PPO, se expresaron de forma relativa al control GFP (permitiendo la derivación de un puntaje de tolerancia relativa para permitir

comparaciones entre los experimentos). Los ensayos se realizaron en dos lotes, que se indicaron como experimento n.º 1 o experimento n.º 2. Los ensayos se realizaron en cuatro repeticiones, se promediaron los puntajes de tolerancia relativa para cada péptido de tránsito y se calculó el error estándar (SE). Todo péptido de direccionamiento que haya presentado un puntaje de tolerancia relativa de 50 o mayor se consideró altamente eficaz para proporcionar localización subcelular y procesamiento eficaces cuando se encuentra unido operativamente a una proteína con tolerancia a herbicidas y un puntaje de 40-50 indicó muy bueno para proporcionar localización subcelular y procesamiento eficaces cuando se encuentra unido operativamente a una proteína con tolerancia a herbicidas. Los ensayos de control de GFP presentaron un puntaje de tolerancia de 0, lo que confirma que los protoplastos de soja no eran tolerantes al herbicida PPO sin una proteína con tolerancia a herbicidas. Los ensayos de control de H_N90 presentaron un puntaje de tolerancia de 24 (experimento 1, SE 4) y 11 (experimento 2, SE 4), mientras que varios de los péptidos de tránsito proporcionan mayores puntajes de tolerancia, lo que indica que un péptido de tránsito eficaz puede aumentar la tolerancia a herbicidas de los protoplastos de plantas. Por ejemplo, ADADI_0544 y KOCSC_9516 presentaron puntajes de péptidos de

direccionamiento altamente eficaces y AMAPA_62652 presentó un puntaje de péptido de direccionamiento muy bueno. Los datos se proporcionan en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de ensayos de protoplastos

Péptido de tránsito	Puntaje de tolerancia	SE	Experimento
ADADI_0544	62	2	1
KOCSC_9516	60	1	1
ALLCE_3035_var	56	4	1
CAMSA_6215	56	3	1
AMAPA_2810	56	3	1
ALLCE_6618	56	2	1
AMARU_1764	56	3	1
AMBTR_6334	56	1	1
SETIT_9796	55	5	1
AMACR_2381	55	2	1
AMAVI_1827	54	4	1
CONCA_3910	54	1	1
ERATE_3481	53	2	1
ROSHY_3269	53	5	1
AMAPA_6265_1	53	2	1
AMAHY_5254	52	4	1
SEDAL_6599	52	2	1
AMACR_2380	51	3	1
CUCME_3420	51	3	1
AMARU_1762	51	5	1
SEDAL_6601	50	5	1
KOCSC_5431	48	4	1
AMAPA_6265_2	47	2	1
KOCSC_0438	47	3	1
AMAPA_2811	46	3	1
AMAVI_1826	45	4	1
ACAOS_3432	44	2	1
SPIOL_1551	43	4	1
AMAPA_2906	43	2	1
TAROF_9570	41	3	1
AMARU_1763	40	8	1
Ninguno - H_N90 Control	24	4	1

Ninguno - GFP	0	4	1
ADADI_0544	60	1	2
SPIOL_1551	53	3	2
KOCSC_9516	51	4	2
ROSHY_3269	49	4	2
AMACR_2381	48	3	2
CAMSA_6215	46	2	2
CUCME_4756_var	46	1	2
CUCME_3420	46	3	2
CONCA_3910	45	4	2
AMAGR_5230	43	2	2
SENOB_8832	43	1	2
KOCSC_1672	42	3	2
CONCA_4103	36	5	2
ADADI_1600	36	4	2
BRANA_9788	33	1	2
CUCME_4756	33	4	2
ANDGE_6461	33	2	2
ALLCE_3035	33	3	2
AMAPA_4787	30	2	2
TAROF_2111	28	3	2
ROSHY_6783	26	4	2
CANRO_3976	25	4	2
TAROF_2111_var	25	5	2
XANST_27_var	24	2	2
NICBE_5162	24	3	2
XANST_27	22	3	2
SPIOL_0401	22	2	2
ERATE_2090	22	1	2
SPIOL_0410	21	2	2
CANRO_3271	20	2	2
AMAPA_1826	20	2	2
DIGSA_5109	20	2	2
DIGSA_5107	17	2	2
ERATE_4149	15	4	2
SETIT_2080	14	2	2
ROSHY_8873	12	4	2
AMBTR_1537	12	6	2
SEDAL_8241	11	6	2
Ninguno - H_N90 Control	11	4	2
ERATE_4824	9	5	2

ALLCE_3035_var	8	1	2
Ninguno - GFP	0	4	2
AMACR_2643	0	4	2

Ejemplo 4: evaluación de péptidos de tránsito y protoporfirinógeno oxidasa en soja

Se evaluaron péptidos de tránsito unidos operativamente a protoporfirinógeno oxidasas en plantas de soja transgénicas en cuanto a la tolerancia a herbicidas PPO. Se construyeron vectores de transformación de plantas que comprendían una construcción de ADN que comprendía una molécula de ADN recombinante optimizada para la expresión de dicotiledóneas y que codificaban una protoporfirinógeno oxidasa unida operativamente a un péptido de tránsito. Los vectores de transformación de plantas luego se utilizaron para transformar soja, y se regeneraron y evaluaron las plantas en cuanto a su sensibilidad a un herbicida PPO.

Los genes que codifican las siete protoporfirinógeno oxidasas de HemG H_N10, H_N20, H_N30, H_N40, H_N50, H_N90 y H_N100 se unieron operativamente a treinta y siete péptidos de tránsito diferentes y se clonaron en un vector de transformación de planta base tal como se describe en el ejemplo 3. Esto permitió la comparación lado a lado de siete protoporfirinógeno oxidasas de HemG diferentes con treinta y siete péptidos de tránsito diferentes utilizando el mismo promotor y elementos 3'UTR en

cada construcción de ADN. Estos vectores 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 por cada construcción. Se utilizó una solución de herbicida 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.

Cinco semanas después de la transformación, se pulverizaron las plantas con dos pasadas de solución herbicida PPO estéril a una tasa de 20 g/ha. Para cada construcción de ADN evaluada, se evaluaron cuatro recipientes cada uno con 30-40 plantas transformadas individualmente. Las plántulas tratadas luego 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 5, en donde n.d. indica que el análisis no se realizó. Los resultados indican que varias construcciones proporcionaron tolerancia al herbicida PPO.

Tabla 5. Puntaje de tolerancia de 5 semanas en soja

Péptido de tránsito	H _N 10	H _N 20	H _N 30	H _N 40	H _{N5} 0	H _N 90	H _N 100
APG6	n.d.	0	2	2	1	2	2
12G088600TP	n.d.	0	0	1	1	2	1
CANRO_3976	1	1	n.d.	1	1	2	1
SENOB_8832	n.d.	1	n.d.	2	1	1	n.d.
NICBE_5162	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	1	n.d.
BRANA_9788	0	1	0	n.d.	2	2	2
ADADI_1600	n.d.	2	1	2	1	2	2
ROSHY_8873	0	1	1	2	1	0	0
XANST_27	1	1	1	0	1	1	0
CONCA_4103	n.d.	n.d.	0	n.d.	1	2	1
AMAPA_1826	n.d.	1	1	1	0	2	0
SPIOL_0410	1	2	1	1	1	2	2
KOCSC_1672	1	2	1	1	1	2	0
SETIT_2080	0	0	n.d.	2	1	2	1
ALLCE_3035	n.d.	1	1	2	2	2	2
DIGSA_5107	1	1	n.d.	n.d.	0	1	1
AMAPA_4787	n.d.	2	1	1	1	2	1
SPIOL_0401	1	1	0	1	1	2	1
SEDAL_8241	0	1	0	1	0	1	1
CAMSA_6215	0	2	n.d.	n.d.	n.d.	2	2
CUCME_4756	0	0	n.d.	2	1	1	0
ERATE_4149	1	1	n.d.	n.d.	2	2	2
CANRO_3271	1	1	n.d.	1	1	1	2
ERATE_2090	0	1	1	0	1	1	0
ANDGE_6461	n.d.	1	n.d.	2	2	1	1
DIGSA_5109	0	1	0	1	1	0	n.d.
ERATE_4824	1	1	0	1	1	1	1
AMAGR_5230	n.d.	1	0	1	1	2	1
AMBTR_1537	n.d.	1	1	1	1	1	1
BRANA_6036	n.d.	1	n.d.	1	1	1	1
ROSHY_6783	1	1	n.d.	1	0	0	1

AMACR_2643	n.d.	0	n.d.	1	1	0	2
TAROF_2111	1	1	1	0	1	2	1
CANRO_3976_var	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ERATE_4149_var	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	2	0
ALLCE_3035_var	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1
TAROF_2111_var	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	2	1
CUCME_4756_var	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XANST_27_var	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 luego se trasplantaron aproximadamente siete semanas después de la transformación y se cultivaron como plantas R0 utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. También se cultivó una selección de 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 horas de luz a 80 °F, después 6 horas de oscuridad a 74 °F) durante aproximadamente cuatro semanas adicionales. Once semanas después de la transformación, las plantas R0 se pulverizaron con dos pasadas de la misma solución herbicida descrita arriba hasta una tasa de aplicación final de 20 g/ha. Para cada construcción de ADN evaluada, se evaluaron 15-30 plantas transformadas individualmente. Se puntuaron visualmente las clasificaciones de lesión de herbicidas basándose en la cantidad de lesión tisular sobre la superficie en donde 0 % se consideraba lesión no visible y

100 % se consideraba muerte completa de la planta. Las plantas de control no transgénicas presentaron clasificaciones de lesión de más del 30 %. 30 % de lesión o menos se consideraba tolerancia marginal, 20 % de lesión o menos buena tolerancia y 10 % de lesión o menos excelente tolerancia. Los puntajes se recogieron siete días después del tratamiento y se promediaron para todas las plantas para cada construcción de ADN.

Los resultados de la aplicación de tolerancia a herbicidas en once semanas a las plantas R0 confirmaron los puntajes de clasificación de lesión de porcentaje bajo observados en cinco semanas. Para la evaluación de once semanas, toda clasificación de lesión del 30 % o superior fue equivalente a las clasificaciones de las lesiones de la soja no transgénica. Varias de las construcciones se destacaron como que proporcionan muy buena tolerancia a la aplicación del herbicida. Por ejemplo, APG6 (SEQ ID NO:1) con PPO H_N90 (SEQ ID NO:110) presentó solo 3 % de lesión, APG6 (SEQ ID NO:1) con PPO H_N30 (SEQ ID NO:113) o APG6 (SEQ ID NO:1) con PPO H_N40 (SEQ ID NO:114) presentaron cada uno solo 5 % de lesión; el péptido de tránsito CAMSA_6215 (SEQ ID NO:21) con PPO H_N90 (SEQ ID NO:110) presentó solo 5 % de lesión. En cambio, el péptido de tránsito AMACR_2643 (SEQ ID NO:33) con PPO H_N90 (SEQ ID NO:110) presentó un puntaje de lesión del 50 %. Los datos se presentan en la tabla 6, en donde n.d. indica que el

análisis no se realizó.

Tabla 6. Puntaje de tolerancia de 11 semanas en soja

Péptido de tránsito	H_N 20	H_N 30	H_N 40	H_N 50	H_N 90	H_N 100
APG6	n.d.	5	5	n.d.	3	15
12G088600TP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
CANRO_3976	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	n.d.
SENOB_8832	n.d.	n.d.	15	n.d.	n.d.	n.d.
NICBE_5162	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BRANA_9788	25	n.d.	n.d.	40	25	30
ADADI_1600	20	n.d.	40	n.d.	15	30
ROSHY_8873	n.d.	n.d.	30	n.d.	40	n.d.
XANST_27	n.d.	35	n.d.	40	30	n.d.
CONCA_4103	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	35
AMAPA_1826	n.d.	35	n.d.	n.d.	30	n.d.
SPIOL_0410	20	n.d.	n.d.	n.d.	30	50
KOCSC_1672	20	n.d.	15	40	15	n.d.
SETIT_2080	n.d.	n.d.	35	40	25	n.d.
ALLCE_3035	30	35	30	40	35	30
DIGSA_5107	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
AMAPA_4787	25	n.d.	n.d.	40	15	n.d.
SPIOL_0401	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	n.d.
SEDAL_8241	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CAMSA_6215	20	n.d.	n.d.	n.d.	5	35
CUCME_4756	n.d.	n.d.	35	n.d.	25	n.d.
ERATE_4149	n.d.	n.d.	n.d.	40	30	30
CANRO_3271	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	35
ERATE_2090	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ANDGE_6461	n.d.	n.d.	15	35	n.d.	n.d.
DIGSA_5109	n.d.	35	n.d.	n.d.	40	n.d.
ERATE_4824	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
AMAGR_5230	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	35
AMBTR_1537	30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40
BRANA_6036	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ROSHY_6783	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AMACR_2643	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	50	40
TAROF_2111	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	25	n.d.
CANRO_3976_var	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ERATE_4149_var	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
ALLCE_3035_var	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15	35

TAROF_2111_var	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15	n.d.
CUCME_4756_var	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XANST_27_var	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Los genes que codifican las diez protoporfirinógeno oxidasas de HemY R2N30, R2N40, R2N40opt, R2N70, R2N90, R2N100, R1N473, R1N533, R1N171, R1N311 y R1N33 se unieron operativamente a treinta y nueve péptidos de tránsito diferentes y se clonaron en un vector de transformación de planta base tal como se describe en el ejemplo 3. Esto permitió la comparación lado a lado de diez protoporfirinógeno oxidasas de HemY diferentes con treinta y nueve péptidos de tránsito diferentes utilizando el mismo promotor y elementos 3'UTR en cada construcción de ADN. Estos vectores 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 por cada construcción. Se utilizó una solución de herbicida 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.

Cinco semanas después de la transformación, para cada construcción de ADN se pulverizaron cuatro recipientes (cada uno con 30-40 plantas transformadas individualmente) con dos pasadas de solución herbicida PPO estéril a una tasa de

aplicación final de 20 g/ha. Las plántulas tratadas luego 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 7, en donde n.d. indica que el análisis no se realizó. Los resultados indican que varias construcciones proporcionaron tolerancia al herbicida PPO.

Tabla 7. Puntaje de tolerancia de 5 semanas en soja

Péptido de tránsito	R1N 171	R1N 473	R1N 533	R2N 30	R2N 40	R2N 40^{opt}	R2N 70	R2N 90	R2N 100	R1N 333
APG6	0	2	0	2	n.d. .	1	n.d. .	n.d. .	0	n.d. .
12G088600TP	0	0	2	n.d. .	n.d. .	n.d.	2	0	0	0
CANRO_3976	0	1	0	1	n.d. .	n.d.	1	n.d. .	0	0
SENOB_8832	n.d. .	1	0	2	n.d. .	0	0	n.d. .	0	0
NICBE_5162	1	n.d. .	n.d. .	n.d. .	1	1	n.d. .	0	0	n.d. .
BRANA_9788	n.d. .	1	1	n.d. .	n.d. .	1	0	n.d. .	0	0
ADADI_1600	0	1	0	1	n.d. .	2	n.d. .	n.d. .	n.d. .	0

ROSHY_8873	1	1	n.d. .	2	0	1	0	1	1	0
XANST_27	1	1	n.d. .	2	0	0	n.d. .	1	n.d. .	1
CONCA_4103	1	1	1	2	n.d. .	n.d.	n.d. .	0	1	n.d. .
AMAPA_1826	0	0	0	2	n.d. .	1	n.d. .	n.d. .	n.d. .	0
SPIOL_0410	0	1	0	1	n.d. .	2	n.d. .	1	0	1
KOCSC_1672	0	0	0	n.d. .	n.d. .	0	n.d. .	0	n.d. .	0
SETIT_2080	n.d. .	1	1	1	n.d. .	n.d.	n.d. .	0	1	0
ALLCE_3035	1	1	1	2	n.d. .	1	n.d. .	n.d. .	0	0
DIGSA_5107	1	1	2	2	n.d. .	1	0	0	n.d. .	0
AMAPA_4787	0	1	n.d. .	1	n.d. .	1	n.d. .	n.d. .	0	0
SPIOL_0401	0	0	0	1	n.d. .	0	n.d. .	1	1	0
SEDAL_8241	1	0	1	n.d. .	2	1	n.d. .	1	1	0
CAMSA_6215	0	1	1	2	n.d. .	1	n.d. .	0	n.d. .	n.d. .
CUCME_4756	0	0	n.d. .	1	n.d. .	n.d.	0	1	0	0
ERATE_4149	n.d. .	1	2	1	n.d. .	n.d.	n.d. .	0	0	0
CANRO_3271	1	1	1	1	n.d. .	n.d.	n.d. .	1	0	1
ERATE_2090	n.d. .	0	2	2	n.d. .	n.d.	n.d. .	0	0	0
ANDGE_6461	0	1	0	2	n.d. .	1	n.d. .	n.d. .	0	0
DIGSA_5109	1	0	1	1	n.d. .	1	n.d. .	n.d. .	1	0
ERATE_4824	0	1	0	n.d. .	n.d. .	2	n.d. .	0	0	1
AMAGR_5230	0	2	0	2	n.d. .	n.d.	n.d. .	0	1	0
AMBTR_1537	0	0	1	1	n.d. .	0	n.d. .	0	0	1
BRANA_6036	1	1	n.d. .	1	n.d. .	0	n.d. .	0	0	0
ROSHY_6783	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
AMACR_2643	0	1	1	1	n.d. .	0	n.d. .	0	0	0
TAROF_2111	0	2	0	n.d. .	2	1	0	0	0	0
CANRO_3976_v ar	n.d. .	n.d. .	n.d. .	0	1	n.d.	n.d. .	n.d. .	n.d. .	1
ERATE_4149_v ar	0	0	1	1	1	1	n.d. .	n.d. .	n.d. .	n.d. .

ALLCE_3035_var	n.d. .	n.d. .	0	1	1	n.d.	n.d. .	n.d. .	0	1
TAROF_2111_var	0	0	0	1	1	2	n.d. .	n.d. .	0	n.d. .
CUCME_4756_var	n.d. .	n.d. .	2	n.d. .	2	n.d.	n.d. .	n.d. .	n.d. .	n.d. .
XANST_27_var	1	1	2	1	2	1	n.d. .	n.d. .	n.d. .	n.d. .

Las plántulas en los recipientes no pulverizados que corresponden a las construcciones que tienen un puntaje de 2 luego se trasplantaron aproximadamente siete semanas después de la transformación y se cultivaron como plantas R0 utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. También se cultivó una selección de 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 horas de luz a 80 °F, después 6 horas de oscuridad a 74 °F) durante aproximadamente cuatro semanas adicionales. Once semanas después de la transformación, las plantas R0 se pulverizaron con dos pasadas de la misma solución herbicida descrita arriba hasta una tasa de aplicación final de 20 g/ha. Para cada construcción de ADN evaluada, se evaluaron 15-30 plantas transformadas individualmente. Se puntuaron visualmente las clasificaciones de lesión de herbicidas basándose en la cantidad de lesión tisular sobre la superficie en donde 0 % se consideraba lesión no visible y 100 % se consideraba muerte completa de la planta. Las plantas de control no transgénicas presentaron clasificaciones de

lesión de más del 30 %. 30 % de lesión o menos se consideraba tolerancia marginal, 20 % de lesión o menos buena tolerancia y 10 % de lesión o menos excelente tolerancia. Los puntajes se recogieron siete días después del tratamiento y se promediaron para todas las plantas para cada construcción de ADN.

Los resultados de la aplicación de tolerancia a herbicidas en once semanas a las plantas R0 confirmaron los puntajes de clasificación de lesión de porcentaje bajo observados en cinco semanas. Para la evaluación de once semanas, toda clasificación de lesión del 30 % o superior fue equivalente a las clasificaciones de las lesiones de la soja no transgénica. Algunas de las construcciones se destacaron como que proporcionan muy buena tolerancia a la aplicación del herbicida. Por ejemplo, el péptido de tránsito ANDGE_6461 (SEQ ID NO:26) con R2N30 (SEQ ID NO:163) presentó solo 7 % de lesión. Los datos se presentan en la tabla 8, en donde n.d. indica que el análisis no se realizó.

Tabla 8. Puntaje de tolerancia de 11 semanas en soja

Péptido de tránsito	R1N 171	R1N 473	R1N 533	R2 N30	R2 N40	R2 N40opt	R2 N70	R1N 333
APG6	n.d. .	30	n.d. .	17	n.d. .	20	n.d. .	n.d. .
12G088600TP	n.d. .	n.d. .	40	n.d. .	n.d. .	n.d.	30	n.d. .
CANRO_3976	n.d. .	n.d. .	n.d. .	n.d. .	n.d. .	n.d.	n.d. .	n.d. .
SENOB_8832	n.d. .	n.d. .	n.d. .	25	n.d. .	n.d.	n.d. .	n.d. .

NICBE_5162	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
BRANA_9788	n.d .	35	n.d .	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
ADADI_1600	n.d .	n.d .	n.d .	25	n.d .	30	n.d .	n.d .
ROSHY_8873	n.d .	n.d .	n.d .	35	n.d .	30	n.d .	35
XANST_27	n.d .	n.d .	n.d .	20	n.d .	25	n.d .	35
CONCA_4103	n.d .	n.d .	n.d .	25	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
AMAPA_1826	n.d .	n.d .	n.d .	25	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
SPIOL_0410	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	35	n.d .	n.d .
KOCSC_1672	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
SETIT_2080	n.d .	n.d .	n.d .	20	n.d .	n.d.	n.d .	35
ALLCE_3035	n.d .	n.d .	n.d .	25	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
DIGSA_5107	30	40	35	35	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
AMAPA_4787	n.d .	n.d .	n.d .	25	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
SPIOL_0401	n.d .	n.d .	n.d .	15	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
SEDAL_8241	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	20	n.d.	n.d .	n.d .
CAMSA_6215	n.d .	n.d .	n.d .	15	n.d .	20	n.d .	n.d .
CUCME_4756	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
ERATE_4149	n.d .	n.d .	35	25	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
CANRO_3271	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
ERATE_2090	n.d .	n.d .	35	15	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
ANDGE_6461	n.d .	n.d .	n.d .	7	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
DIGSA_5109	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
ERATE_4824	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	25	n.d .	n.d .
AMAGR_5230	n.d .	35	n.d .	35	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
AMBTR_1537	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
BRANA_6036	n.d .	n.d .	n.d .	25	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
ROSHY_6783	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
AMACR_2643	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .

TAROF_2111	n.d .	40	n.d .	n.d .	20	n.d.	n.d .	n.d .
CANRO_3976_var	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
ERATE_4149_var	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
ALLCE_3035_var	n.d .	n.d .	n.d .	25	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .
TAROF_2111_var	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	n.d .	25	n.d .	n.d .
CUCME_4756_var	n.d .	n.d .	35	n.d .	25	n.d.	n.d .	n.d .
XANST_27_var	n.d .	30	35	n.d .	n.d .	n.d.	n.d .	n.d .

Los genes que codifican la protoporfirinógeno oxidasa de HemG H_N90 se unieron operativamente a 44 péptidos de tránsito diferentes y se clonaron en un vector de transformación de planta base tal como se describe en el ejemplo 3. Esto permitió la comparación lado a lado de péptidos de tránsito diferentes utilizando el mismo promotor, proteína con tolerancia a herbicidas y elementos 3'UTR en cada construcción de ADN. Estos vectores de transformación de plantas se utilizaron para transformar embriones extirpados de soja (germoplasma AG3555) utilizando *A. tumefaciens* y métodos estándar conocidos en la técnica. Se evaluaron cuatrocientas a 4.5000 plantas transgénicas individuales para cada construcción. Se utilizó una solución de herbicida 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.

Cinco semanas después de la transformación, se pulverizaron

las plantas con dos pasadas de solución herbicida PPO estéril hasta una tasa de aplicación final de 20 g/ha. Para cada construcción de ADN evaluada, se realizaron 400 a 4.5000 repeticiones. Las plántulas tratadas luego recibieron al menos 15 horas de exposición a la luz después de la pulverización cada día durante cuatro días. Al final del día cuatro después de la aplicación de S-3100, se puntuaron las plántulas tratadas en cuanto al porcentaje de frecuencia de aprobación relativa (se define como el porcentaje de todas las plantas individuales para una construcción de ADN que visualmente presentan tolerancia a la aplicación de herbicidas con respecto a las plantas transgénicas de control pulverizadas con una solución que solo contiene tensioactivo). Se transplantaron las plántulas en los recipientes no pulverizados aproximadamente siete semanas después de la transformación y se cultivaron como plantas R0. Se cultivaron las plantas R0 en un invernadero en condiciones de vivero de día prolongado (18 horas de luz a 80 °F, después 6 horas de oscuridad a 74 °F) durante aproximadamente cuatro semanas adicionales. Once o doce semanas después de la transformación, las plantas R0 se pulverizaron con dos pasadas de la misma solución herbicida descrita arriba a una tasa de 20 g/ha. Para cada construcción de ADN evaluada, se realizaron 15-45 repeticiones. Se recogieron las clasificaciones de lesión de herbicidas tres a siete días

después del tratamiento. Para la evaluación de once semanas, se registró el porcentaje de plantas con 10 % de lesión o menos y con 20 % de lesión o menos. Con las tasas de aplicación de herbicidas evaluadas, las plantas transgénicas que expresan la protoporfirinógeno oxidasa H_N90 sin péptido de tránsito unido operativamente (control PPO), produjeron cero plantas con 20 % de lesión o menos. Varios de los péptidos de tránsito unidos operativamente a la proteína con tolerancia a herbicidas H_N90 se destacaron como que proporcionan excelente o muy buena tolerancia a la aplicación del herbicida. Por ejemplo, con la pulverización de once semanas más del 50 % de las plantas presentaron un puntaje de lesión del 20 % o inferior cuando expresaban H-N90 unida operativamente a ALLCE_3035 (57 %), KOCSC_9516 (59 %), CAMSA_6215 (69 %), ROSHY_3269 (70 %), ADADI_0544 (75 %), CUCME_3420 (80 %), SPIOL_1551 (85 %), CUCME_4756 (89 %) o CONCA_3910 (90 %). Los datos se proporcionan en la Tabla 9.

Tabla 9. Puntaje de tolerancia de 5 y 11 semanas en soja

Péptido de tránsito	frecuencia de aprobación relativa de pulverización de 5 semanas	% de plantas con pulverización de 11 semanas a ≤ 10 %	% de plantas con pulverización de 11 semanas a ≤ 20 %
CUCME_4756	27%	0%	0%
CANRO_3271	23%	0%	0%
DIGSA_5109	24%	0%	0%
CAMSA_6215	68%	62%	69%
AMACR_2381	30%	0%	0%
ROSHY_3269	54%	25%	70%

CUCME_3420	51%	20%	80%
ADADI_0544	30%	20%	75%
SPIOL_1551	40%	70%	85%
NICBE_5162	9%	0%	0%
CUCME_4756	28%	26%	89%
BRANA_9788	11%	0%	0%
SPIOL_0410	18%	0%	0%
XANST_0027	22%	0%	0%
SETIT_2080	3%	0%	0%
ERATE_4149	3%	0%	0%
TAROF_2111	3%	0%	0%
CONCA_4103	26%	0%	0%
CANRO_3976	6%	0%	0%
AMACR_2643	3%	0%	0%
SPIOL_0401	6%	0%	0%
ADADI_1600	30%	0%	0%
ANDGE_6461	47%	0%	0%
ERATE_2090	11%	0%	0%
12G088600TP	13%	0%	0%
ALLCE_3035	5%	0%	0%
SENOB_8832	52%	0%	0%
TAROF_2111	66%	0%	0%
ROSHY_8873	10%	0%	0%
KOCSC_1672	25%	12%	24%
AMBTR_1537	2%	0%	0%
AMAPA_1826	7%	0%	0%
BRANA_6036	5%	0%	0%
CONCA_3910	40%	60%	90%
AMAPA_4787	6%	0%	0%
ROSHY_6783	0%	0%	0%
ALLCE_3035	26%	35%	57%
ERATE_4824	12%	0%	0%
AMAGR_5230	2%	0%	0%
SEDAL_8241	5%	0%	0%
DIGSA_5107	11%	0%	0%
KOCSC_9516	27%	16%	59%
XANST_0027_var	3%	0%	0%
APG6	60%	30%	63%
Ninguno - PPO Control	1%	0%	0%

Ejemplo 5: evaluación de péptidos de tránsito y protoporfirinógeno oxidasa en maíz

Se evaluaron péptidos de tránsito unidos operativamente a protoporfirinógeno oxidasas en plantas de maíz transgénicas en cuanto a la tolerancia a herbicidas PPO. Se construyeron vectores de transformación de plantas que comprendían una construcción de ADN que comprendía una molécula de ADN recombinante optimizada para la expresión de monocotiledóneas y que codificaban una protoporfirinógeno oxidasa unida operativamente a un péptido de tránsito. Los vectores de transformación de plantas luego se utilizaron para transformar maíz, y se evaluaron las plantas regeneradas en cuanto a su sensibilidad a un herbicida PPO.

Los genes que codifican la protoporfirinógeno oxidasa H_N90 se unieron operativamente a catorce péptidos de tránsito diferentes y se clonaron en vectores de transformación de planta base con diversos promotores y elementos 3' UTR. El uso de la misma protoporfirinógeno oxidasa en cada construcción de ADN permitió la comparación lado a lado de los diferentes péptidos de tránsito. También se produjo un vector de transformación de planta con la protoporfirinógeno oxidasa H_N90 sin péptido de tránsito unido operativamente (control PPO). Estos vectores de transformación de plantas se utilizaron para transformar maíz utilizando *A. tumefaciens* y métodos

estándar conocidos en la técnica. Se cultivaron plantas R0 regeneradas y luego se evaluaron para acceder al grado de tolerancia que presentaron para las aplicaciones de S-3100 (tasa de 40 a 80 g/ha) aproximadamente 10-14 semanas después de la transformación. Se accedió visualmente a la tolerancia 3 a 10 días después de la aplicación del herbicida. Las plantas pulverizadas se puntuaron según el porcentaje de lesión en la parte de la planta por encima del suelo completa después del tratamiento con herbicida, con relación a los controles. Para cada construcción de ADN evaluada, se evaluaron 10 a 120 plantas y se promedió la tasa de lesión. Se registró el porcentaje de plantas R0 que aprobaron con un puntaje de lesión del 20 % o inferior. Toda construcción de ADN que produjo plantas transgénicas en donde el 50 % o más presentaban 20 % de lesión o inferior se consideró una construcción de ADN altamente tolerante. Toda construcción de ADN que produjo plantas transgénicas en donde el 20 % o más presentaban 20 % de lesión o inferior se consideró una construcción de ADN tolerante. Con las tasas de aplicación de herbicidas evaluadas (S-3100 a 40 a 80 g/ha), las plantas transgénicas que expresan la protoporfirinógeno oxidasa H_N90 sin péptido de tránsito unido operativamente (control PPO), con XANST_27 o con ALLCE_3035 produjeron cero plantas con 20 % de lesión o menos. Sin embargo, varios de los péptidos de tránsito produjeron

plantas transgénicas que expresaban la protoporfirinógeno oxidasa H_N90 que eran altamente tolerantes o tolerantes: ADADI_0544 (41 %), ANDGE_6461 (60 %), CAMSA_6215 (60 % y 41 % de aprobación), CONCA_3910 (36 % y 45 %), ROSHY_3269 (64 % y 74 %), SPIOL_1551 (50 % y 55 %), SETIT_9796 (55 %). Los datos se proporcionan en la Tabla 10.

Tabla 10. Puntaje de tolerancia en maíz

Promotor	Péptido de tránsito	3'UTR	Porcentaje con 20 % de lesión o menos
A	SETIT_9796	E	55%
A	ACAOS_3432	E	37%
A	ADADI_0544	E	41%
A	TAROF_9570	E	29%
A	ALLCE_6618	E	31%
D	ROSHY_3269	H	74%
B	ROSHY_3269	F	64%
D	CONCA_3910	H	36%
B	CONCA_3910	F	45%
D	SPIOL_1551	H	55%
B	SPIOL_1551	F	50%
D	CAMSA_6215	H	41%
B	CAMSA_6215	F	60%
B	ANDGE_6461	F	60%
B	ADADI_1600	F	11%
D	XANST_27_var	H	0%
C	XANST_27_var	G	0%
A	ALLCE_3035	E	0%
B	ALLCE_3035	F	0%
C	Ninguno - PPO Control	G	0%

Ejemplo 6: evaluación de péptidos de tránsito y protoporfirinógeno oxidasa en algodón

Se evaluaron péptidos de tránsito unidos operativamente a

protoporfirinógeno oxidasas en plantas de algodón transgénicas en cuanto a la tolerancia a herbicidas PPO. Se construyeron vectores de transformación de plantas que comprendían una construcción de ADN que comprendía una molécula de ADN recombinante optimizada para la expresión de dicotiledóneas y que codificaban una protoporfirinógeno oxidasa unida operativamente a un péptido de tránsito. Los vectores de transformación de plantas luego se utilizaron para transformar algodón, y se evaluaron las plantas regeneradas en cuanto a su sensibilidad a un herbicida PPO.

Los genes que codifican las protoporfirinógeno oxidasas H_N20 y H_N90 se unieron operativamente a cuatro péptidos de tránsito diferentes y se clonaron en un vector de transformación de planta base tal como se describe en el ejemplo 3. Esto permitió la comparación lado a lado de péptidos de tránsito diferentes utilizando el mismo promotor y elementos 3'UTR en cada construcción de ADN. Estos vectores de transformación de plantas se utilizaron para transformar algodón utilizando *A. tumefaciens* y métodos estándar conocidos en la técnica. Se cultivaron plantas regeneradas y luego se evaluaron para acceder al grado de tolerancia que presentaron para las aplicaciones de S-3100 (tasa 20 g/ha) aproximadamente 11 o 12 semanas después de la transformación. Se accedió visualmente a la tolerancia 3 a 10 días después de la aplicación del

herbicida. Las plantas pulverizadas se puntuaron según el porcentaje de lesión en la parte de la planta por encima del suelo completa después del tratamiento con herbicida, con relación a los controles. Para cada construcción de ADN evaluada, se evaluaron 10-15 repeticiones y se promedió la tasa de lesión promedio. Un puntaje de lesión promedio del 50 % o menos se consideró una construcción de ADN altamente tolerante a herbicidas y un puntaje de lesión promedio mayor que el 50 %, pero menor que el 80 %, se consideró una construcción de ADN marginalmente tolerante a herbicidas. Un puntaje de lesión promedio del 80 % o superior se consideró no distinguible de las plantas de control. Las plantas de algodón transgénicas que expresan la protoporfirinógeno oxidasa H_N90 unida operativamente a CAMSA_6215 produjeron plantas que eran altamente tolerantes a herbicidas con un puntaje de lesión promedio del 38 %. Las plantas de algodón transgénicas que expresan la protoporfirinógeno oxidasa H_N90 unida operativamente a AMAPA_4787 produjeron plantas que eran marginalmente tolerantes a herbicidas con un puntaje de lesión promedio del 63 %.